



**T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI**

***MICROMONOSPORA CRATERILACUS* NA12 VE  
*STREPTOMYCES* SP. MK37H SUŞLARINDAN BİRLİKTE  
KÜLTÜRLEME YOLUYLA DESFERRİOKSAMİN  
BİYOSENTEZİNİN OPTİMİZASYONU**

Yüksek Lisans Tezi

**Mücahit KAYA**

Danışman  
**Doç. Dr. Hilal AY**

SAMSUN  
2023

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI



**MICROMONOSPORA CRATERILACUS NA12 VE  
STREPTOMYCES SP. MK37H SUŞLARINDAN BİRLİKTE  
KÜLTÜRLEME YOLUYLA DESFERRİOKSAMİN  
BİYOSENTEZİNİN OPTİMİZASYONU**

Yüksek Lisans Tezi

**Mücahit KAYA**

Danışman

**Doç. Dr. Hilal AY**

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.FEN.1904.20.009 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN  
2023

## TEZ KABUL VE ONAYI

Mücahit KAYA tarafından, Doç.Dr. Hilal AY danışmanlığında hazırlanan “*MICROMONOSPORA CRATERILACUS* NA12 VE *STREPTOMYCES* SP. MK37H SUŞLARINDAN BİRLİKTE KÜLTÜRLEME YOLUYLA DESFERRİOKSAMİN BİYOSENTEZİNİN OPTİMİZASYONU” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 8.2.2022 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

|        | Unvanı Adı Soyadı<br>Üniversitesi<br>Ana Bilim/Ana Sanat Dalı                                                    | Sonuç                                                                     |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Başkan | Doç. Dr. Hilal AY<br>Ondokuz Mayıs Üniversitesi<br>Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana<br>Bilim Dalı               | <input checked="" type="checkbox"/> Kabul<br><input type="checkbox"/> Ret |
| Üye    | Dr. Öğr. Üyesi Hayrettin SAYGIN<br>Ondokuz Mayıs Üniversitesi<br>Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana<br>Bilim Dalı | <input checked="" type="checkbox"/> Kabul<br><input type="checkbox"/> Ret |
| Üye    | Dr. Öğr. Üyesi Cihan İNAN<br>Karadeniz Teknik Üniversitesi<br>Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana<br>Bilim Dalı    | <input checked="" type="checkbox"/> Kabul<br><input type="checkbox"/> Ret |

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Ahmet TABAK  
Enstitü Müdürü

## BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Yüksek Lisans tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet ☐ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☒

18 /12 / 2022  
Mücahit KAYA

## TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

**Tez Başlığı :** MICROMONOSPORA CRATERILACUS NA12 VE STREPTOMYCES SP. MK37H SUŞLARINDAN BİRLİKTE KÜLTÜRLEME YOLUYLA DESFERRİOKSAMİN BİYOSENTEZİNİN OPTİMİZASYONU

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 25.12.2022 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 14

Tek kaynak oranı : % 5 çıkmıştır.

25/12/2022  
Doç. Dr. Hilal AY

## ÖZET

### *MICROMONOSPORA CRATERILACUS* NA12 VE *STREPTOMYCES* SP. MK37H SUŞLARINDAN BİRLİKTE KÜLTÜRLEME YOLUYLA DESFERRİOKSAMİN BİYOSENTEZİNİN OPTİMİZASYONU

Mücahit KAYA

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans, Aralık/2022

Danışman: Doç. Dr. Hilal AY

İnsan vücudunda demir birikmesinin dokuda hasara neden olabilecek güçlü oksidan etkileri vardır. Aşırı miktarda demir birikmesi kalp, karaciğer, akciğer, beyin, kemik iliği ve endokrin organlarda çeşitli hastalıklar için elverişli bir ortam hazırlamaktadır. Vücutta biriken demir, desferrioksamin sayesinde demire şelasyon yaparak ya da bağlanarak vücuttan atılmasına yardım eder. Ülkemizde özellikle diyaliz hastalarının tedavisinde kullanılan Desferal®, Novartis Pharma AG (Basel, İsviçre) tarafından ticari olarak piyasaya sürülmüş desferrioksamin aktif maddesi içeren bir ilaçtır ve günümüzde yurt dışından ithal edilmektedir. Bu çalışma, yerli mikrobiyal kaynaklardan (*Micromonospora craterilacus* NA12, *Streptomyces* sp. MK37H) biyoinformatik analizler ile desferrioksamin biyosentetik gen kümesine sahip olduğu tespit edilen suşlardan siderofor üretiminin optimizasyonu amacıyla düzenlenmiştir. Araştırmada mikrobiyal kaynakların uygun ortamda aktifleşmeleri için GPHF, GYM, N-Z-Amine, TYG agar olmak üzere dört farklı besiyeri kullanılmıştır. Optimum gelişim gösterdikleri N-Z-Amine besiyerinde geliştirilen mikroorganizmalar desferrioksamin siderofor biyosentezi için farklı karbon kaynakları (glukoz, maltoz, sükröz ve nişasta) kullanılarak hazırlanan LB ve TYG sıvı besiyerine inoküle edilip 28°C’de 7 gün çalkalamalı inkübatörde geliştirilmiştir. İnkübasyonun ardından santrifüj ile ayrılan kültür sıvısında siderofor varlığı sıvı CAS testi ile spektrometrik olarak (630 nm) yapılmıştır. Desferrioksamin standart olarak kullanılmakla birlikte % siderofor verimi hesaplanmıştır. En fazla siderofor üretimi gözlenen besiyeri temel alınarak suşların *Nocardia* sp. GTS18 izolatu ile birlikte kültür yoluyla siderofor üretiminin artırılması hedeflenmiştir. Araştırma süresince yapılan optimizasyonlar sonucunda *Micromonospora craterilacus* NA12 ve *Streptomyces* sp. MK37H’nin TYG sıvı besiyerinde LB besiyeri ile kıyaslandığında daha iyi üreme gösterdiği görülmüştür. Sonuç olarak birlikte kültürleme yolu ve TYG besiyerinde karbon kaynağı olarak nişasta kullanılması ile daha yüksek verimde desferrioksamin sideroforunun üretildiği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** Desferrioksamin, Siderofor, Sekonder metabolit, Şelatlama, Demir

## ABSTRACT

### OPTIMIZATION OF DESFERRIOXAMINE BIOSYNTHESIS THROUGH CO-CULTURING OF *MICROMONOSPORA CRATERILACUS* NA12 AND *STREPTOMYCES* SP. MK37H STRAINS

Mücahit KAYA

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Molecular Biology and Genetics

Master, December/2022

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hilal AY

Iron accumulation in the human body has strong oxidant effects that can cause tissue damage. The excessive iron accumulation creates a favorable environment for various diseases in the heart, liver, lungs, brain, bone marrow, and endocrine organs. The iron accumulated in the body is removed by desferrioxamine from the body by chelating or binding to it. Desferal®, used especially in treating dialysis patients in our country, is a drug containing desferrioxamine active substance commercially released by Novartis Pharma AG (Basel, Switzerland) and is now imported from abroad. This study was designed to optimize siderophore production from strains with desferrioxamine biosynthetic gene clusters by bioinformatic analysis from native microbial sources (*Micromonospora craterilacus* NA12, *Streptomyces* sp. MK37H). In the study, four different media, GPHF, GYM, N-Z-Amine, and TYG agar, were used to activate microbial sources in the appropriate environment. Microorganisms developed in N-Z-Amine medium in which they show optimum growth were inoculated into LB and TYG broth prepared using different carbon sources (glucose, maltose, sucrose, and starch) for desferrioxamine siderophore biosynthesis and grown in a shaking incubator at 28°C for 7 days. After centrifugation of the culture broth, the presence of siderophores was shown spectrophotometrically (630 nm) following the liquid CAS assay. Desferrioxamine was used as a standard, and the % siderophore efficiency was calculated. Based on the medium with the highest production of siderophores, it was aimed to increase the production of siderophores by culturing the strains with *Nocardia* sp. GTS18. As a result of the optimizations made during the research, *Micromonospora craterilacus* NA12 and *Streptomyces* sp. MK37H showed better growth in TYG broth compared to the LB medium. It was concluded that a higher yield of desferrioxamine siderophore was obtained by co-culturing and using starch as a carbon source in a TYG medium.

**Keywords:** Desferrioxamine, Siderophore, Secondary metabolite, Chelating, Iron

## ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Proje çalışmalarındaki desteklerinden dolayı Miraç Ercan Gürsoy ile Diagen Biyoteknoloji A.Ş'ye;

Tez konumun belirlenmesinden, tezimin tamamlanmasına kadar, bilgi ve deneyimleri ile her zaman yardımcı ve yanımda olan, ilgisini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli tez danışman hocam Doç. Dr. Hilal Ay'a;

Yoğun iş ve okul döneminde her türlü anlayış, sabır ve desteği eksik etmeyen en büyük destekçim sevgili eşim Burcu ve kızım Defne'ye

Hayattaki tecrübeleri ile bizlere yol gösteren bir abiden daha fazlası Samet Ece'ye

Her koşulda yanımda olan maddi ve manevi desteğini esirgemeyen Annem ve Babam'a teşekkür ederim.

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.FEN.1904.20.009 numaralı proje ile desteklenmektedir.

Mücahit KAYA

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| TEZ KABUL VE ONAYI .....                                                                                                    | i         |
| BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI .....                                                                                        | ii        |
| TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI .....                                                                                  | ii        |
| ÖZET .....                                                                                                                  | iii       |
| ABSTRACT .....                                                                                                              | iv        |
| ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR .....                                                                                                     | v         |
| İÇİNDEKİLER .....                                                                                                           | vi        |
| SİMGELER VE KISALTMALAR .....                                                                                               | vii       |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                                                                       | viii      |
| TABLolar DİZİNİ .....                                                                                                       | ix        |
| <b>1. GİRİŞ .....</b>                                                                                                       | <b>1</b>  |
| <b>2. LİTERATÜR.....</b>                                                                                                    | <b>3</b>  |
| 2.1. Aktinobakteriler.....                                                                                                  | 3         |
| 2.1.1. Aktinobakterilerin Taksonomisi .....                                                                                 | 5         |
| 2.1.2. Aktinobakterilerin Yaşam Döngüleri .....                                                                             | 6         |
| 2.1.3. Çalışmada Kullanılan İzolatların Genel Özellikleri .....                                                             | 6         |
| 2.2. Sekonder Metabolitler .....                                                                                            | 10        |
| 2.2.1. Mikroorganizmaların Birbirleri ile Etkileşimleri.....                                                                | 13        |
| 2.2.2. Aktinobakterilerde Siderofor Sentez Mekanizması.....                                                                 | 13        |
| 2.2.3. Desferrioksamin B'nin Bazı Biyoteknolojik Uygulama Alanları .....                                                    | 16        |
| <b>3. MATERYAL VE METOT.....</b>                                                                                            | <b>19</b> |
| 3.1. Materyal.....                                                                                                          | 19        |
| 3.1.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar .....                                                                         | 19        |
| 3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Solüsyonlar .....                                                                   | 19        |
| 3.1.3. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri .....                                                                               | 20        |
| 3.1.4. Çalışmada Kullanılan Cihazlar .....                                                                                  | 22        |
| 3.2. Metot .....                                                                                                            | 23        |
| 3.2.1. Desferrioksamin B Gen Kümelerinin Biyoinformatik Analizi.....                                                        | 23        |
| 3.2.2. Mikroorganizmaların Üreme Koşullarına Göre Aktifleştirilmesi .....                                                   | 23        |
| 3.2.3. Siderofor Üretiminin CAS Analizi ile Doğrulanması .....                                                              | 24        |
| 3.2.4. Siderofor Üretiminde Gerekli Karbon Kaynakları ve Besiyerlerin Yanıt-<br>Yüzey Yöntemleri (RSM) Analizi.....         | 25        |
| 3.2.5. Siderofor Üretiminde Gerekli Karbon Kaynaklarının Belirlenmesi.....                                                  | 26        |
| 3.2.6. Desferrioksamin B Ekstraksiyonu .....                                                                                | 26        |
| <b>4. BULGULAR.....</b>                                                                                                     | <b>28</b> |
| 4.1. Biyoinformatik Analiz.....                                                                                             | 28        |
| 4.2. Kullanılan Bakteriler .....                                                                                            | 36        |
| 4.3. CAS Agar ile Siderofor Varlığının Gözlemlenmesi.....                                                                   | 37        |
| 4.4. Sıvı CAS Testi ile Siderofor Veriminin Hesaplanması.....                                                               | 38        |
| 4.5. Yanıt Yüzey Yöntemleri ile İçeriklerin Optimizasyonu .....                                                             | 39        |
| 4.6. Siderofor Üretiminin Karbon Kaynağı ve Birlikte Kültürleme Metodu<br>Kullanılarak Sıvı Besiyeri ile Optimizasyonu..... | 40        |
| 4.7. Desferrioksamin B Sideroforunun Ekstraksiyonu.....                                                                     | 41        |
| <b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>                                                                                           | <b>44</b> |
| <b>6. ÖNERİLER .....</b>                                                                                                    | <b>47</b> |
| <b>KAYNAKLAR.....</b>                                                                                                       | <b>48</b> |
| <b>EKLER.....</b>                                                                                                           | <b>54</b> |
| <b>ÖZ GEÇMİŞ.....</b>                                                                                                       | <b>55</b> |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|                                            |                                     |
|--------------------------------------------|-------------------------------------|
| $A_{630}$                                  | : Absorbans 630 değeri              |
| $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ | : Kalsiyum klorür dihidrat          |
| $\text{CaCO}_3$                            | : Kalsiyum karbonat                 |
| CAS                                        | : Krom Azurol S                     |
| C                                          | : Sitozin                           |
| Da                                         | : Dalton                            |
| DFOB                                       | : Desferrioksamin B                 |
| $\text{FeCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$        | : Demir(III) klorür hekzahidrat     |
| G                                          | : Guanin                            |
| GYM                                        | : Glikoz-Maya-Malt                  |
| HCl                                        | : Hidroklorik asit                  |
| HDTMA                                      | : Hekzadesiltrimetilamonyum         |
| LB                                         | : Luria-Bertani                     |
| NRPS                                       | : Ribozomal olmayan peptid sentetaz |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4$                  | : Sodyum fosfat monobazik           |
| NaCl                                       | : Sodyum klorit                     |
| TYG                                        | : Tripton-Maya Özütü-Glikoz         |
| RSM                                        | : Yüzey Yanıt Yöntemi               |

## ŞEKİLLER DİZİN

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1. <i>Streptomyces</i> spp.'nin makroskobik özellikleri. Katı kültürün farklı ortamlarında A, Evrensel <i>streptomyces</i> agar-2 [ISP2]; B, Evrensel <i>streptomyces</i> agar-4 [ISP4]; C, Nişasta kazein agar [CAA]; D, Nişasta gliserol agar [GAA]; E, Czapek [CZ] and F, Tamamlayıcı agar [MC]. (Araujo-Melo vd., 2019)..... | 4  |
| Şekil 2.2. Biyoteknolojide aktinobakteri uygulamaları (Deka vd., 2020) .....                                                                                                                                                                                                                                                             | 5  |
| Şekil 2.3. Aktinobakterilerde yaşam döngüsünün şematik gösterimi (Barka vd., 2016).....                                                                                                                                                                                                                                                  | 6  |
| Şekil 2. 4 <i>Micromonospora</i> türlerine ait filogenetik ağaç gösterimi (Ay vd., 2020).....                                                                                                                                                                                                                                            | 7  |
| Şekil 2.5. <i>Nocardia</i> türlerine ait filogenetik ağaç gösterimi (McTaggart vd., 2010) .....                                                                                                                                                                                                                                          | 10 |
| Şekil 2.6. Sekonder metabolitin üretilme aşaması.....                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 12 |
| Şekil 2.7. Aktinobakterilerde sekonder metabolitin birlikte kültürme aşamasının şematik gösterimi ..                                                                                                                                                                                                                                     | 13 |
| Şekil 2.8. Üretilen bazı siderofor türlerinin gösterimi (Holden ve Bachman, 2015) .....                                                                                                                                                                                                                                                  | 14 |
| Şekil 2.9. Desferrioksamin B üretiminin kimyasal sentez gösterimi (Mügge vd., 2020) .....                                                                                                                                                                                                                                                | 15 |
| Şekil 2.10. Sideroforlar aracılığı ile demirin hücre içerisine alınmasının gösterimi (Vinuesa ve McConnell, 2021).....                                                                                                                                                                                                                   | 17 |
| Şekil 3.1. Desferrioksamin B sideroforunun nanopatikül ile ekstraksiyonu (Egbers vd., 2020).....                                                                                                                                                                                                                                         | 27 |
| Şekil 4. 1 <i>Micromonospora craterilacus</i> NA12 mikroorganizmasından Desferrioksamin B sideroforunun biyoinformatik yöntemlerin kullanılması ile elde edilen sonucun gösterimi .....                                                                                                                                                  | 28 |
| Şekil 4. 2 <i>Streptomyces</i> sp. MK37H mikroorganizmasından Desferrioksamin B sideroforunun biyoinformatik yöntemlerin kullanılması ile elde edilen sonucun gösterimi.....                                                                                                                                                             | 29 |
| Şekil 4. 3 Mikroorganizmaların besiyerlerinde üreme görselleri (Üst taraf: MK37H, Alt Sol Taraf: NA12, Alt Sağ Taraf: GTS18) .....                                                                                                                                                                                                       | 37 |
| Şekil 4.4. LB-CAS agar üzerinde siderofor üretiminin gösterimi (Sarı-turuncu zonlar siderofor üretimi olduğunu göstermektedir.) .....                                                                                                                                                                                                    | 38 |
| Şekil 4.5. Optimizasyondan önce siderofor üretim yüzde hesaplamasının gösterimi .....                                                                                                                                                                                                                                                    | 39 |
| Şekil 4. 6 Yüzey yanıt yöntemi ile besiyeri içeriklerine ait Biyoinformatik analiz temelli optimizasyon görseli .....                                                                                                                                                                                                                    | 40 |
| Şekil 4. 7 Mikroorganizmalara ait LB ve TYG besiyerlerinden elde edilen yüzde siderofor verim görseli.....                                                                                                                                                                                                                               | 41 |
| Şekil 4.8. TYG sıvı besiyerinde karbon kaynağı ile elde edilen % siderofor verimi .....                                                                                                                                                                                                                                                  | 41 |
| Şekil 4.9. Farklı miktarlarda üretilen sideroforun mikropilaka yöntemi ile analiz gösterimi .....                                                                                                                                                                                                                                        | 42 |
| Şekil 4.10. Standart desferalin 630 nM' de ölçüm sonucunda hesaplanan eğrinin gösterimi .....                                                                                                                                                                                                                                            | 43 |
| Şekil 4.11. Optimizasyon sonucunda elde edilen siderofor (mM) miktarlarının kantitatif analiz sonuçları. (Kırmızıdan yeşile gidildikçe siderofor üretim miktarı artmaktadır) .....                                                                                                                                                       | 43 |

## TABLÖLAR DİZİNİ

|                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 2. 1 Bazı üretilen sekonder metabolit ve uygulama alanları .....                                                                           | 11 |
| Tablo 2.2. DFOB dışında kullanılan bazı antikanser sideroforlar (Pita-Grisanti vd., 2022) .....                                                  | 18 |
| Tablo 3. 1 Yüzey yanıt yöntemleri analizinde kullanılan optimizasyon tablosu .....                                                               | 25 |
| Tablo 3. 2 Karbon kaynağı kullanımının tablo şeklinde gösterimi .....                                                                            | 26 |
| Tablo 4.1. <i>Micromonospora craterilacus</i> NA12 genomundan antiSMASH programı ile tahmin edilen diğer sekonder metabolitlerin gösterimi ..... | 28 |
| Tablo 4. 2 <i>Streptomyces</i> sp. MK37H genomundan antiSMASH programı ile tahmin edilen diğer sekonder metabolitlerin gösterimi .....           | 30 |
| Tablo 4. 3 <i>Nocardia</i> sp. GTS18 genomundan antiSMASH programı ile tahmin edilen diğer sekonder metabolitlerin gösterimi .....               | 32 |
| Tablo 4. 4 <i>Streptomyces</i> sp. BG9H genomundan antiSMASH programı ile tahmin edilen diğer sekonder metabolitlerin gösterimi .....            | 33 |
| Tablo 4. 5 <i>Streptomyces</i> sp. NTH33 genomundan antiSMASH programı ile tahmin edilen diğer sekonder metabolitlerin gösterimi .....           | 35 |

# 1. GİRİŞ

Aktinobakteri filumları, aerobik veya anaerobik, filamentli, spor oluşturan bakterilerdir. Karasal veya su habitatlarında olabilen nükleik asit yapılarında yüksek guanin ve sitozin içeriğine sahip çok fazla sekonder metabolit üretmesiyle tanınan bir Gram-pozitif mikroorganizma topluluğudur (Sun, 2018). Çeşitli yaşam alanlarının bulunmasına rağmen ana yaşam alanları karasal bölgelerdir ve toprağın karakteristik kokusunu oluşturan jeosmin adlı organik maddeleri üretmeleri ile tanınırlar (Salwan vd., 2020). Aktinobakteriler selüloz, kitin gibi organik maddelerin dönüştürülmesiyle toprak ve humus oluşumunu arttırarak karbon döngüsünün devamlılığında tarımda önemli rol oynarlar (Ranjani vd., 2016). Bu mikroorganizmaların tıpta kullanımı ise antibiyotik ve immünosupresanlar olarak bilinen sekonder metabolitlerdir (Bhatti vd., 2017, Seipke vd., 2012). Antibiyotikler mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların tedavi edilmesinde kullanılan önemli moleküllerdir. Günümüzde yanlış antibiyotik kullanımına bağlı olarak bir direnç gelişimi olsa da hala birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaya devam edilen metabolitlerdir.

Sekonder metabolit üretiminde aktinobakteriler çok aktif rol oynamaktadırlar (Tiwari vd., 2012). Günümüzde mikroorganizmalardan elde edilen 23.000 biyoaktif metabolit arasında aktinobakterilerden yaklaşık olarak 10.000 metabolit bildirilmiştir. Kendi alt grupları arasında ise *Streptomyces* türleri tek başına 7600 bileşiğin elde edilmesine katkı vermektedir (Bérđy vd., 2012, Ranjani vd., 2016). Aktinobakteriler tarım ve tıp alanlarındaki önemlerinin yanı sıra, bitki biyokütlesini ayrıştırarak ve topraktaki metal ( $Fe^{3+}$ ,  $Ag^{+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cr^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Eu^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  vb.) minerallerini şelatlayarak doğada mineral geri dönüşümü üzerinde önemli yere sahiptir (Kandel vd., 2017).

Çözünür minerallerden demir, mikroorganizmaların yaşamlarını devam ettirmeleri için enzimlerin yapılarına katılarak kofaktör görevi görür. Bu nedenle düşük miktarda demir barındıran ortamlardan demirin hücre içerisine alınması organizma yaşamında önemli bir yere sahiptir. Bu bakteriler doğada az miktarda bulunan çözünür demir mineralini şelatlamadan sorumlu mekanizmalar geliştirmiştir ve üretilen bu mekanizmalardan biri de sideroforlardır (Cornelis vd., 2010, Neilands vd., 1995).

Sideroforlar (Yunanca 'demir taşıyıcı'), bakteriler, mantarlar ve bitkiler tarafından üretilen düşük moleküler ağırlıklı (400-1500 Da) sekonder metabolitlerdir.

Siderofor biyosentezi, genellikle düşük demir seviyesiyle (<5-10 mol/l) tetiklenerek hücre içerisinde üretilmesiyle çevre ortama salınan organik bileşiklerdir (Miethke vd., 2007).

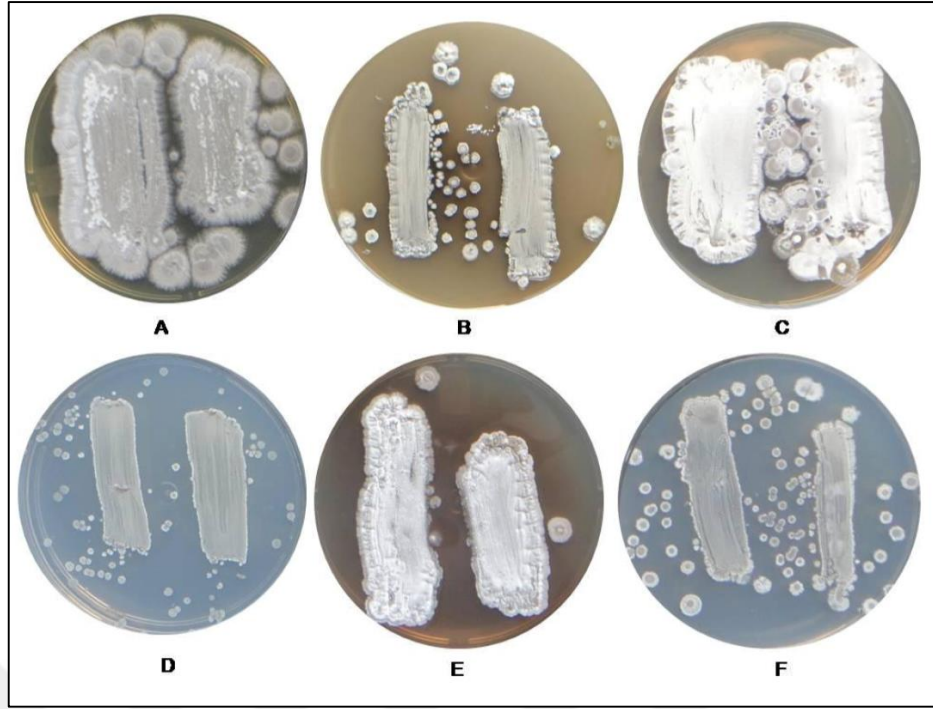
Siderofor molekülleri genellikle peptid veya peptid olmayan esnek bir iskelete sahip olup bu iskelet çeşitli metal bağlama bölgeleri ile uzamaktadır (Hider ve Kong, 2010). Bu moleküller hidroksamat, hidroksil, katekol, karboksilik veya karışık tipte olabilmektedir (Hofmann vd., 2020). Hidroksamat gruplarından desferrioksamin B, transfüzyonlara bağlı hemosiderozu tedavi etmek için en çok kullanılan demir şelatlama ilacıdır.

Demir fazlalığı büyük ölçüde şelatlama ajanları kullanılarak önlenebilen, vücudun farklı bölgelerinde demirin fazla şekilde depolanma durumudur. İnsan vücudu demir fazlalığını gidermek için fizyolojik bir mekanizmaya sahip değildir. Demir fazlalığının tedavisi için şu an uygulanan yöntem şelasyon tedavisidir. Demir şelasyon tedavisi, potansiyel olarak demir fazlalığı hastalığının tedavisinde demire bağlanan ligandların kullanımını içerir (Özbolat ve Tuli, 2019). Desferal® (Novartis Pharma AG, Basel, İsviçre), dünyada bu tür hastalıkların tedavisinde kullanılan başlıca ilaç olup aktif bileşen olarak desferrioksamin B içermektedir. Ülkemizde özellikle diyaliz hastalarının tedavisinde kullanılan Desferal®, Novartis Pharma AG (Basel, İsviçre) tarafından ticari olarak piyasaya sürülmüş bir ilaçtır. Bu ilaç günümüzde yurt dışından ithal edilmektedir. Bu proje ile desferrioksamin bileşiğinin ülkemizden izole edilmiş olan aktinobakteriler kullanılarak üretilmesi amaçlanmaktadır.

## 2. LİTERATÜR

### 2.1. Aktinobakteriler

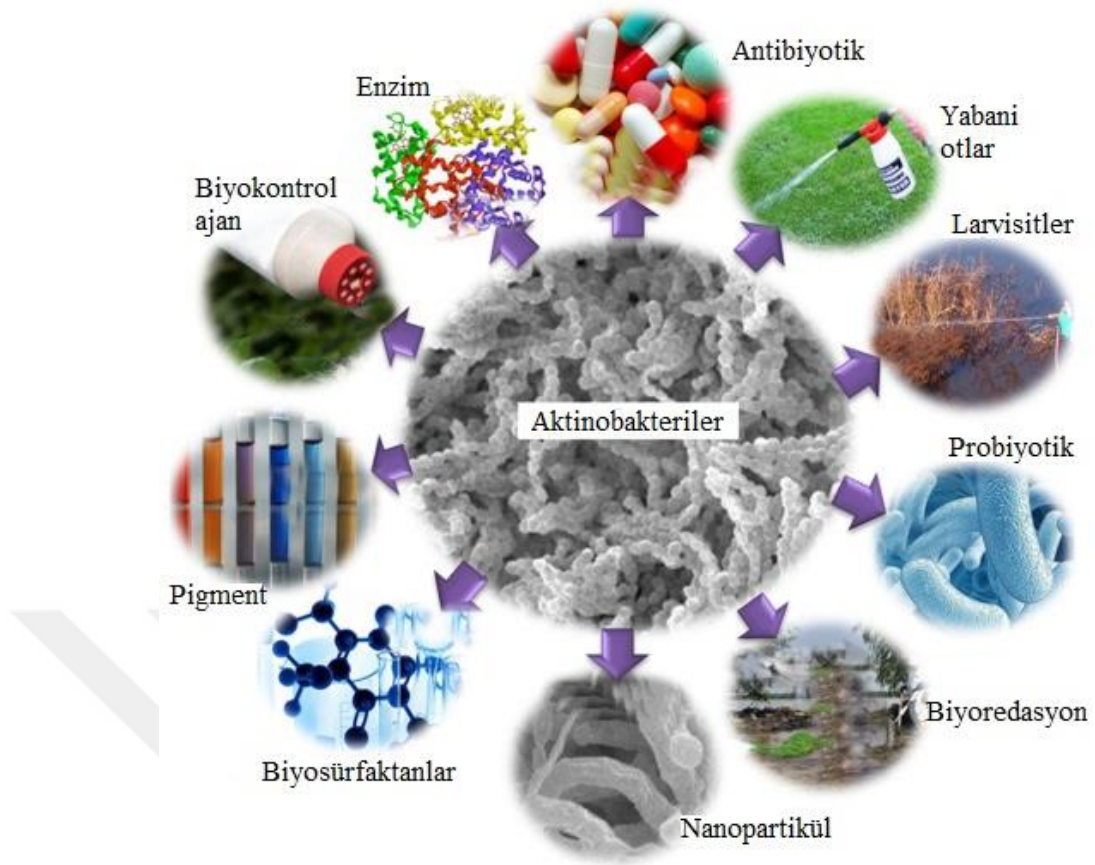
Aktinobakteriler, *Bacteria* domaini içerisinde yer alan en büyük filumlardan biridir ve çok çeşitli karasal ve su ekosistemlerinde geniş çapta dağılmış serbest yaşayan organizmalardır (Mawang vd., 2021, Barka vd., 2016). Aktinobakteriler, DNA'larında >%50 guanin (G) ve sitozin (C) içeriğine sahip genomları 2.5 Mb ila 9.7 Mb olan Gram-pozitif mikroorganizmalardır. Buna karşılık Gram-negatif üyelere de sahip olup *Thermoleophilum sp.*, *Gardnerella vaginalis*, *Saccharomonospora viridis* P101T, *Ferrimicrobium acidiphilum* ve *Ferrithrix thermotolerans* örnek olarak verilebilir (Johnson vd., 2009). Genel olarak aktinobakteriler, substrat miselyumu ve hava miselyumlarından dolayı filamentli bakteriler sınıfında yer almaktadır (Anandan vd., 2016). Hiflerin uç uzantısı ve dallanmaların farklı formlarının oluşturulması ile büyürler. Oluşturulan farklı formlara Yunanca ışın (*aktis* veya *aktin*) ve mantar (*mukēs*) kelimelerinden türetilen isimlerini veren budur. Geleneksel olarak, aktinomisetler mantarlar ve bakteriler arasında geçiş formları olarak kabul edilmiştir (Barka vd., 2016). Aktinobakterilerin büyük bir bölümü *Streptomyces* cinsine dahildir. *Streptomyces*, kültür koşullarında büyük çeşitlilik gösteren çok sayıda türü kapsar (Shepherd vd., 2010). Yaşam döngülerinin çoğunu, özellikle sınırlı besin koşulları altında yarı uyukulu sporlar olarak geçiren saprofitik, toprakta yaşayan organizmalardır (Mayfield vd., 1972). Buna karşılık, *Streptomyces* olmayan aktinomisetler, *Kitasatospora*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Micrococcus*, *Arthrobacter* ve *Rhodococcus* vb. normal koşullar altında izolasyon sıklığı düşük olan suşlardır ve bunların çoğu, özel izolasyon, koruma ve yetiştirme yöntemleri gerektirir (Baltz, 2006; Subramani ve Aalbersberg, 2013).



Şekil 2.1. *Streptomyces* spp.'nin makroskopik özellikleri. Katı kültürün farklı ortamlarında A, Uluslararası *Streptomyces* Projesi-2 Agar [ISP2]; B, Uluslararası *Streptomyces* Projesi-4 Agar [ISP4]; C, Nişasta kazein agar [CAA]; D, Nişasta gliserol agar [GAA]; E, Czapek [CZ] and F, Tamamlayıcı agar [MC]. (Araujo-Melo vd., 2019)

Aktinobakterilerin, toprakta yaşayan patojen ve diğer kommensal organizmaların yanı sıra, yaklaşık toprak mikrobiyal florasının ilkbaharda %20, sonbaharda > %30 ve kışın aylarında %13 kadarını oluşturduğu bilinmektedir (Salwan ve Sharma, 2020). Bu da aktinobakterilerin popülasyon yoğunluğunun bulunduğu çevresel etmenler (pH faktörü, nem miktarı, yüksek veya düşük sıcaklık, tuzluluk vb. ) ve iklime göre değiştiğini göstermekte olup aktinobakteri popülasyon yoğunluğu ortalama 1 gr toprak başına  $10^6$  ve  $10^9$  arasındadır. Genellikle toprak yüzeylerinde bulunan aktinobakteriler yer yüzeyinden 2 m derinlikteki bölgelerde de bulunabilirler (Zenova vd., 2011).

Aktinobakteriler, biyoaktif bileşikler üretme kabiliyetine sahip en tanınmış mikroorganizma grubunu temsil eder. Bu nedenle aktinobakteriler farmasötikler, biyoteknoloji, gıda endüstrileri, tarım ve enzim endüstrisindeki çeşitli uygulamalarda kullanım alanı oluşturmuştur. Ayrıca, kirleticilerin temizlenmesine yardımcı olması için Aktinobakterilerin kullanılması da ilgi görmektedir. Aktinobakteriler, büyümeleri için kirleticileri metabolize edebildiklerinden, kirleticilerin uzaklaştırılması için ekonomik ve güvenli bir biyolojik yöntem sağlar.



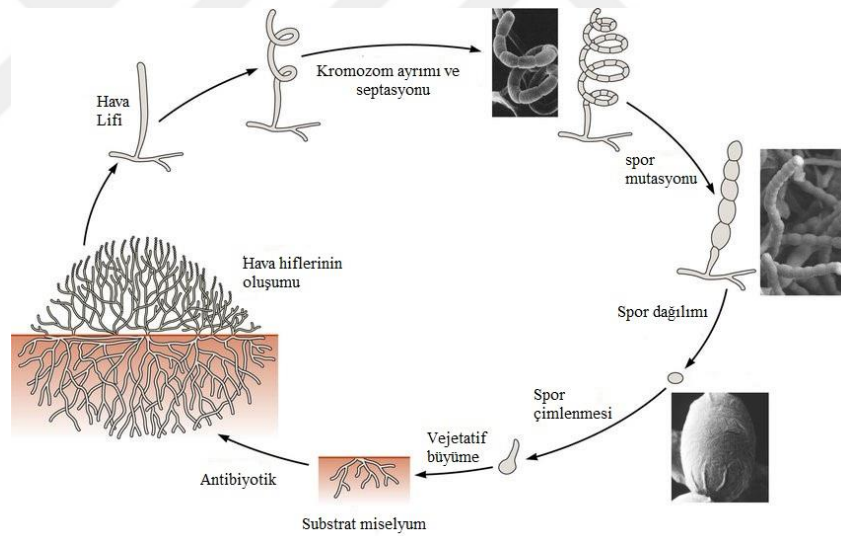
Şekil 2.2. Biyoteknolojide aktinobakteri uygulamaları (Deka vd., 2020)

### 2.1.1. Aktinobakterilerin Taksonomisi

Aktinobakteriler, bakteri alemindeki en büyük filumlardan biri olarak kabul edilir. Bu mikroorganizmalara ait filogenetik dal 16S rRNA'dan çıkartılır. Filumun diğer bakteri taksonlarından ayrılması, bazı proteinlerdeki insersiyonlar/delesyonlar, 23S rRNA geninde büyük bir insersiyonun varlığı ve farklı gen düzenlemeleri ile ilgilidir. Bununla birlikte, genomik analizin ortaya çıkmasından sonra, Aktinobakteriden tanımlanan spesifik proteinler (rpoB, ssgB vb.), Aktinobakterileri ve alt grupları ayırt etmeye yardımcı oldu. Waksman ve Henrici, mikro-morfoloji ve değişken hücre duvarı kemotipine dayalı Aktinobakteri sınıflandırma sistemini önerdi; dört ana hücre duvarı tipi vardır. Aktinobakteriler grubu içindeki türleri sınıflandırmak için kullanılan en yaygın yaklaşım, 16S rRNA'ya dayalı filogeniyi içerir (Sujarit vd., 2017). Bu karakterizasyon, tetrapeptidlerden yan zincirin 3. pozisyonunda bulunan amino asit tarafından peptidoglikanların bileşimini ve yapısını, interpeptid köprülerinde glisin ve peptidoglikanlarda bulunan karbonhidratın varlığını izledi.

### 2.1.2. Aktinobakterilerin Yaşam Döngüleri

Aktinobakterilerin yaşam döngüsü beslenme durumuna göre değişkenlik göstermektedir. Bu değişkenlikler iyi büyüme koşulları altında çok hücreli mantarlara benzer septalı miseller oluştururken; sınırlayıcı büyüme koşulları altında sadece vejetatif misel gelişirler (Procópio vd., 2012). Aktinobakteriler, sporları çimlendirerek, besin içerisine giren ve çoğalmaları ile ilgili maddelerinin (polisakkaritler, proteinler, lipidler ve aromatik bileşikler) hücre dışı enzimler tarafından metabolize edilmesinden sorumlu dallanma hifleri ile vejetatif miselleşmeye neden olan karmaşık bir yaşam döngüsüne sahiptir. Bitkisel miselyum (birincil hif), septasyon ve spor oluşumunu içeren morfolojik farklılaşmaya maruz kalan üreme miselyumunu oluşturan substrat yüzeyinde çıkıntı yapan hava miselyumundan (ikincil hif) kaynaklanır. Bunlar, çoğu ısıya duyarlı olan, ancak adaptasyonda önemli olan, kuru mevsimde türlerin hayatta kalmasını teşvik eden besin azalmasının bir sonucu olarak oluşur (Yagüe vd., 2013).



Şekil 2.3. Aktinobakterilerin yaşam döngüsünün şematik gösterimi (Barka vd., 2016)

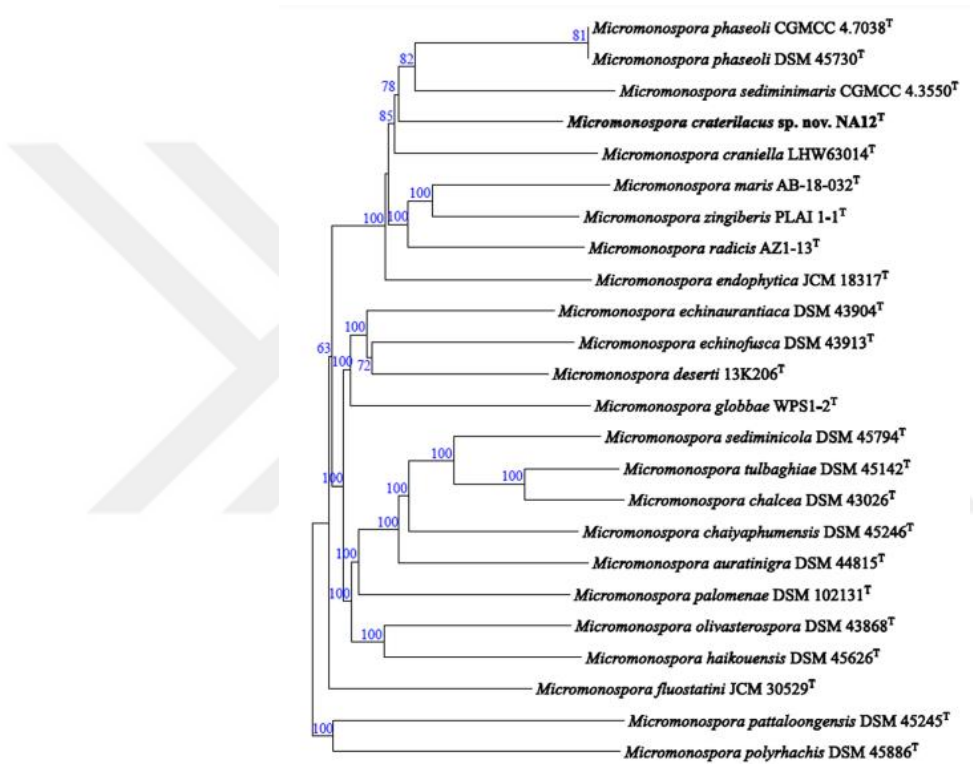
### 2.1.3. Çalışmada Kullanılan İzolatların Genel Özellikleri

#### 2.1.3.1. *Micromonospora*

*Micromonospora* türleri doğada geniş bir şekilde yayılış gösterir ve farklı ortamlarda yaşar. Tıpta kullanılan bazı ikincil metabolitlerin kaynak organizmaları olmalarının yanı sıra *Micromonospora* türleri bitki gelişimini de destekleyebilmektedir (Hirsch vd., 2010). *Micromonospora* suşları, baklagil

nodüllerinin doğal endofitleri olarak tanımlanmıştır. Cins önemli fizyolojik ve biyokimyasal çeşitlilik sergilerken, *Micromonospora* morfoloji, filogeni ve kemotaksonomi açısından iyi tanımlanmış bir grup oluşturur. Kolonileri beyaz, turuncu, gül veya kahverengi gibi çeşitli renklerde olabilir.

Bununla birlikte, *Micromonospora* cinsinin türlerini tek başına morfoloji temelinde ayırt etmek her zaman kolay değildir. Sonuç olarak, filogeniler ve tür tanımlamaları artık daha yaygın olarak 16S rRNA geninin veya *gyrB*'nin (DNA topoizomerazını kodlayan gen) dizisi analiz edilerek türetilmektedir (Ay vd., 2020).



Şekil 2. 4 *Micromonospora* türlerine ait filogenetik ağaç gösterimi (Ay vd., 2020)

Bu türlerin çoğu alkali veya nötr topraklardan ve daha az ölçüde su ortamlarından izole edilmiştir. *M. echinospora*'nın spor popülasyonunun, ısıya tepki özellikleri bakımından heterojen olduğu bilinmektedir; bu, bu türün ve akrabalarının popülasyonları içinde var olan doğal değişkenliği ortadan kaldırmak için rutin ısı aktivasyonunun kullanılabileceğini düşündürmektedir (Hoskisson vd., 2000). Ayrıca, *Micromonospora lupini* Lupac 08 genomunun analizi, bakterinin toprakta veya bitki dokularında hayatta kalmasına yardımcı olabilecek çeşitli gen dizilerini ortaya çıkarmıştır. Bununla birlikte, varsayılan bitki materyalini parçalayan enzimleri kodlayan birçok gene sahip olmasına rağmen, bu bakteri bir bitki patojeni

olarak kabul edilmez (Trujillo vd., 2014). Ek olarak, genom karşılaştırmaları, *M. lupini* Lupac 08'in, *Frankia* sp. ACN14a, CcI3 ve EAN1pec suşları ile metabolik olarak yakından ilişkili olduğunu gösterdi. Bu sonuçlar, *Micromonospora* cinsinin, tamamen karasal bir yaşam tarzından fakültatif bir endofitik yaşam tarzına önceden tanımlanamayan bir adaptasyon sürecinden geçtiğini göstermektedir.

*Micromonospora* cinsinin ayrıca çok sayıda antibiyotik ürettiği rapor edilmiştir (Berdy, 2005) ve çeşitli özelliklere sahip yaklaşık 500 farklı molekülü sentezleyerek en çok metabolit üreten *Streptomyces*'ten sonra ikinci sırada yer almaktadır (Genilloud, 2012). *Micromonospora* türleri hidrolitik enzimler üretebilir, bu da onların doğal ortamlarında organik maddelerin parçalanmasında aktif rol oynamalarını sağlar. Denizel *Micromonospora* türleri, geniş dağılımları ve probiyotik olarak potansiyel kullanımları açısından yakın zamanda gözden geçirilmiştir (Das vd., 2008).

#### 2.1.3.2. *Streptomyces*

*Streptomyces*, mantarlara benzer filamentli bir yapıya sahip, çeşitli ortamlarda büyüyen tipik olarak tek bir büyük doğrusal kromozoma sahip bir Gram-pozitif bakteri cinsidir. *Streptomyces*'in morfolojik farklılaşması, bir spor zincirine farklılaşabilen bir hif tabakasının oluşumunu içerir. Çok hücreli miselyal *Streptomyces*'in yaşam döngüsü, vejetatif hif oluşturmak için büyüyen bir sporun çimlenmesiyle başlar, ardından bir hif büyümesi ve dallanma süreci, karmaşık dallı vejetatif miselyumla sonuçlanır (Chater vd., 2010). Bu süreç Gram-pozitifler arasında benzersizdir ve özel ve koordineli bir metabolizma gerektirir.

*Streptomyces*'in ilginç özelliği, antifungaller, antiviraller, antitümoral, anti-hipertansifler gibi biyoaktif ikincil metabolitler ve esas olarak antibiyotikler ve immünosupresifler üretme yeteneğidir. Cinsin diğer bir özelliği, filizlenen sporlarının hif oluşturduğu, düzenli aralıklarla septa oluşturan ve çekirdeksiz sporlardan oluşan bir zincir oluşturan çok çekirdekli aerial miselyumu oluşturduğu karmaşık hücreli gelişimdir (Bentley vd., 2002). *Streptomyces* vejetatif hiflerinin belirgin bir özelliği, uç uzama ile büyümeleridir. Vejetatif büyüme sırasında hücre bölünmesinin hücre fizyonauna yol açmaması, bunun yerine hifleri bağlı bölmelere ayıran çapraz duvarlara yol açması (Donachie vd., 1993), streptomisetleri çok hücreli bir bakterinin nadir bir örneği yapar ve her bölme kromozomun birden fazla kopyasını içerir (Claessen vd., 2014). Vejetatif çapraz duvarların aralığı hem farklı *Streptomyces* türleri arasında hem de farklı büyüme koşulları ve miselyal yaşları arasındaki bireysel türler arasında

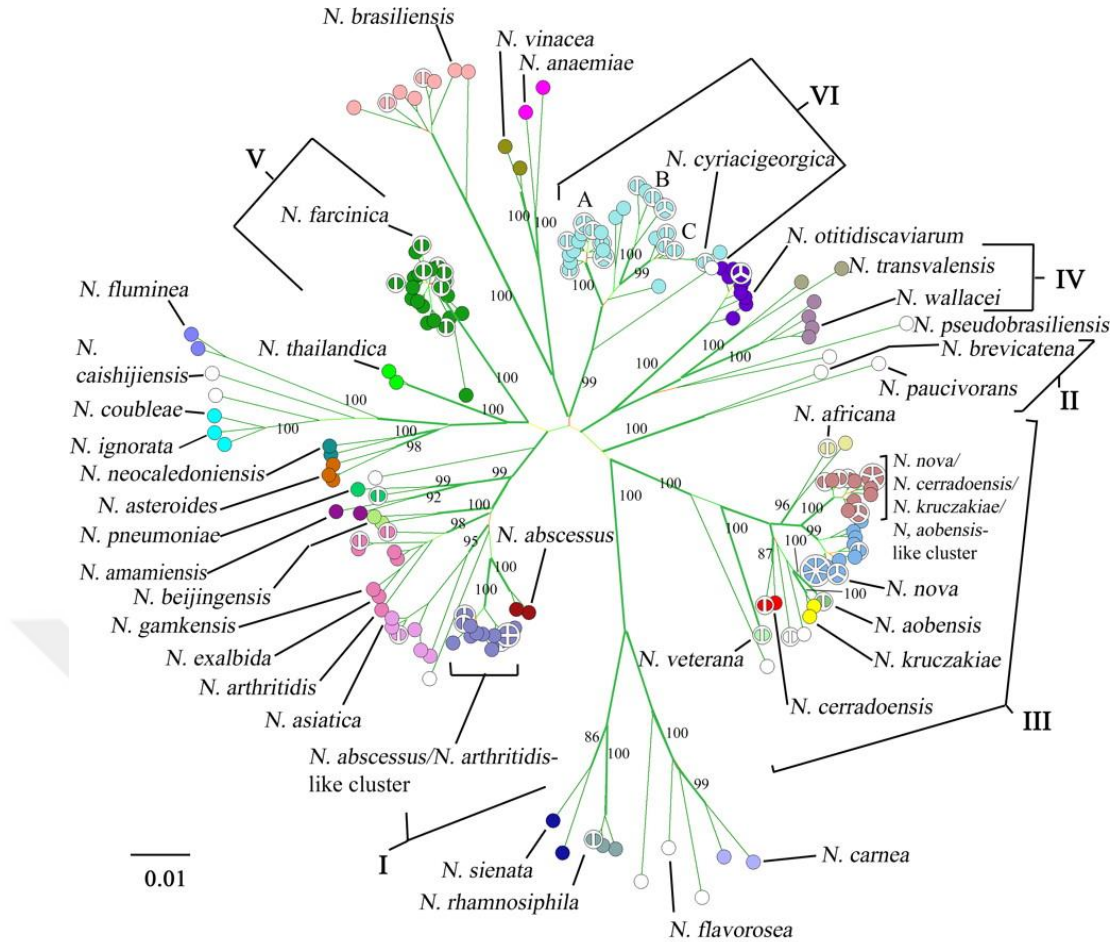
önemli ölçüde farklılık gösterir. Besin tükenmesi gibi olumsuz koşullar altında, vejetatif miselyum, hava hifi adı verilen, dik sporojenik yapılar oluşturmak için farklılaşır (Dyson, 2019).

Streptomisetleri önemli kılan özellikler, büyük metabolit üretim hızları ve biyotransformasyon süreçleri, lignoselüloz ve kitini degrade etme yetenekleri ve organik maddenin biyolojik döngülerindeki rollerine bakıldığında toprakta en bol bulunan mikroorganizmalar arasında yer almalarıdır (Benthley vd., 2002).

### **2.1.3.3. *Nocardia***

*Nocardia* cinsi *Actinomycetota* filumuna *Actinomycetia* sınıfına *Nocardiaceae* ailesine aittir (Dhakal vd., 2019). *Nocardia* suşunun ilk bildirilen izolasyonu, 1888'de Edmond Nocard tarafından bir sığır lenfanjit vakasından izole edilmiştir. Suş daha sonra "*Nocardia farcinica*" olarak adlandırıldı. Daha sonra, *Nocardia* cinsine ait birçok tür, antimikrobiyal duyarlılık testleri, substrat dekompozisyon testleri ve ilaç dirençlilik testleri gibi biyokimyasal testler kullanılarak tanımlanmış ve taksonomik olarak sınıflandırılmıştır (Roth vd., 2003).

*Nocardia*'lar bağışıklığı baskılanmış konakçılarda fırsatçı enfeksiyon etkeni olarak bilinen, her yerde bulunan bir çevresel bakteri grubudur. *Nocardia* türleri, toplamda 168'den fazla farklı türün tanımlandığı, her yerde bulunan toprak kaynaklı aerobik aktinomisetlerdir (Brown-Elliott vd., 2006). *Nocardia* enfeksiyonları çevresel kaynaklardan inhalasyon veya perkütan aşılama yoluyla gelişse de (Abreu vd., 2015), hastane kaynaklı bulaşma da bildirilmiştir. Son 20 yılda, *Nocardia* enfeksiyonları, patojen izolasyonu ve moleküler tanımlama için geliştirilmiş yöntemler ve gittikçe büyüyen bağışıklığı baskılanmış popülasyon nedeniyle, dünya çapında insanlar ve evcil hayvanlar arasında ortaya çıkan hastalıklar olarak kabul edilmiştir (Malani, 2010). *Nocardia* türleri fırsatçı patojenler olarak kabul edilmektedir (Dolin vd., 2005) ve bağışıklık fonksiyonunu tehlikeye attığı bilinmektedir.



Şekil 2.5. *Nocardia* türlerine ait filogenetik ağaç gösterimi (McTaggart vd., 2010)

Ayrıca *Nocardia* türleri, antibiyotikler ve enzimler gibi endüstriyel açıdan önemli biyoaktif moleküller üretir (Barka ve ark., 2015).

## 2.2. Sekonder Metabolitler

*Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Frankia*, *Micromonospora* ve bazı aktinobakteri üyeleri, biyoteknolojik olarak en önemli mikrobiyal topluluklardan biridir. Aktinobakterilerin sekonder metabolitleri, çeşitli biyolojik aktivitelerle bilinir (Manvisagan vd., 2014). Farklı mikroorganizmalardan yaklaşık 23.000 antibiyotik keşfedilmiştir ve mikrobiyal toplulukta aktinobakterilerin sekonder metabolitlere katkısı (~10.000) inanılmazdır. Aktinobakteriler arasında *Streptomyces* cinsi üyeleri biyoaktif metabolit üreticilerinin başında gelir ve her suşun 10-20 ikincil metabolit ürettiği öngörülmektedir (Lam, 2006). Aktinobakteri üyeleri arasında, *Streptomyces*'in antibiyotikler, uçucu bileşikler, sideroforlar gibi çok sayıda biyoaktif metabolit ürettiği bilinmektedir (Tablo 2.1). Bu metabolitler, antimikrobiyal,

antitümör ve antiinflamatuvar özellikleriyle bilinirler ve çeşitli biyolojik etkinlikleri açısından Manivasagan vd., (2014) tarafından gözden geçirilmiştir.

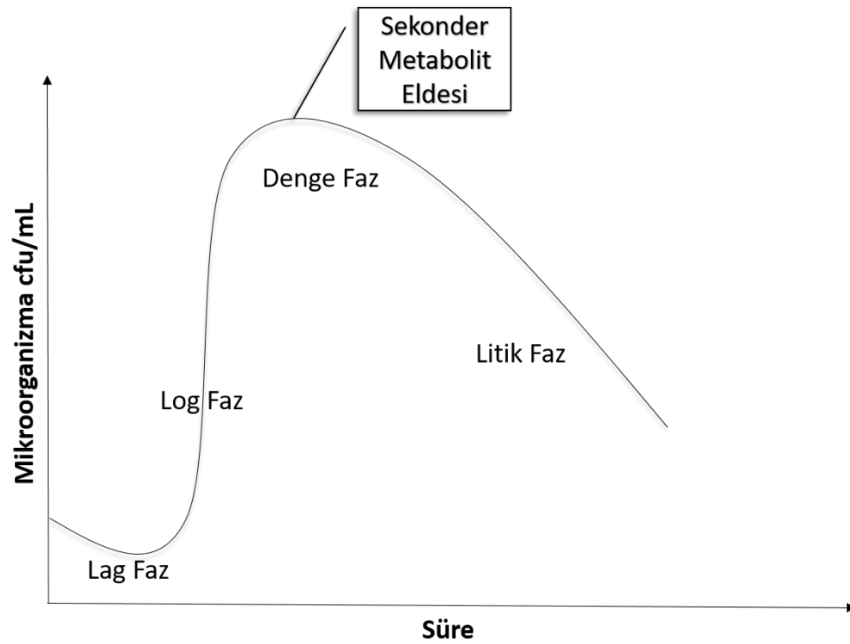
Tablo 2. 1 Bazı üretilen sekonder metabolitler ve uygulama alanları

| Rol                    | Mikroorganizma                                  | Metabolit                                    | Uygulama Alanı                                                   |
|------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Antibiyotik            | <b><i>Streptomyces</i> sp. SD85</b>             | sceliphrolactam                              | Tıp                                                              |
|                        | <b><i>Streptomyces</i> sp. NB-A13</b>           | staurosporine                                | antifungal ve hipotansif aktivite, antikanser ajanlar            |
|                        | <b><i>Streptomyces</i> sp. ZZ406</b>            | Antikanser ilaç                              | glioma hücrelerinin çoğalmasını engellemek                       |
|                        | <b><i>S. avermitilis</i></b>                    | Ivermectin                                   | Anti parazitik                                                   |
|                        | <b><i>Planomonospora alba</i></b>               | Planosporicin                                | Antibakteriyel                                                   |
|                        | <b><i>Actinoplanes ferrugineus</i></b>          | Actinocarbasin                               | Anti-GRAM + Aktivite                                             |
| Bitki Büyümesine Katkı | <b><i>Corynebacterium</i> sp.</b>               | Azotlu gübre yerine                          | Bitki Büyüme                                                     |
|                        | <b><i>Pseudonocardia dioxanivorans</i></b>      | –                                            | Azot fiksasyonu/Biyokontrol maddesi                              |
|                        | <b><i>Streptomyces</i> sp.</b>                  | –                                            | Bitki büyümesini teşvik edici/Biyokontrol ajanı                  |
|                        | <b><i>Micromonospora</i> sp.</b>                | –                                            | Bitki büyümesini teşvik edici/Biyokontrol ajanı                  |
|                        | <b><i>Streptomyces</i> sp. Strain MBCN152-1</b> | –                                            | <i>Alternaria brassicicola</i> 'ya karşı biyokontrol potansiyeli |
|                        | <b><i>S. lydicus</i> WYEC 108</b>               | Çözünür actinovate                           | Biyofungisit                                                     |
| Enzimler               | <b><i>Streptomyces</i> sp. H1</b>               | CMCase,                                      | İnatçı lignoselülozun bozunması                                  |
|                        | <b><i>Micromonospora</i> sp. G7</b>             | ksilanaz, lignin peroksidaz,                 |                                                                  |
|                        | <b><i>Saccharomonospora</i> sp. T9</b>          | manganez peroksidaz, lakkaz                  |                                                                  |
|                        | <b><i>Streptomyces</i> sp. G12</b>              | endo- $\beta$ -1,4-glukanaz                  | hemiselülozun monosakkaritlere gelişmiş hidrolizi                |
|                        | <b><i>S. leeuwenhoekii</i> C34</b>              | Baeyer-Villiger monooksijenazları (BVMO'lar) | Biyokatalizör                                                    |
|                        | <b><i>S. griseus</i></b>                        | AA10 LPMO                                    | Kitin degradasyonu                                               |
| Siderofor              | <b><i>Thermobifida fusca</i></b>                | kitin-aktif LPMO/Selülaz                     | selülozik biyokütleyi degrade etmek                              |
|                        | <b><i>Thermobifida fusca</i></b>                | Düşük aktiviteye sahip olsa da GH18 kitinaz  | Koloidal kitin ve kitosan gibi polimerik substratların bozunması |
|                        | <b><i>S. sporocinereus</i> OsiSh-2</b>          | Siderofor                                    | <i>Magnaporthe oryzae</i> 'ye karşı antagonist etki              |
|                        | <b><i>Streptomyces</i> sp. MBRL 10</b>          | Hidroksamat tip siderofor                    | Fungal patojenlere karşı antagonist etki                         |

Tablo 2.1 (devam)

|                                 |                                        |                                                                                   |                                                                    |
|---------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Sinyal Molekülü                 | <i>Micromonospora</i> sp.              | –                                                                                 | Jasmonate tarafından düzenlenen savunmaların uyarılması            |
| Uçucu Organik Bileşikler (VOCs) | <b><i>Streptomyces</i> spp.</b>        | Uçucu organik bileşik-alkoller, esterler, asitler, alkanlar, ketonlar ve alkenler | Bitki hastalıklarının bastırılması ve doğrudan antifungal aktivite |
|                                 | <b><i>Streptomyces</i> sp. MBRL 10</b> | Uçucu organik bileşikler                                                          | Diğer bakterilerde antibiyotik üretimini modüle eder               |
|                                 |                                        |                                                                                   | <i>Rhizoctonia solani</i> 'ye karşı koruma                         |

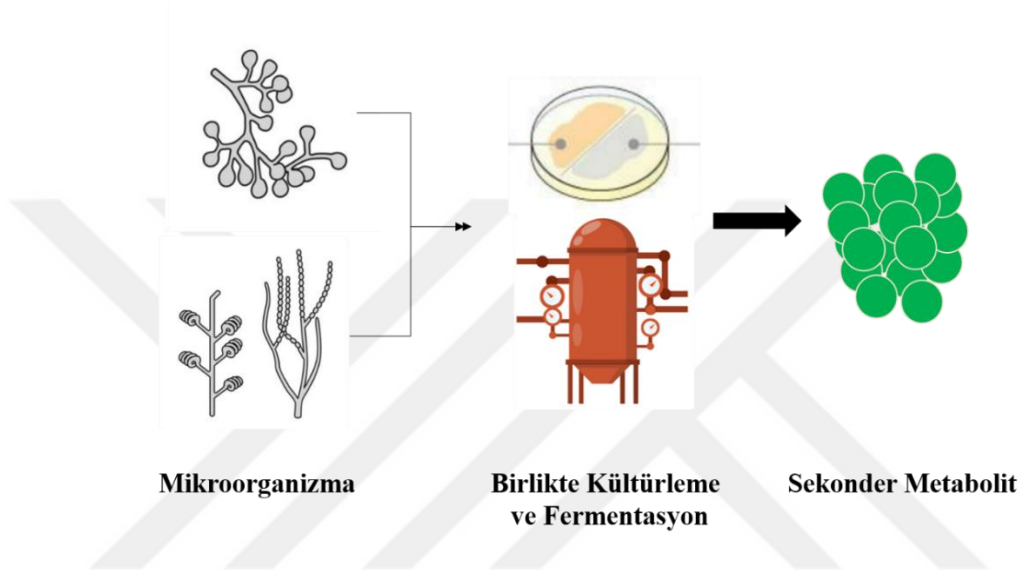
Sekonder metabolitler, primer metabolizma sonrasında açığa çıkan ürünlerden sentezlenirler. Hücrenin yaşam döngüsünde gerekli olan primer metabolitlerin aksine, sekonderler "fazlalık" metabolitler olarak bilinmesinin yanı sıra, varlığı ve miktarları dış ortamdan etkilenir. Bu biyoaktif moleküller, sekonder metabolizmalarının bir parçası olarak, mikrobiyal kromozomlarından kodlanan biyosentetik gen kümelerinden üretilirler ve uygun koşullar sağlanana kadar sessiz kalırlar (Jiang vd., 2018). Sekonder metabolit biyosentezi, besin tükenmesi gibi dış uyaranlara yanıt olarak, büyüme hızının azalmasıyla ya da rekabet söz konusu olduğunda kendi kendini koruma aracı olarak hücrenin hayatta kalması için büyük önem taşımaktadır (Sharon, 2010).



Şekil 2.6. Sekonder metabolitin üretilme aşaması

### 2.2.1. Mikroorganizmaların Birbirleri ile Etkileşimleri

Birlikte kültürleme, mikroorganizmaların yakınlardaki sakinlerle sürekli olarak etkileşime girdiği çevresel habitatı taklit ederek mikroorganizmalardan yeni biyoaktif sekonder metabolitleri keşfetmeye yönelik bir başka etkili kültür tabanlı stratejidir. Uygun bir ortam içerisinde mikroorganizmaları karıştırarak geliştirilen ortamlara birlikte kültürleme ya da karışık fermentasyon denir (Tan vd., 2019).



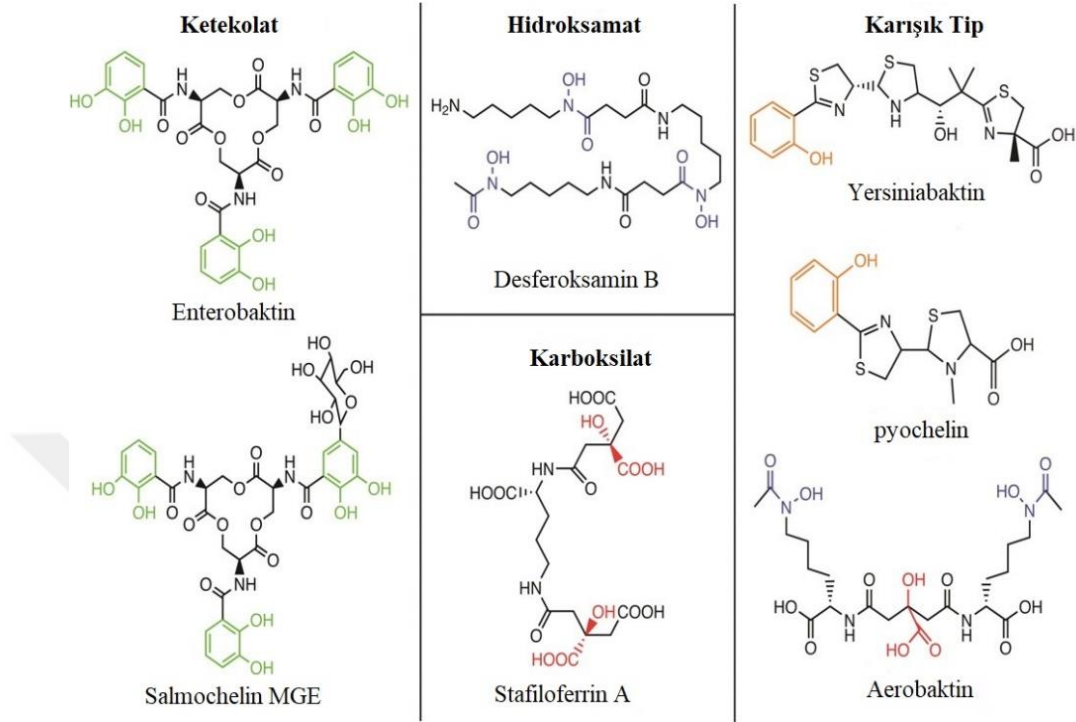
Şekil 2.7. Aktinobakterilerde sekonder metabolitin birlikte kültürme aşamasının şematik gösterimi

Geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında, birlikte kültürleme, tek besin maddesi veya fiziksel durum değişiklikleri üzerinde öngörülemeyen uyaranlar sunarak mikroorganizmaların saf kültür koşullarında gözlemlenmeyen çeşitli yeni sekonder metabolitler üretmesine izin verir (Abdelmohsen vd., 2015). Ayrıca, ortak kültür yöntemi yalnızca yeni sekonder metabolitleri uyandırmak için değil, var olan sekonder metabolit miktarının artırılması için de kullanılır. Bu bağlamda birlikte kültürleme yöntemleri bakteri ve mantarlarda çalışılmasının yanı sıra çoğunlukla aktinomisetlerde uygulanmaktadır (Yu vd., 2019).

### 2.2.2. Aktinobakterilerde Siderofor Sentez Mekanizması

Birçok mikroorganizmanın (*Lactobacillus* dışında) çevredeki demiri kullanabilmek için farklı formlardaki sideroforları sentezleyerek çevresindeki diğer mikroorganizmalar ile rekabet ettiği gösterilmiştir (Ratledge ve Dover, 2000). Mikroorganizmaların sentezlediği farklı kimyasal özellikteki sideroforlar kimyasal

kompozisyon ve mikrobiyal orijinlerine göre sınıflandırılırlar (Miller ve Marvin, 2008).



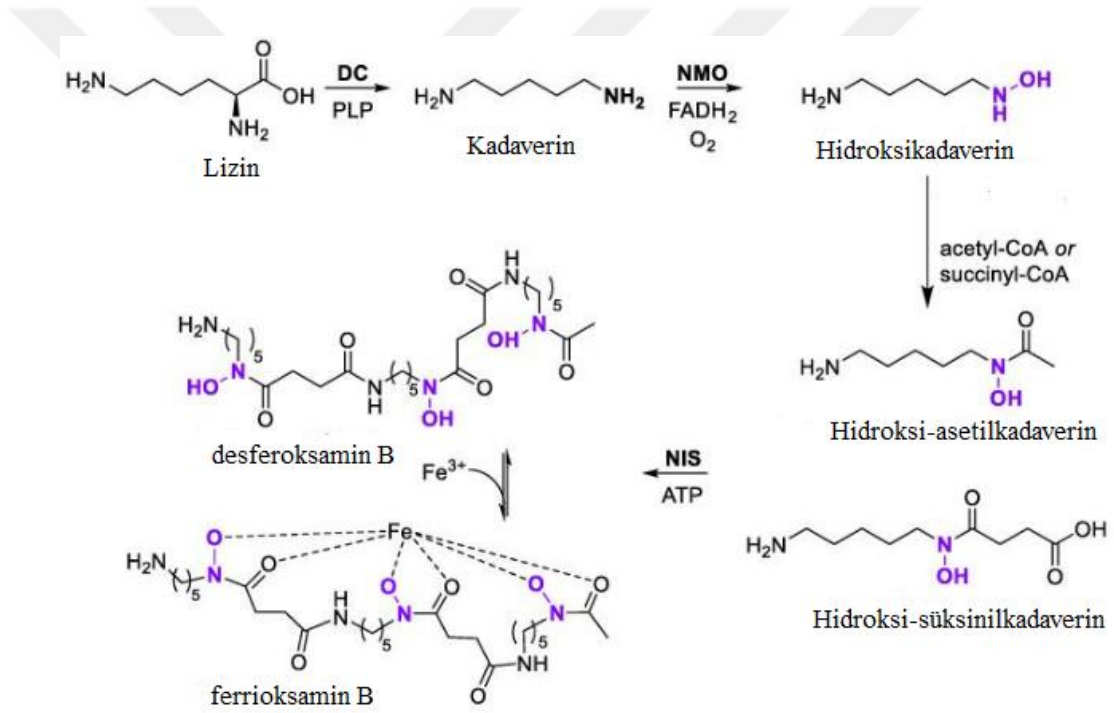
Şekil 2.8. Üretilen bazı siderofor türlerinin gösterimi (Holden ve Bachman, 2015)

Yapılarına bağlı olarak, sideroforlar katekolat ve hidroksamatlar olarak iki grupta sınıflandırılırken  $\alpha$ -hidroksikarboksilatlar ve tiyazolinler/oksazolinler gibi diğer sideroforlar eklendiğinde dört grupta açıklanmıştır (Schalk vd., 2011, Challis ve Hopwood, 2003). Sideroforlar, çoklu enzim ailesini içeren NRPS'ye bağımlı yol olarak da bilinen ribozomal olmayan peptit sentetaz (NRPS) tarafından da biyosentezlenmektedir. Ribozomal olmayan peptit sentetaz (NRPS) takımı incelenmiş ve farklı tipte sideroforlar için biyosentetik yollar araştırılmıştır. Hidroksamik asit bazı sideroforların biyosentetik platformu, amid bağları ile birleştirilmiş alternatif dikarboksilik asit ve diamin yapı taşları içerir. (Kadi ve Challis, 2009).

NRPS'ye bağlı yollarda nitrojen heterosiklik bazı sideroforlar, amino ve/veya aril asit yapı taşlarından birleştirilir (Felnagle vd., 2008). NRPS'deki tek veya birkaç polipeptit zincirinde yer alan amino asitlerin tanınması, karmaşık yapının aktifleşmesi için yeterlidir. Aminoasit yapısının tanınması NRPS modülü, adenilasyon (A) alanı karboksil grubunun adenilasyonunu katalize eder ve tiyolasyon (T) veya peptidil taşıyıcı protein (PCP) alanı, fosfopantethein kolunun tiyolünü kullanır. Bazı durumlarda TE alanı, alternatif alan redüktaz (R) alanı ile ikame edilir. Son

yoğunlaşma (C) alanı, tiyoesterin asilasyonunda yer alır. Bazı modüllerde C alanı, bir heterosiklizasyon (Cy) alanı ile değiştirilir (Kadi ve Challis, 2009).

NRPS'den bağımsız yollarda yapılan sınırlı araştırmalar,  $\alpha$ -hidroksikarboksilatlar ve hidroksamat tipi sideroforlar için bildirmiştir. Son araştırmalarda, aerobaktin biyosentezinde yer alan enzimlere benzer enzimleri içeren NRPS'den bağımsız yolak yoluyla birkaç sideroforun bir araya geldiği bilinmektedir. Biyosentetik yol, dış zar reseptörü ferrik-aerobaktini kodlayan ve bir sitrik asit, iki L-lizin, asetil-CoA ve oksijenden oluşan bir molekülden *iutA* geni ile *iucABCD* gen kümelerini içermektedir. Bir *IucA/IucC* homologunu kodlayan bir veya daha fazla genin varlığı, NRPS'den bağımsız biyosentetik gen kümelerinin ayırt edici özelliği olarak kabul edilmiştir (Challis, 2005).



Şekil 2.9. Desferrioksamin B üretiminin kimyasal sentez gösterimi (Mügge vd., 2020)

Hibrit NRPS/NIS yollarında ise desferrioksaminler, peptit olmayan hidroksamat siderofor gruplarının iyi bilinen üyesidir. *Streptomyces pilosus*'ta desferrioksamin B'nin biyosentezinde görev alan dört genli (*desA-D*) bir operondan oluşur (Barona-Gómez ve ark, 2004). Başlangıçta, L-lizinin dekarboksilasyonu, PLP'ye bağlı amino asit dekarboksilazlar (*desA*) ile kadaverin oluşumuna yol açar. Kadaverinde FAD-bağımlı amin monooksijenler (*desB*) ile N-hidroksikadaverin için hidroksillenir. Operonun tekrar dizisi, demir (II) bağımlı baskılayıcı görevi görür. Asetil CoA veya süksinil CoA (*desC*) ile gevşetilmiş CoA'ya bağımlı asil

transferazların aracılık ettiği asilasyonun, nükleotit trifosfata bağlı oligomerizasyon ve siklizasyon (*DesD*) aracılığıyla makrosikleye yol açan hidroksamik asit vermek üzere N-hidroksikadaverinin asilasyonunu katalize ettiği varsayılır (Barry ve Challis, 2009).

### **2.2.3. Desferrioksamin B'nin Bazı Biyoteknolojik Uygulama Alanları**

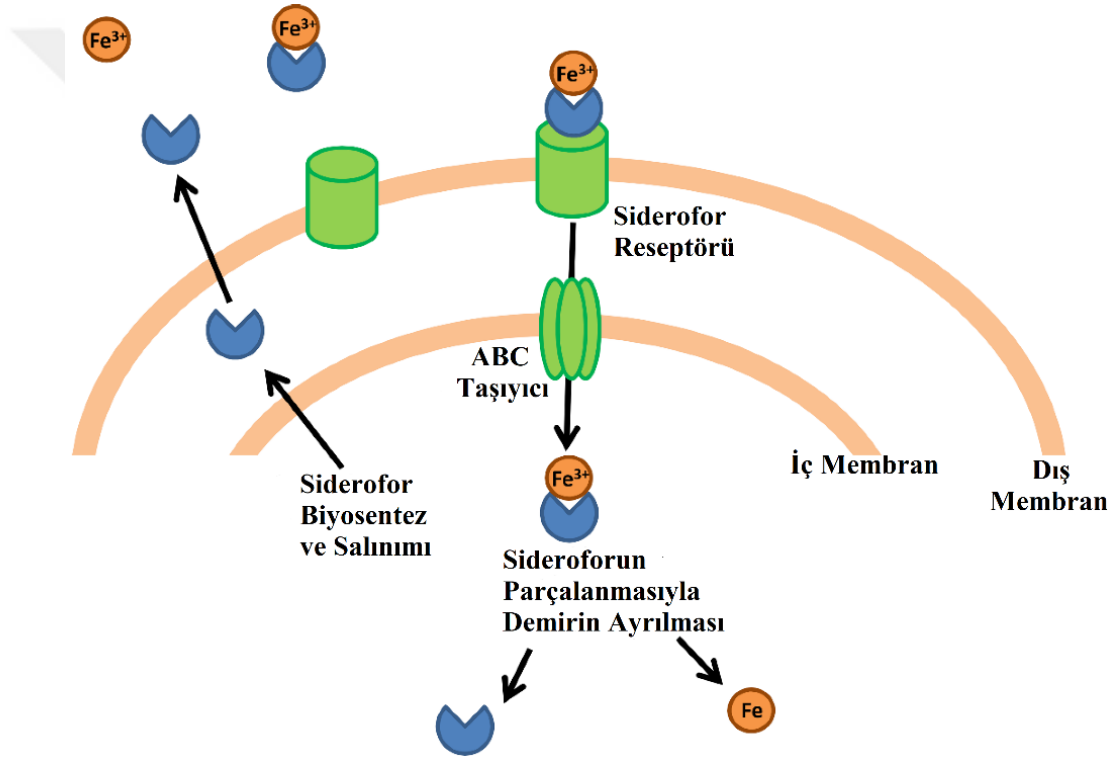
Son yıllarda desferrioksamin B, sağlık, evre, ziraat ve endüstriyel alanlar da dahil olmak üzere biyoteknolojinin birçok farklı bilim dalındaki öneminden dolayı geniş çapta araştırılmıştır. Desferrioksamin B'nin endüstriyel potansiyeli yüksek, kendisi küçük bir molekül olmasından dolayı sanayide kullanımı çok önemlidir (Crichton vd., 2019). DFOB'nin “şansı” uygun üretim ortamlarında ve maliyetlerinin az olmasındadır (Fan ve Fang, 2021; Bellotti ve Remelli, 2021). Sonuç olarak, DFOB'nin temel uygulama alanı, demir vücutta dengesiz dağılımı ve özellikle aşırı demir alımıyla ilgili hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Sonuç olarak, demirin vücudumuzdaki biyolojik yolların çoğunluğunda kullanılmasındaki önemi ve oksidatif stres süreçlerinde görev alması, DFOB'yi farklı terapötik ve teşhisi için çalışılabilir bir molekül olarak ön plana çıkmaktadır (Di Nicola vd., 2015). şelasyon tedavisi daha çok metal detoksifikasyonunda kullanılsa da, son yıllarda yapılan çalışmalar antioksidan, antikanser ve antimikrobiyal etkileri üzerinde de kullanılabileceğini göstermektedir.

#### **2.2.3.1. şelatlayıcı Ajan Olarak DFOB Kullanımı**

DFOB ve genel olarak şelatlayıcı ilaçlar, birçok insan hastalığına karşı koymak için ana, alternatif veya adjuvan tedavi olarak kullanılabilir. şelasyon tedavisi öncelikle metal detoksifikasyonunda uygulama bulur, ancak aynı zamanda umut verici antioksidan, antikanser ve antimikrobiyal etkiler de gösterebilir (Kontoghiorghes ve Kontoghiorghes, 2020). şelatlayıcı ajanlar içerisinde yer alan DFOB vb ilaçlar, birçok hastalığa karşı adjuvan türevi görev yaparak tedavide kullanılabilirler (Kontoghiorghes, 2020).

DFOB, çok farklı organlardaki işlev bozukluğundan dolayı aşırı demir yüklemesi sonucu biriken demiri ortamdan uzaklaştırmak için kullanılmıştır. DFOB'un Desferal® olarak bilinen mesilat tuzu, şu anda Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre “Temel İlaç” listesinde yer almaktadır. DFOB ilacının vücuttaki işlev mekanizması, öncelikle vasküler boşlukta Fe(III)'ü bağlamaktan sonra safra ya da idrar aracılığı ile ortamdan uzaklaştırılmasından oluşmaktadır (Hatcher vd., 2009). DFOB

üzerinden demir şelasyon uygulaması genel olarak transfüzyona bağımlı anemiler ( $\beta$ -talasemi ve orak hücreli anemi) ve transfüzyona bağılı olmayan (talasemi veya miyelodisplastik sendromlar) anemilerde kullanılmaktadır (Leitch, 2007). DFOB, demirin vücuttan uzaklaştırılmasındaki verimliliğini artırmak ve DFOB uygulamasından dolayı meydana gelen olumsuz etkileri azaltmak için diğer şelatlayıcı maddeler veya adjuvanlarla kombinasyon yapılarak kullanılır. Askorbik asit DFOB aracılı demirin atılmasında önemli bir rol oynar ve adjuvan tedavisinde standart olarak kullanılır. Birkaç çalışma, DFOB uygulamasında adjuvan olarak askorbik asit kullanımının demir atılımında önemli bir artışa (talasemi hastalarında %245'e kadar) neden olduğunu göstermiştir (Kontoghiorghes vd., 2020).



Şekil 2.10. Sideroforlar aracılığı ile demirin hücre içersine alınmasının gösterimi (Vinuesa ve McConnell, 2021)

#### 2.2.3.2. Antioksidan Olarak DFOB Kullanımı

DFOB organizmada çok fazla bulunan demir yoğunluğunun indirgemesinde rol oynamasına rağmen, diğer bir özelliği de oksijen radikalli türevlerinin demir katalizi ile oluşan yapının inhibisyonu ile ilgilidir. Bu sebeple, oksidatif stresin patofizyolojiye bilgi sağladığı çeşitli hastalıklarda uygulanabilir; örneğin, renal, hepatik (Hatcher vd., 2009), nörodejenaratif hastalıklar (Fine vd., 2017) ve kök hücrelerde oksidatif stres

kaynaklı apoptozu ortadan kaldırmaya aracılık edebilir (Khoshlahni vd., 2020). DFOB, kan-beyin bariyerini aşarak beyin farklı alanlarındaki aşırı demir yüklenmesini azaltan, umut vaat edici terapötik antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Crichton vd., 2019). Bu bilgiler ışığında yapılan hayvan deneylerinden elde edilen sonuçlara göre DFOB kullanımı ile nöroproteksiyonun ve hemorajik beyin hasarının azaltıldığı gösterilmiştir (Hu vd., 2019; Fine vd., 2017).

### 2.2.3.3. Antikanser Olarak DFOB Kullanımı

DFOB kanser hücrelerindeki demir iyonlarını bağlayarak antikanser aktiviteye sebep olur (Heskamp vd., 2017). Normalde demir, kanser hücresinin büyümesine ve çoğalmasına sebep olmasının yanı sıra hücrel birikimini, kanserin başlangıcını desteklediği görülmüştür (Bajbouj vd., 2018). Neticede, demir şelatörleri kanser kemopreventif ve kemoterapötik ajanlar olarak araştırılmıştır. DFOB, klinik güvenlik ve şelasyon tedavisinde kanıtlanmış faaliyetlerinden ötürü keşfedilen ilk molekül olmaktadır ve destekleyici antikanser tedavisi olarak denenmiştir. DNA sentezini etkilediği ve cilt kanseri, meme adeno ve hepatoselüler karsinom ile yumurtalık kanserinin ilerlemesini önlediği bildirilmiştir. Dolayısıyla, DFOB'nin düşük zar geçirgenliği ve kısa plazma yarı ömrü özellikleri, bu bileşiğin antikanser etken olarak kullanımını zorlaştırmaktadır (Wang vd., 20119).

Tablo 2.2. DFOB dışında kullanılan bazı antikanser sideroforlar (Pita-Grisanti vd., 2022)

| Siderofor             | 2D Yapı                              | Mikroorganizma                   | Araştırılan Kanser Türü                                                                                              |
|-----------------------|--------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Deferoxamine (DFO)    | PubChem ID: 2973                     | <i>Streptomyces spp</i>          | Makrofaj, lösemi, meme kanseri, hepatoselüler karsinom, mide kanseri, nöroblastoma, yumurtalık, epidermoid karsinom. |
| DFCAF (DFO kompleksi) | PubChem ID: 2973<br>PubChem ID: 2519 | <i>Streptomyces spp</i>          | Kanser kök hücreleri                                                                                                 |
| Deferritiosin (DFT)   | PubChem ID: 101609363                | <i>Streptomyces antibioticus</i> | Hepatoselüler karsinom                                                                                               |
| Amamistatin A         | PubChem ID: 135430484                | <i>Nocardia asteroides</i>       | Lösemi, meme, akciğer ve mide kanseri                                                                                |
| Amamistatin B         | PubChem ID: 135438025                | <i>Nocardia asteroides</i>       | Lösemi, meme, akciğer ve mide kanseri                                                                                |

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

Bu araştırmada kullanılan *Micromonospora craterilacus* NA12 (Ay vd., 2020), *Streptomyces* sp. MK37H (Ateş, 2019) ve *Nocardia* sp. GTS18 (Ay, 2016) mikroorganizmaları, daha önce yapılan çalışmalarla sırasıyla Nemrut Gölü, Antalya-Kumluca ve Gölcük Gölü bölgelerinden elde edilmiştir. 16S rRNA gen dizi analizi ile karakterizasyonu yapılan bu mikroorganizmalar sonraki çalışmalar için %20 (v/v) gliserol stok içerisinde -80°C koşulları altında muhafaza edilmiştir.

##### 3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Solüsyonlar

Planlanan çalışmada glikoz, sükroz, maltoz, kazein, pepton, maya özütü (Oxoid), sığır özütü (Oxoid), kalsiyum klorür dihidrat ( $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ), agar (Oxoid), malt özütü, kalsiyum karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ), nişasta, N-Z-Amin, tripton, sodyum klorit ( $\text{NaCl}$ ), hidroklorik asit ( $\text{HCl}$ ) Merck firması, krom azurol S (CAS), hekzadesiltrimetilamonyum (HDTMA), demir (III) klorür hekzahidrat ( $\text{FeCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$ ) ve standart desferrioksamin Sigma firmasına ait ürünler kullanılmıştır.

Çalışma içerisinde siderofor tespitinde kullanılacak olan solüsyonlar aşağıdaki bilgilere göre hazırlanmıştır.

**Solüsyon 1:** Kullanılacak tüm cam malzemelerin demirden arındırılması için 3 M HCl solüsyonu hazırlanmıştır.

- HCl (%35-37): 250 ml
- Distile su ( $\text{dH}_2\text{O}$ ): 750 ml

**Solüsyon 2:** CAS distile su içerisinde çözülmüştür.

- CAS: 121 mg
- $\text{dH}_2\text{O}$ : 100 ml

**Solüsyon 3:** HDTMA distile su içerisinde çözülmüştür. HDTMA deterjan özellikte olduğu için 55°C’ de 20 dakika inkübasyon yapılarak çözülmesi beklenmiştir.

- HDTMA: 729 mg
- $\text{dH}_2\text{O}$ : 400 ml

**Solüsyon 4:**  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , HCl solüsyonu içerisinde çözöldü.

- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ : 2,703 g
- HCL: 40 ml
- $\text{dH}_2\text{O}$ : 100 ml

**Solüsyon 5:** CAS-HDTMA solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyon kullanımdan önce 0.2  $\mu\text{m}$  filtreden geçirildi.

- 100 ml CAS solüsyonu
- 20 ml  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  solüsyonu
- 20 ml HDTMA solüsyonu iki solüsyonun üzerine yavaşça bırakılarak homojen hale gelmesi sağlandı. Bu karışım sonunda mavi renkli solüsyon elde edildi.

**Solüsyon 6:** Glukoz çözeltisi distile su içerisinde çözölmüştür.

- Glukoz: 8 g
- $\text{dH}_2\text{O}$ : 1000 ml

**Solüsyon 7:** Maltoz çözeltisi distile su içerisinde çözölmüştür.

- Maltoz: 8 g
- $\text{dH}_2\text{O}$ : 1000 ml

**Solüsyon 8:** Sükroz çözeltisi distile su içerisinde çözölmüştür.

- Sükroz: 8 g
- $\text{dH}_2\text{O}$ : 1000 ml

**Solüsyon 9:** Nişasta çözeltisi distile su içerisinde çözölmüştür.

- Nişasta: 8 g
- $\text{dH}_2\text{O}$ : 1000 ml

Solüsyon 6-7-8-9 hazırlandıktan sonra otoklavda 121 °C’ de 15 dakika sterilize edilmiştir.

### **3.1.3. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri**

**Besiyeri 1:** GPHF AGAR PH:7,2

- Glukoz: 10 g/l
- Pepton: 5 g/l
- Maya Özü: 5 g/l

- Sığır Özütü: 5 g/l
- CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O: 0.74 g/l
- Agar: 15 g/l
- Distile su: 1 l

**Besiyeri 2: GYM STREPTOMYCES AGAR PH: 7,2**

- Glukoz: 4 g/l
- Maya Özütü: 4 g/l
- Malt Özütü: 10 g/l
- CaCO<sub>3</sub>: 2 g/l
- Agar: 12 g/l
- Disitle su: 1 l

**Besiyeri 3: N-Z AMINE AGAR PH: 7,2**

- Glukoz: 10 g/l
- Nişasta: 20 g/l
- Maya Özütü: 5 g/l
- N-Z Amine: 5 g/l
- CaCO<sub>3</sub>: 1 g/l
- Agar: 15 g/l
- Distile su: 1 l

**Besiyeri 4: TRYPTONE YEAST EXTRACT AGAR (TYG) PH: 7,0**

- Tripton: 3 g/l
- Maya Özütü: 5 g/l
- Glukoz: 5 g/l
- Agar: 20 g/l
- Distile su: 1 l

**Besiyeri 5: LB (Luria-Bertani) BROTH PH: 7,0**

- Tripton: 10 g/l
- Maya Özütü: 5 g/l
- NaCl: 5 g/l
- CAS-HDTMA: 100 ml
- Distile su: 900 ml

**Besiyeri 6:** LB (Luria-Bertani) AGAR-CAS PH: 7,0

- Tripton: 10 g/l
- Maya Özütü: 5 g/l
- NaCl: 5 g/l
- CAS-HDTMA: 100 ml
- Agar: 20 g/l
- Distile su: 900 ml

**Besiyeri 7:** LB (Luria-Bertani) BROTH PH: 7,0

- Tripton: 10 g/l
- Maya Özütü: 5 g/l
- NaCl: 5 g/l
- \*: 4 g/l
- Distile su: 500 ml

\*: Glukoz, maltoz, sükroz veya nişasta

**Besiyeri 8:** TRYPTONE YEAST EXTRACT (TYG) BROTH PH: 7,0

- Tripton: 3 g/l
- Maya Özütü: 5 g/l
- \*: 4 g/l
- Distile su: 1 l

\*: Glukoz, maltoz, sükroz veya nişasta

Besiyeri 1-2-3-4-5 hazırlandıktan sonra otoklavda 121 °C’ de 15 dakika sterilize edilmiştir. CAS-HDTMA solüsyonu sterilizasyondan sonrası içerik 55-60°C’ye düştüğünde aseptik koşullar altında eklenmiştir. Sterilizasyondan sonra agarlar eşit hacimlerde petrilere aktarılırken sıvı besiyerleri 30 ml olacak şekilde steril erlenlere aktarılmıştır.

**3.1.4. Çalışmada Kullanılan Cihazlar**

- Santrifüj (Hettich ROTINA 35R)
- Otoklav (HIRAYAMA)
- İnkübatörler (SANYO, BINDER, JSR)
- Çalkamalı inkübatör (İNNOVA 4340)
- Otomatik pipetler (BRAND)

- Hassas terazi (Denver Instrument)
- pH ölçüm cihazı (WTW)
- Vorteks (VWR INTERNATIONAL)
- Buzdolabı (REGAL-BOSCH)
- Membran filtreler (Sartorius, Cellulose nitrat filter 11407 CAN 0,2 µm)
- Manyetik karıştırıcı (Chiltern)
- Derin dondurucu (Bosch)

### 3.2. Metot

#### 3.2.1. Desferrioksamin B Gen Kümelerinin Biyoinformatik Analizi

AntiSMASH aracı, belirli gen kümesi türleri için gizli Markov modelleri kullanarak, bilinen tüm kimyasal sınıfların sekonder metabolitlerini kodlayan gen kümelerini yüksek doğruluk oranı ile tanımlayabilmektedir. AntiSMASH, gen kümelerini tespit etmenin yanı sıra, aynı zamanda ayrıntılı dizi analiz sonuçlarını da verir. *Micromonospora craterilacus* NA12 (PRJNA224116), *Streptomyces* sp. MK37H (PRJNA224116), *Streptomyces* sp. BG9H (PRJNA224116), *Streptomyces* sp. NTH33 (PRJNA224116) ve *Nocardia* sp. GTS18 (PRJNA224116) izolatlarının tüm genom verileri NCBI GenBank'tan indirilerek antiSMASH web aracında (<https://antismash.secondarymetabolites.org>) bu izolatların sekonder metabolit kodlayan gen kümeleri belirlendi. Mikroorganizma sekanslarına ait kontig veriler web programında data yükleme alanına eklendi. Ardından biyosentetik gen kümelerinin tamamını tespit edebilmesi için küme algılama sıklığı bölümünde sıkı alanı işaretlendi ve verilerin analizi için web aracı çalıştırılarak sonuçlar analiz edildi (Blin vd., 2021).

#### 3.2.2. Mikroorganizmaların Üreme Koşullarına Göre Aktifleştirilmesi

Bu çalışmada kullanılan *Micromonospora craterilacus* NA12, *Streptomyces* sp. MK37H ve *Nocardia* sp. GTS18 mikroorganizmalarının aktifleşmesi için gliserol stoktan GPHF, GYM, N-Z ve TYG agarlara inokülasyon yapılarak petriyeler 28°C'de 4-7 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda mikroorganizmaların en iyi tutunma gösterdiği besiyeri ana besiyeri olarak seçildi ve sonraki çalışmalar bu besiyeri üzerinden devam etti.

### 3.2.3. Siderofor Üretiminin CAS Analizi ile Doğrulanması

Çalışmada siderofor üretimine ait tespit kalitatif ve kantitatif olarak yapılmıştır. CAS testi, sideroforun ferrik demire yüksek afinite göstermesinden dolayı siderofor varlığının tespitinde kullanılan başlıca yöntemdir.

#### 3.2.3.1. Kalitatif Test ile Siderofor Varlığının Gözlemlenmesi

LB-CAS agar hazırlandığında ferrik demir ile bağlanmasından dolayı mavi-yeşil renkte görülmektedir. Mikroorganizma gelişmesine bağlı olarak siderofor üretimi arttıkça reaksiyon meydana gelir ve mavi-yeşil renk sarı-turuncu renge döner (Arora ve Verma 2017).

Siderofor üretimi için tek koloni düşürülen *Micromonospora craterilacus* NA12, *Streptomyces sp.* MK37H ve *Nocardia sp.* GTS18 mikroorganizmalarından steril bir öze ile alınarak LB ve TYG Broth içerisinde inokülasyon yapıldı. İnokülasyonun ardından brothlar 28°C'de 4-7 gün çalkalamalı inkübatörde geliştirildi. İnküstasyonun ardından sıvı kültür vorteks yapıldıktan sonra 10 µl alınarak LB-CAS agarın orta noktasına damlatıldı. Agarın damlayı tamamen emmesi için 30 dakika bekletildi ve ardından 28°C'de 4-7 gün inküstasyona bırakıldı. İnküstasyon sonunda koloni oluşturan mikroorganizmaların çevresinde sarı-turuncu zon oluşturanlar siderofor üretimi yönünden olumlu olarak değerlendirildi.

#### 3.2.3.2. Kantitatif Test ile Siderofor Üretim Miktarının Hesaplanması

LB sıvı besiyeri içerisinde üretilen *Micromonospora craterilacus* NA12, *Streptomyces sp.* MK37H ve *Nocardia sp.* GTS18 mikroorganizmaları taze 30 ml LB sıvı besiyeri içerisinde 1/100 oranında eklendi ve 28°C'de 4-7 gün inküstasyona bırakıldı. Sideroforlar hücre dışına salınan moleküller olduğundan inküstasyon sonunda 1 ml hücre kültürü 2 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Ardından oda sıcaklığında 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj yapılarak hücre içeriklerinin çöktürülmesi ile elde edilen süpernatanttan 250 µl yeni 1.5 ml mikrosantrifüj tüpe aktarıldı. Üzerine 250 µl CAS-HDTMA solüsyonu ve CAS-siderfor bağlantısını arttırması için 5 µl 0,2 M sülfosalisilik asit solüsyonu eklendi. Tüm içerik hafifçe alt üst yapıldıktan sonra en az 5 dakika olacak şekilde karanlık alan içerisinde inküstasyon yapıldı. İlk başta mavi renkte olan CAS-HDTMA solüsyonu siderofor ile kompleks yapı oluşturdukça turuncu-mor renk açığa çıkarak CAS deneyi olumlu olarak değerlendirilmiştir (Schwyn ve Neilands, 1987).

CAS testinde renk değişimi görüldükten sonra siderofor üretim miktarı sideroforun 630 nm’de absorbans göstermesinden yararlanılarak spektrofotometrik ölçüm ile belirlendi. Ölçüm sonucunda numuneler körleme (Steril LB sıvı besiyeri + CAS-HDTMA solüsyonu + Sülfosalisilik asit) değer ile kıyaslanarak siderofor üretim yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı. Tüm deneyler en az 3 tekrar olacak şekilde uygulanmıştır (Arora ve Verma, 2017).

Siderofor Yüzde Hesabı;

$$\% \text{ Siderofor (SU)} = \frac{\text{Ar-As}}{\text{Ar}} \times 100 \quad (3.1)$$

Ar: Körleme Değeri ( $A_{630}$ )

As: Numune Değeri ( $A_{630}$ )’ e göre hesaplanmıştır.

### 3.2.4. Siderofor Üretiminde Gerekli Karbon Kaynakları ve Besiyerlerin Yanıt-Yüzey Yöntemi (RSM) Analizi

Yanıt yüzey metodolojisi, deneysel yöntemlere geçilmeden önce planlanan analizlerin azaltılarak optimum çalışma koşullarını belirlemeye yönelik bir dizi analizden oluşur (Lenth, 2009). Yöntem, toplanan verinin daha sonra ne yapılacağına yön vermek için kullanarak birkaç deney yapmayı içerir. Sonraki adımda ise, deneyin farklı varyasyonlarına odaklanarak bir dizi model oluşturmak veya bulduğumuz şeyi doğrulamak için mevcut deneysel bölgede daha fazla veri toplamak için kullanılabilir. Bir dizi deney oluşturabilmek için besiyeri içerikleri, pH ve inkübasyon süreleri gibi verilerden yararlanarak Tablo 3.1’de gösterildiği gibi analiz tablosu oluşturulmuştur. Yanıt yüzey metodolojisi RStudio- package: »rsm» paketi ile EK.1’de açıklanan kodlar kullanılarak grafik oluşturulmuştur (RStudio Team 2020).

Tablo 3. 1 Yüzey yanıt yöntemi analizinde kullanılan optimizasyon tablosu

| Deney | Süre | pH  | Trypton | NaCl | Maya Özü | Glikoz | Nişasta | Sükroz | Maltoz |
|-------|------|-----|---------|------|----------|--------|---------|--------|--------|
| 1     | 7    | 7,2 | 3       | 0    | 5        | 5      | 0       | 0      | 0      |
| 2     | 7    | 7,2 | 3       | 0    | 5        | 0      | 5       | 0      | 0      |
| 3     | 7    | 7,2 | 3       | 0    | 5        | 0      | 0       | 5      | 0      |
| 4     | 7    | 7,2 | 3       | 0    | 5        | 0      | 0       | 0      | 5      |
| 5     | 7    | 7   | 10      | 5    | 5        | 5      | 0       | 0      | 0      |
| 6     | 7    | 7   | 10      | 5    | 5        | 0      | 5       | 0      | 0      |
| 7     | 7    | 7   | 10      | 5    | 5        | 0      | 0       | 5      | 0      |
| 8     | 7    | 7   | 10      | 5    | 5        | 0      | 0       | 0      | 5      |

### 3.2.5. Siderofor Üretiminde Gerekli Karbon Kaynaklarının Belirlenmesi

Mikroorganizmaların siderofor üretmelerinde önemli bir faktör, kullandıkları karbon kaynağıdır. Farklı karbon kaynaklarının siderofor üretimine etkisini incelemek için glukoz, nişasta, maltoz ve sükroz litre 4 g olacak şekilde LB ve TYG sıvı besiyeri hazırlandı. Ön kültüre edilmiş mikroorganizmalardan demir içermeyen besiyerlerine 1/100 oranında olacak şekilde eklendi. Ardından sıvı kültürler çalkalamalı inkübatöre konularak 28°C’ de 4-7 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda sıvı kültür ortamından 1 ml alınarak oda sıcaklığında 10.000 rpm’de 5 dk santrifüj yapıldı. Süpernatanttan 250 µl yeni 1.5 ml mikrosantrifüj tüpe aktarıldı. Üzerine 250 µl CAS-HDTMA solüsyonu ve CAS-siderofor bağlantısını arttırması için 5 µl 0,2M sülfosalisilik asit solüsyonu eklendi. Tüm içerik hafifçe alt üst yapıldıktan sonra en az 5 dakika olacak şekilde karanlık alanda inkübasyona bırakıldı. Deney sonucunda numuneler spektrofotometre cihazında 630 nm’de ölçülerek siderofor üretme yüzdesi hesaplanmıştır. Tüm deneyler üç tekrar olacak şekilde uygulanmıştır. Çalışma planı aşağıdaki tabloya göre yapılmıştır.

Tablo 3. 2 Karbon kaynağı kullanımının tablo şeklinde gösterimi

| Mikroorganizma | Karbon Kaynağı X3 |        |        |         |
|----------------|-------------------|--------|--------|---------|
| NA12           | Glukoz            | Maltoz | Sükroz | Nişasta |
| MK37H          | Glukoz            | Maltoz | Sükroz | Nişasta |
| GTS18          | Glukoz            | Maltoz | Sükroz | Nişasta |
| NA12+GTS18     | Glukoz            | Maltoz | Sükroz | Nişasta |
| MK37H+GTS18    | Glukoz            | Maltoz | Sükroz | Nişasta |

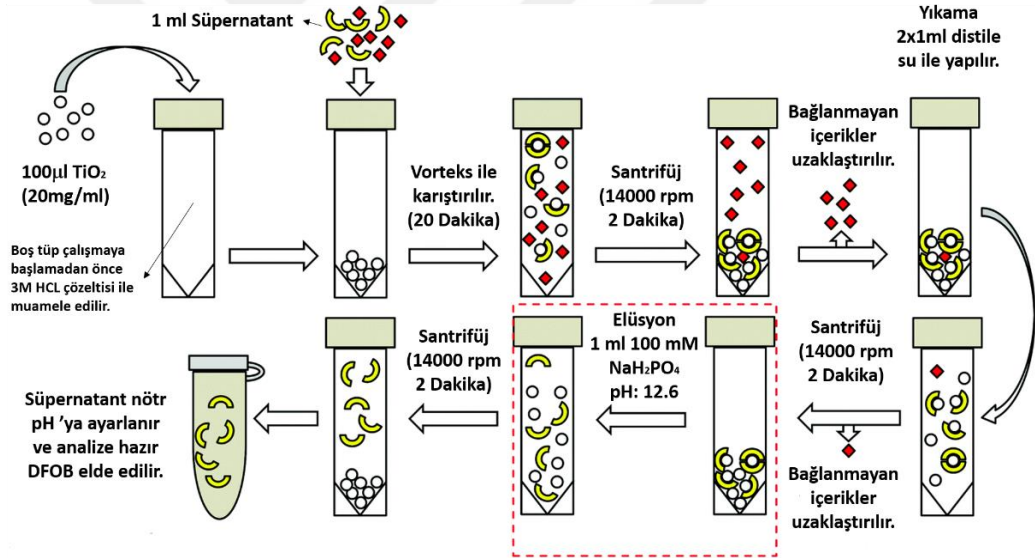
### 3.2.6. Desferrioksamin B Ekstraksiyonu

Hidroksamat grubundan olan Desferrioksamin B sideroforu için nanopartikül ekstraksiyon metodu uygulanmıştır.

#### 3.2.6.1. Titanyum Dioksit (TiO<sub>2</sub>) Nanopartikül ile Desferrioksamin B (DFOB) Ekstraksiyonu

Ön kültüre edilmiş mikroorganizmalardan 1.5 ml alınarak 14000 rpm’de 2 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda hücre içermeyen süpernatanttan 1 ml yeni 1.5 ml mikrosantrifüj tüpe aktarıldı. Üzerine 100 µl TiO<sub>2</sub> (20 mg/ml) eklendi.

Ardından 20 dakika vorteks karıştırıcı ile muamele edildi. Bu aşamada hidrosamat grubu siderofor olan DFOB nanopartikül ile etkileşime girerek  $\text{TiO}_2$ -DFOB kompleksi oluşturur. Vorteks işlemi sonucunda kompleks, 14000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapılarak pellet haline geçmesi sağlandı. Ardından 1 ml distile su ile iki defa yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işleminde santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılır. Üzerine 1 ml distile su eklenir ve karıştırıcı ile 3 dakika muamele edilir. Ardından tekrar 14000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapılarak pellet edilir. Pellet üzerine tekrar 1 ml distile su eklenir ve karıştırıcı ile 3 dakika uygulama yapılır. Uygulama sonunda 14000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapılarak pellete dokunmadan tüp içerisinde süpernatant kalmayacak şekilde uzaklaştırılır. Pellet üzerine 1 ml elüsyon solüsyonu (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH: 12.6) eklenir ve 3 dakika karıştırıcıda uygulama yapılır. Ardından 14000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapılarak süpernatant yeni 1.5 ml mikrosantrifüj tüpe aktarılırak DFOB elde edilmiştir (Egbers vd., 2020).



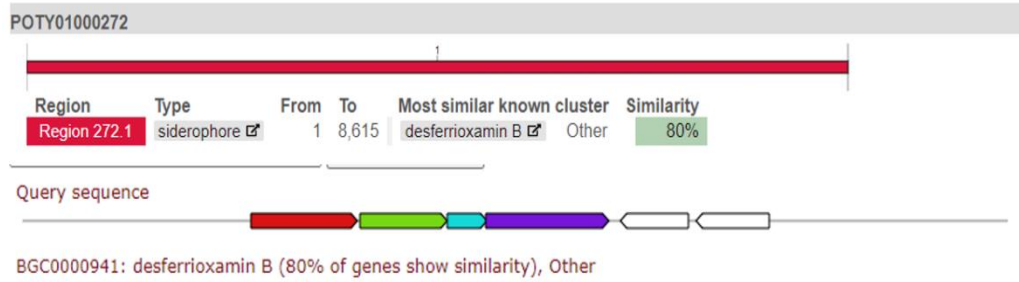
Şekil 3.1. Desferrioksamin B sideroforunun nanopartikül ile ekstraksiyonu (Egbers vd., 2020)

Elde edilen Desferrioksamin B'nin miktarı standart desferrioksamin ile kontrol edildi. Sigmadan satın alınan desferrioksamin öncelikle distile su ile 20 mg/ml olacak şekilde sulandırıldı. Ardından desferrioksamin ana stoğundan 2 mg, 1 mg ve 0.5 mg olacak şekilde seri sulandırmalar yapıldı. Sonrasında CAS testi uygulanarak 630 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Ölçüm sonunda elde edilen değerler Excel programında hazırlanan eğri ile hesaplanmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Biyoinformatik Analiz

Bilgisayar ve yeni nesil dizileme teknolojilerinin gelişmesi ile birlikte dizi verisinden üretilen biyosentetik gen kümelerinin tahmin edilmesi ile üretilen sekonder metabolitlerin keşifleri giderek artmaktadır. Çalışmamızın planlanma aşamasında projede kullanılabilecek mikroorganizmalar antiSMASH programı ile incelendiğinde NA12 mikroorganizmasının Desferrioksamin B gen kümesine % 80 oranında benzerlik gösteren bir gen kümesine sahip olduğu (Şekil 4.1) görülürken MK37H için bu oran % 100 olarak tespit edilmiştir ve Şekil 4.2’de gösterilmiştir. GTS18, NTH33 ve BG9H için genom analizi sonucunda Desferrioksamin B sideroforunun üretimi için gerekli genlere sahip olmadığı görülmüştür (Tablo 4.3,4,5).



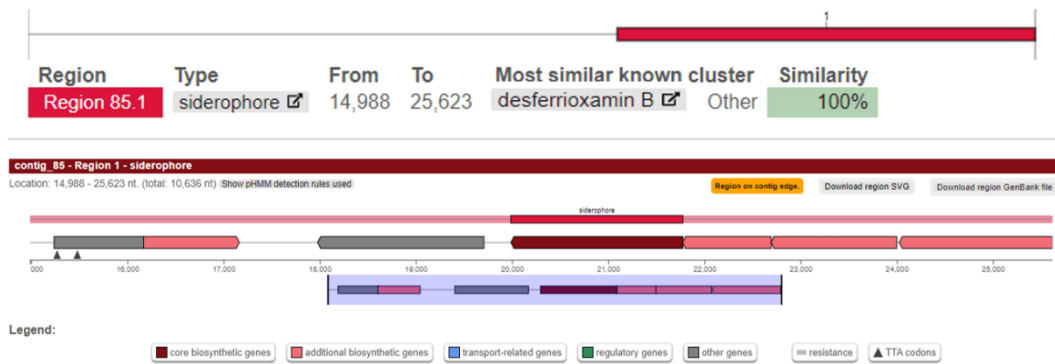
Şekil 4. 1 *Micromonospora craterilacus* NA12 mikroorganizmasından Desferrioksamin B sideroforunun biyoinformatik yöntemlerin kullanılması ile elde edilen sonucun gösterimi

Tablo 4.1. *Micromonospora craterilacus* NA12 genomundan antiSMASH programı ile tahmin edilen diğer sekonder metabolitlerin gösterimi

| Bölge       | Metabolit Tipi                  | En İyi Sınıflandırma |                                                                            | Benzerlik (%) |
|-------------|---------------------------------|----------------------|----------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Bölge 272.1 | siderofor                       | desferrioxamin B     | Other                                                                      | 80%           |
| Bölge 1.1   | T1PKS, oligosaccharide, terpene | calicheamicin        | Polyketide                                                                 | 66%           |
| Bölge 43.1  | terpene                         | carotenoid           | Terpene                                                                    | 27%           |
| Bölge 49.1  | NRPS                            | coelibactin          | NRP                                                                        | 27%           |
| Bölge 57.1  | NRPS                            | tallysomicin A       | NRP:Glycopeptide + Polyketide:Modular type I + Saccharide:Hybrid/tailoring | 22%           |
| Bölge 94.1  | NRPS                            | scabichelin          | NRP                                                                        | 20%           |
| Bölge 152.1 | T2PKS                           | xantholipin          | Polyketide                                                                 | 14%           |

Tablo 4.1 (devam)

|                    |                        |                  |                                                                                           |           |
|--------------------|------------------------|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Bölge 3.1</b>   | <b>NRPS,T1P<br/>KS</b> | <b>bleomycin</b> | <b>NRP:Glycopeptide +<br/>Polyketide:Modular type I +<br/>Saccharide:Hybrid/tailoring</b> | <b>9%</b> |
| <b>Bölge 158.1</b> | T1PKS                  | ebelactone       | Polyketide                                                                                | 8%        |
| <b>Bölge 181.1</b> | NRPS                   | tallysomicin A   | NRP:Glycopeptide +<br>Polyketide:Modular type I +<br>Saccharide:Hybrid/tailoring          | 7%        |
| <b>Bölge 19.1</b>  | terpene                | sisomicin        | Saccharide                                                                                | 5%        |
| <b>Bölge 231.1</b> | NRPS                   | kedarcidin       | Polyketide:Iterative type I +<br>Polyketide:Enediyne type I                               | 3%        |
| <b>Bölge 11.1</b>  | NAGGN                  | -                | -                                                                                         | -         |
| <b>Bölge 16.1</b>  | terpene                | -                | -                                                                                         | -         |
| <b>Bölge 17.1</b>  | other                  | -                | -                                                                                         | -         |
| <b>Bölge 25.1</b>  | NRPS                   | -                | -                                                                                         | -         |
| <b>Bölge 44.1</b>  | NRPS                   | -                | -                                                                                         | -         |
| <b>Bölge 61.1</b>  | NRPS                   | -                | -                                                                                         | -         |
| <b>Bölge 77.1</b>  | LAP,thiopeptide        | -                | -                                                                                         | -         |
| <b>Bölge 174.1</b> | lanthipeptide-class-i  | -                | -                                                                                         | -         |
| <b>Bölge 277.1</b> | terpene                | -                | -                                                                                         | -         |



Şekil 4.2. *Streptomyces* sp. MK37H mikroorganizmasından Desferrioksamin B sideroforunun biyoinformatik yöntemlerin kullanılması ile elde edilen sonucun gösterimi

Tablo 4. 2 *Streptomyces* sp. MK37H genomundan antiSMASH programı ile tahmin edilen diğer sekonder metabolitlerin gösterimi

| Bölge       | Metabolit Tipi        | En İyi Sınıflandırma                                                       |                             | Benzerlik (%) |
|-------------|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|---------------|
| Bölge 85.1  | siderofor             | desferrioxamine B                                                          | Other                       | 100%          |
| Bölge 39.1  | butyrolactone,T3PKS   | germicidin                                                                 | Other                       | 100%          |
| Bölge 54.1  | terpene               | 2-methylisoborneol                                                         | Terpene                     | 100%          |
| Bölge 71.1  | terpene               | pristinol                                                                  | Terpene                     | 100%          |
| Bölge 169.1 | terpene               | geosmin                                                                    | Terpene                     | 100%          |
| Bölge 514.1 | T1PKS                 | angolamycin                                                                | Polyketide                  | 100%          |
| Bölge 68.1  | T1PKS                 | nigericin                                                                  | Polyketide:Modular type I   | 83%           |
| Bölge 4.1   | NRPS                  | bezastatin derivatives                                                     | Alkaloid                    | 80%           |
| Bölge 151.1 | T3PKS,NRPS            | feglymycin                                                                 | NRP                         | 78%           |
| Bölge 325.1 | ectoine               | ectoine                                                                    | Other                       | 75%           |
| Bölge 13.1  | T1PKS                 | azalomycin F3a                                                             | Polyketide                  | 60%           |
| Bölge 10.1  | T1PKS                 | ECO-02301                                                                  | Polyketide                  | 57%           |
| Bölge 55.1  | indole                | 5-isoprenylindole-3-carboxylate $\beta$ -D-glycosyl ester                  | Other                       | 57%           |
| Bölge 388.1 | T1PKS                 | nigericin                                                                  | Polyketide:Modular type I   | 55%           |
| Bölge 23.1  | T1PKS                 | mediomycin A                                                               | Polyketide                  | 50%           |
| Bölge 84.1  | T1PKS                 | elaiophylin                                                                | Polyketide                  | 50%           |
| Bölge 332.1 | T2PKS                 | spore pigment                                                              | Polyketide                  | 41%           |
| Bölge 12.1  | T1PKS                 | X-14547                                                                    | Polyketide                  | 39%           |
| Bölge 62.1  | T1PKS                 | nigericin                                                                  | Polyketide:Modular type I   | 38%           |
| Bölge 459.1 | terpene               | hopene                                                                     | Terpene                     | 38%           |
| Bölge 112.1 | T1PKS                 | elaiophylin                                                                | Polyketide                  | 37%           |
| Bölge 289.1 | ladderane,arylpolyene | atratumycin                                                                | NRP                         | 34%           |
| Bölge 38.1  | amglyccycl            | validamycin A                                                              | Polyketide + Other:Cyclitol | 33%           |
| Bölge 269.1 | T1PKS                 | ECO-02301                                                                  | Polyketide                  | 32%           |
| Bölge 552.1 | T1PKS                 | ECO-02301                                                                  | Polyketide                  | 32%           |
| Bölge 128.1 | T1PKS                 | mediomycin A                                                               | Polyketide                  | 28%           |
| Bölge 118.1 | NRPS,aminocoumarin    | cysteoamide                                                                | NRP                         | 27%           |
| Bölge 21.1  | T1PKS                 | nocardiopsin A /<br>nocardiopsin B /<br>nocardiopsin C /<br>nocardiopsin D | NRP + Polyketide            | 26%           |
| Bölge 165.1 | T1PKS                 | aculeximycin                                                               | Polyketide                  | 23%           |
| Bölge 675.1 | terpene               | hopene                                                                     | Terpene                     | 23%           |
| Bölge 44.1  | T1PKS                 | concanamycin A                                                             | Polyketide                  | 21%           |
| Bölge 91.1  | redox-cofactor        | lankacidin C                                                               | NRP + Polyketide            | 20%           |

Tablo 4.2 (devam)

|                    |                        |                                                                                                              |                                                                |     |
|--------------------|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Bölge 223.1</b> | terpene                | BE-43547A1 /<br>BE-43547A2 /<br>BE-43547B1 /<br>BE-43547B2 /<br>BE-43547B3 /<br>BE-43547C1 /<br>BE-43547C2   | NRP: Cyclic<br>depsipeptide +<br>Polyketide:<br>Modular type I | 20% |
| <b>Bölge 293.1</b> | T1PKS                  | mycinamicin II                                                                                               | Polyketide                                                     | 19% |
| <b>Bölge 297.1</b> | T1PKS                  | divergolide A /<br>divergolide B /<br>divergolide C /<br>divergolide D                                       | Polyketide:<br>Modular type I                                  | 17% |
| <b>Bölge 292.1</b> | T1PKS                  | salinomycin                                                                                                  | Polyketide:<br>Modular type I                                  | 16% |
| <b>Bölge 377.1</b> | NRPS                   | marformycin A /<br>marformycin B /<br>marformycin C /<br>marformycin D /<br>marformycin E /<br>marformycin F | NRP                                                            | 12% |
| <b>Bölge 43.1</b>  | T1PKS                  | nargenicin                                                                                                   | Polyketide                                                     | 11% |
| <b>Bölge 283.1</b> | T1PKS                  | cyphomycin                                                                                                   | Polyketide                                                     | 11% |
| <b>Bölge 2.1</b>   | butyrolactone          | cyphomycin                                                                                                   | Polyketide                                                     | 9%  |
| <b>Bölge 124.1</b> | T1PKS,hglE-KS          | sanglifehrin A                                                                                               | NRP + Polyketide                                               | 9%  |
| <b>Bölge 176.1</b> | lanthipeptide-class-ii | reveromycin A                                                                                                | Polyketide                                                     | 9%  |
| <b>Bölge 411.1</b> | T1PKS                  | tautomycetin                                                                                                 | Polyketide:<br>Modular type I                                  | 9%  |
| <b>Bölge 396.1</b> | terpene                | tianciltactone                                                                                               | Terpene                                                        | 8%  |
| <b>Bölge 329.1</b> | ladderane,arylpolylene | atratumycin                                                                                                  | NRP                                                            | 7%  |
| <b>Bölge 412.1</b> | NRPS                   | glycinocin A                                                                                                 | NRP                                                            | 6%  |
| <b>Bölge 614.1</b> | other                  | coumermycin<br>A1                                                                                            | Saccharide:<br>Hybrid/tailoring +<br>Other:<br>Aminocoumarin   | 6%  |
| <b>Bölge 4.2</b>   | terpene                | -                                                                                                            | -                                                              | -   |
| <b>Bölge 9.1</b>   | T1PKS                  | -                                                                                                            | -                                                              | -   |
| <b>Bölge 14.1</b>  | lassopeptide           | -                                                                                                            | -                                                              | -   |
| <b>Bölge 32.1</b>  | NRPS                   | -                                                                                                            | -                                                              | -   |
| <b>Bölge 57.1</b>  | terpene                | -                                                                                                            | -                                                              | -   |
| <b>Bölge 97.1</b>  | butyrolactone          | -                                                                                                            | -                                                              | -   |
| <b>Bölge 227.1</b> | lassopeptide           | -                                                                                                            | -                                                              | -   |
| <b>Bölge 238.1</b> | siderophore            | -                                                                                                            | -                                                              | -   |
| <b>Bölge 261.1</b> | T1PKS,NRPS             | -                                                                                                            | -                                                              | -   |
| <b>Bölge 265.1</b> | RiPP-like              | -                                                                                                            | -                                                              | -   |
| <b>Bölge 278.1</b> | hserlactone            | -                                                                                                            | -                                                              | -   |
| <b>Bölge 326.1</b> | NRPS                   | -                                                                                                            | -                                                              | -   |
| <b>Bölge 328.1</b> | siderophore            | -                                                                                                            | -                                                              | -   |
| <b>Bölge 366.1</b> | T1PKS                  | -                                                                                                            | -                                                              | -   |

Tablo 4.2 (devam)

|                    |              |   |   |   |
|--------------------|--------------|---|---|---|
| <b>Bölge 392.1</b> | <b>T1PKS</b> | - | - | - |
| <b>Bölge 407.1</b> | T1PKS        | - | - | - |
| <b>Bölge 415.1</b> | RiPP-like    | - | - | - |
| <b>Bölge 476.1</b> | T1PKS        | - | - | - |
| <b>Bölge 478.1</b> | T1PKS        | - | - | - |
| <b>Bölge 538.1</b> | NRPS         | - | - | - |
| <b>Bölge 542.1</b> | T1PKS        | - | - | - |
| <b>Bölge 599.1</b> | T1PKS        | - | - | - |
| <b>Bölge 619.1</b> | T1PKS        | - | - | - |
| <b>Bölge 671.1</b> | T1PKS        | - | - | - |
| <b>Bölge 718.1</b> | T1PKS        | - | - | - |
| <b>Bölge 739.1</b> | NRPS         | - | - | - |
| <b>Bölge 746.1</b> | NRPS         | - | - | - |

Tablo 4.3. *Nocardia* sp. GTS18 genomundan antiSMASH programı ile tahmin edilen sekonder metabolitlerinin gösterimi

| <b>Bölge</b>      | <b>Metabolit Tipi</b>                  | <b>En İyi Sınıflandırma</b>                                                                                                                                   |                  | <b>Benzerlik (%)</b> |
|-------------------|----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|----------------------|
| <b>Bölge 1.3</b>  | ectoine                                | ectoine                                                                                                                                                       | Other            | 100%                 |
| <b>Bölge 16.1</b> | NAPAA                                  | $\epsilon$ -Poly-L-lysine                                                                                                                                     | NRP              | 100%                 |
| <b>Bölge 5.1</b>  | NRP-metallophore, NRPS, terpene, T1PKS | nocobactin NA/nocobactin NA 10152B                                                                                                                            | NRP+Polyketide   | 87%                  |
| <b>Bölge 2.1</b>  | aminopolycarboxylic acid               | EDHA                                                                                                                                                          | Other            | 77%                  |
| <b>Bölge 9.1</b>  | NRP-metallophore, NRPS                 | heterobactin B/heterobactin S2                                                                                                                                | NRP              | 72%                  |
| <b>Bölge 29.1</b> | terpene                                | isorenieratene                                                                                                                                                | Terpene          | 42%                  |
| <b>Bölge 7.1</b>  | NRPS, ranthipeptide                    | corynecine III/corynecine I/corynecine II                                                                                                                     | Other            | 40%                  |
| <b>Bölge 28.1</b> | T3PKS                                  | 5-acetyl-5,10-dihydrophenazine-1-carboxylic acid/5-(2-hydroxyacetyl)-5,10-dihydrophenazine-1-carboxylic acid/endophenazine A1/endophenazine F/endophenazine G | Other: Phenazine | 26%                  |
| <b>Bölge 1.2</b>  | terpene                                | isorenieratene                                                                                                                                                | Terpene          | 25%                  |
| <b>Bölge 33.1</b> | T1PKS, butyrolactone                   | rosamicin/salinipyron A/pacifiganone A                                                                                                                        | Polyketide       | 21%                  |
| <b>Bölge 1.1</b>  | NRPS                                   | pentalenolactone                                                                                                                                              | Terpene          | 15%                  |
| <b>Bölge 10.2</b> | terpene                                | legonindolizidine A6                                                                                                                                          | NRP+Alkaloid     | 12%                  |

Tablo 4.3 (devam)

|                   |                           |                                                                                                                                   |                                    |     |
|-------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----|
| <b>Bölge 17.1</b> | hglE-<br>KS,betalactone   | frankobactin<br>A1/frankobactin<br>A2/frankobactin<br>A3/frankobactin<br>B1/frankobactin<br>B2/frankobactin<br>B3/frankobactin C1 | NRP                                | 12% |
| <b>Bölge 60.1</b> | NRP-<br>metallophore,NRPS | cahuitamycin<br>A/cahuitamycin<br>B/cahuitamycin C                                                                                | NRP                                | 12% |
| <b>Bölge 4.1</b>  | T3PKS                     | madurastatin<br>A2/madurastatin<br>E1/madurastatin<br>F/madurastatin<br>G1/madurastatin A1                                        | NRP                                | 11% |
| <b>Bölge 12.1</b> | butyrolactone             | WS-5995 D/WS-5995<br>B/WS-5995 C/SEK<br>43                                                                                        | Polyketide                         | 8%  |
| <b>Bölge 1.4</b>  | NRPS                      | thiocoraline                                                                                                                      | NRP:Cycli<br>c<br>depsipeptid<br>e | 7%  |
| <b>Bölge 3.1</b>  | NRPS                      | isoindolinomycin                                                                                                                  | Polyketide                         | 7%  |
| <b>Bölge 20.1</b> | NRPS                      | lasalocid                                                                                                                         | Polyketide                         | 5%  |
| <b>Bölge 53.1</b> | NRPS                      | glycinocin A                                                                                                                      | NRP                                | 4%  |
| <b>Bölge 6.1</b>  | NRPS                      | -                                                                                                                                 | -                                  | -   |
| <b>Bölge 6.2</b>  | T1PKS                     | -                                                                                                                                 | -                                  | -   |
| <b>Bölge 10.1</b> | arylpolyene               | -                                                                                                                                 | -                                  | -   |
| <b>Bölge 14.1</b> | terpene                   | -                                                                                                                                 | -                                  | -   |
| <b>Bölge 44.1</b> | T1PKS                     | -                                                                                                                                 | -                                  | -   |
| <b>Bölge 50.1</b> | NRPS                      | -                                                                                                                                 | -                                  | -   |
| <b>Bölge 55.1</b> | T1PKS                     | -                                                                                                                                 | -                                  | -   |
| <b>Bölge 71.1</b> | NRPS                      | -                                                                                                                                 | -                                  | -   |

Tablo 4. 4 *Streptomyces* sp. BG9H genomundan antiSMASH programı ile tahmin edilen sekonder metabolitlerinin gösterimi

| <b>Bölge</b>       | <b>Metabolit Tipi</b> | <b>En İyi Sınıflandırma</b>               |               | <b>Benzerlik</b> |
|--------------------|-----------------------|-------------------------------------------|---------------|------------------|
| <b>Bölge 22.1</b>  | ectoine               | ectoine                                   | Other:Ectoine | 100%             |
| <b>Bölge 60.1</b>  | terpene               | albaflavenone                             | Terpene       | 100%             |
| <b>Bölge 180.1</b> | T3PKS                 | alkylresorcinol                           | Polyketide    | 100%             |
| <b>Bölge 615.1</b> | terpene               | geosmin                                   | Terpene       | 100%             |
| <b>Bölge 727.1</b> | terpene               | 2-<br>methylisoborne<br>ol                | Terpene       | 100%             |
| <b>Bölge 734.1</b> | NRPS                  | rhizomide<br>A/rhizomide<br>B/rhizomide C | NRP           | 100%             |

Tablo 4.4 (devam)

|                    |                           |                                                                       |                                    |     |
|--------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----|
| <b>Bölge 23.1</b>  | terpene                   | hopene                                                                | Terpene                            | 84% |
| <b>Bölge 536.1</b> | lassopeptide              | citrulassin D                                                         | RiPP                               | 80% |
| <b>Bölge 70.1</b>  | NI-siderophore            | FW0622                                                                | Other                              | 62% |
| <b>Bölge 181.1</b> | NRPS                      | incarnatapeptin A/incarnatapeptin B/dentigerumycin F/dentigerumycin G | Polyketide+NRP                     | 50% |
| <b>Bölge 184.1</b> | lassopeptide              | ulleungdin                                                            | RiPP:Lassopeptide                  | 50% |
| <b>Bölge 18.1</b>  | phosphonate               | rhizoctin A                                                           | Other                              | 42% |
| <b>Bölge 106.1</b> | T3PKS,NRPS                | corbomycin                                                            | NRP                                | 40% |
| <b>Bölge 211.1</b> | T1PKS                     | azalomycin F3a                                                        | Polyketide                         | 34% |
| <b>Bölge 7.1</b>   | NRPS                      | corbomycin                                                            | NRP                                | 33% |
| <b>Bölge 16.1</b>  | arylpolyene,ladderane     | skyllamycin A/skylamycin B                                            | Polyketide+NRP:Cyclic depsipeptide | 32% |
| <b>Bölge 8.1</b>   | NI-siderophore            | schizokinen                                                           | Other                              | 30% |
| <b>Bölge 4.1</b>   | T1PKS,NRPS                | s56-p1                                                                | NRP                                | 29% |
| <b>Bölge 127.1</b> | T3PKS                     | violapyrone B                                                         | Polyketide                         | 28% |
| <b>Bölge 1.1</b>   | T1PKS,butyrolactone,other | tambjamine BE-18591                                                   | Alkaloid+Polyketide                | 21% |
| <b>Bölge 123.1</b> | T1PKS                     | X-14547                                                               | Polyketide                         | 21% |
| <b>Bölge 145.1</b> | NRPS,other                | aurantimycin A                                                        | NRP+Polyketide                     | 20% |
| <b>Bölge 98.1</b>  | other,NRPS                | polyoxypeptin                                                         | NRP+Polyketide                     | 16% |
| <b>Bölge 270.1</b> | T2PKS                     | aureonuclemycin                                                       | Polyketide                         | 14% |
| <b>Bölge 139.1</b> | NRPS                      | tyrobetaine                                                           | NRP                                | 13% |
| <b>Bölge 351.1</b> | T1PKS                     | polyoxypeptin                                                         | NRP+Polyketide                     | 13% |
| <b>Bölge 72.1</b>  | NRPS,terpene              | pentalenolactone                                                      | Terpene                            | 11% |
| <b>Bölge 12.1</b>  | NRPS                      | coprisamide C/coprisamide D                                           | NRP                                | 8%  |
| <b>Bölge 250.1</b> | NRPS                      | aurantimycin A                                                        | NRP+Polyketide                     | 8%  |
| <b>Bölge 460.1</b> | NRPS                      | decaplanin                                                            | NRP:Glycopeptide                   | 8%  |

Tablo 4.4 (devam)

|                    |                |            |            |    |
|--------------------|----------------|------------|------------|----|
| <b>Bölge 321.1</b> | melanin        | istamycin  | Saccharide | 4% |
| <b>Bölge 24.1</b>  | phosphonate    | cyphomycin | Polyketide | 2% |
| <b>Bölge 2.1</b>   | lassopeptide   | -          | -          | -  |
| <b>Bölge 113.1</b> | NRPS           | -          | -          | -  |
| <b>Bölge 141.1</b> | hglE-KS        | -          | -          | -  |
| <b>Bölge 160.1</b> | NI-siderophore | -          | -          | -  |
| <b>Bölge 204.1</b> | NRPS           | -          | -          | -  |
| <b>Bölge 222.1</b> | terpene        | -          | -          | -  |
| <b>Bölge 235.1</b> | NRPS,T1PKS     | -          | -          | -  |
| <b>Bölge 444.1</b> | NRPS           | -          | -          | -  |
| <b>Bölge 553.1</b> | NRPS           | -          | -          | -  |
| <b>Bölge 633.1</b> | NRPS           | -          | -          | -  |
| <b>Bölge 646.1</b> | T1PKS          | -          | -          | -  |
| <b>Bölge 682.1</b> | NRPS           | -          | -          | -  |
| <b>Bölge 687.1</b> | NRPS           | -          | -          | -  |

Tablo 4. 5 *Streptomyces* sp. NTH33 genomundan antiSMASH programı ile tahmin edilen sekonder metabolitlerinin gösterimi

| Bölge       | Metabolit Tipi | En İyi Sınıflandırma                      |                                          | Benzerlik |
|-------------|----------------|-------------------------------------------|------------------------------------------|-----------|
| Bölge 13.1  | terpene        | albaflavenone                             | Terpene                                  | 100%      |
| Bölge 24.1  | T3PKS          | flaviolin/1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene | Polyketide                               | 100%      |
| Bölge 107.1 | T3PKS          | alkylresorcinol                           | Polyketide                               | 100%      |
| Bölge 264.1 | terpene        | geosmin                                   | Terpene                                  | 100%      |
| Bölge 231.1 | ectoine        | ectoine                                   | Other                                    | 75%       |
| Bölge 59.1  | terpene        | hopene                                    | Terpene                                  | 69%       |
| Bölge 105.1 | NI-siderophore | FW0622                                    | Other                                    | 62%       |
| Bölge 290.1 | T2PKS          | spore pigment                             | Polyketide                               | 58%       |
| Bölge 511.1 | terpene        | isorenieratene                            | Terpene                                  | 36%       |
| Bölge 4.1   | NRPS,T1PKS     | neocarzilin A/neocarzilin B               | Polyketide                               | 28%       |
| Bölge 154.1 | T1PKS          | neocarzilin A/neocarzilin B               | Polyketide                               | 28%       |
| Bölge 460.1 | T1PKS          | lydicamycin                               | NRP+Polyketide:Modular type I polyketide | 24%       |
| Bölge 106.1 | redox-cofactor | lankacidin C                              | NRP+Polyketide                           | 20%       |
| Bölge 6.1   | T1PKS,NRPS     | acidobactin A/acidobactin B               | NRP+Polyketide                           | 18%       |

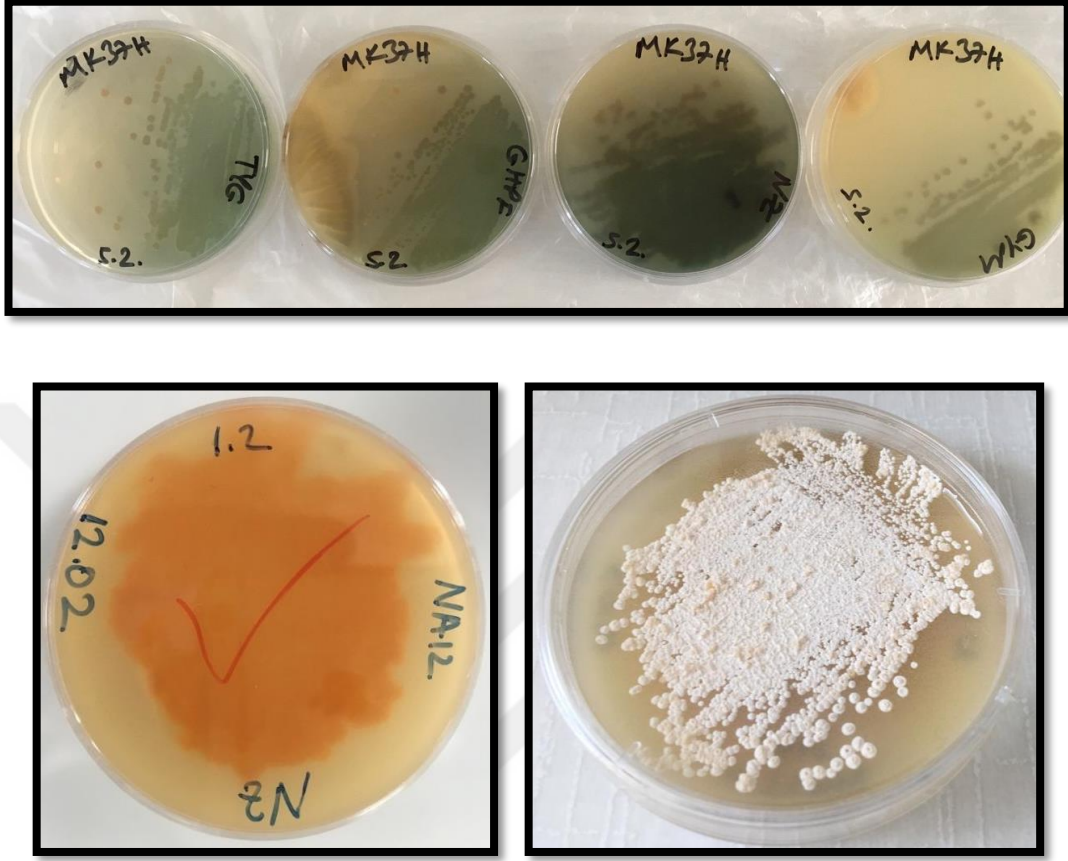
Tablo 4.5 (devam)

|                    |                 |                                           |                                      |     |
|--------------------|-----------------|-------------------------------------------|--------------------------------------|-----|
| <b>Bölge 878.1</b> | terpene         | isorenieratene                            | Terpene                              | 18% |
| <b>Bölge 219.1</b> | NRPS            | omnipeptin                                | NRP:Cyclic depsipeptide              | 17% |
| <b>Bölge 15.1</b>  | T1PKS,NRPS      | guadinomine/guadinomine B/guadinomic acid | NRP+Polyketide                       | 15% |
| <b>Bölge 10.1</b>  | NAPAA           | stenothricin                              | NRP:Cyclic depsipeptide              | 13% |
| <b>Bölge 275.1</b> | NRPS            | glycinocin A                              | NRP                                  | 11% |
| <b>Bölge 659.1</b> | NRPS            | WS9326                                    | NRP                                  | 10% |
| <b>Bölge 42.1</b>  | thiopeptide,LAP | FR-900520                                 | NRP+Polyketide                       | 9%  |
| <b>Bölge 79.1</b>  | linaridin       | pentostatine/vidarabine                   | Other                                | 9%  |
| <b>Bölge 44.1</b>  | NRPS,T1PKS      | lobophorin A                              | Polyketide                           | 6%  |
| <b>Bölge 67.1</b>  | T1PKS           | tautomycin                                | Polyketide:Modular type I polyketide | 6%  |
| <b>Bölge 187.1</b> | butyrolactone   | cyphomycin                                | Polyketide                           | 5%  |
| <b>Bölge 75.1</b>  | NRPS,T1PKS      | -                                         | -                                    | -   |
| <b>Bölge 82.1</b>  | NI-siderophore  | -                                         | -                                    | -   |
| <b>Bölge 174.1</b> | NRPS            | -                                         | -                                    | -   |
| <b>Bölge 457.1</b> | NRPS            | -                                         | -                                    | -   |
| <b>Bölge 481.1</b> | T1PKS           | -                                         | -                                    | -   |
| <b>Bölge 516.1</b> | NRPS            | -                                         | -                                    | -   |
| <b>Bölge 526.1</b> | NRPS            | -                                         | -                                    | -   |
| <b>Bölge 588.1</b> | NRPS            | -                                         | -                                    | -   |
| <b>Bölge 622.1</b> | NRPS            | -                                         | -                                    | -   |
| <b>Bölge 684.1</b> | NRPS            | -                                         | -                                    | -   |
| <b>Bölge 743.1</b> | NRPS            | -                                         | -                                    | -   |
| <b>Bölge 781.1</b> | NI-siderophore  | -                                         | -                                    | -   |

#### 4.2. Kullanılan Bakteriler

Farklı besiyerleri kullanılarak stokların aktifleştirilmesi ve en iyi üreme ortamının test edilmesi sonucunda *Micromonospora craterilacus* NA12, *Streptomyces* sp. MK37H ve *Nocardia* sp. GTS18 için N-Z besiyerinden (Şekil 4.3) en verimli sonuçlar alınmıştır. Sonraki aktifleştirmelerde de N-Z besiyeri kullanıldı. Üreme koşulları kontrol edildiğinde tüm mikroorganizmalar için 28°C uygun üreme verimini

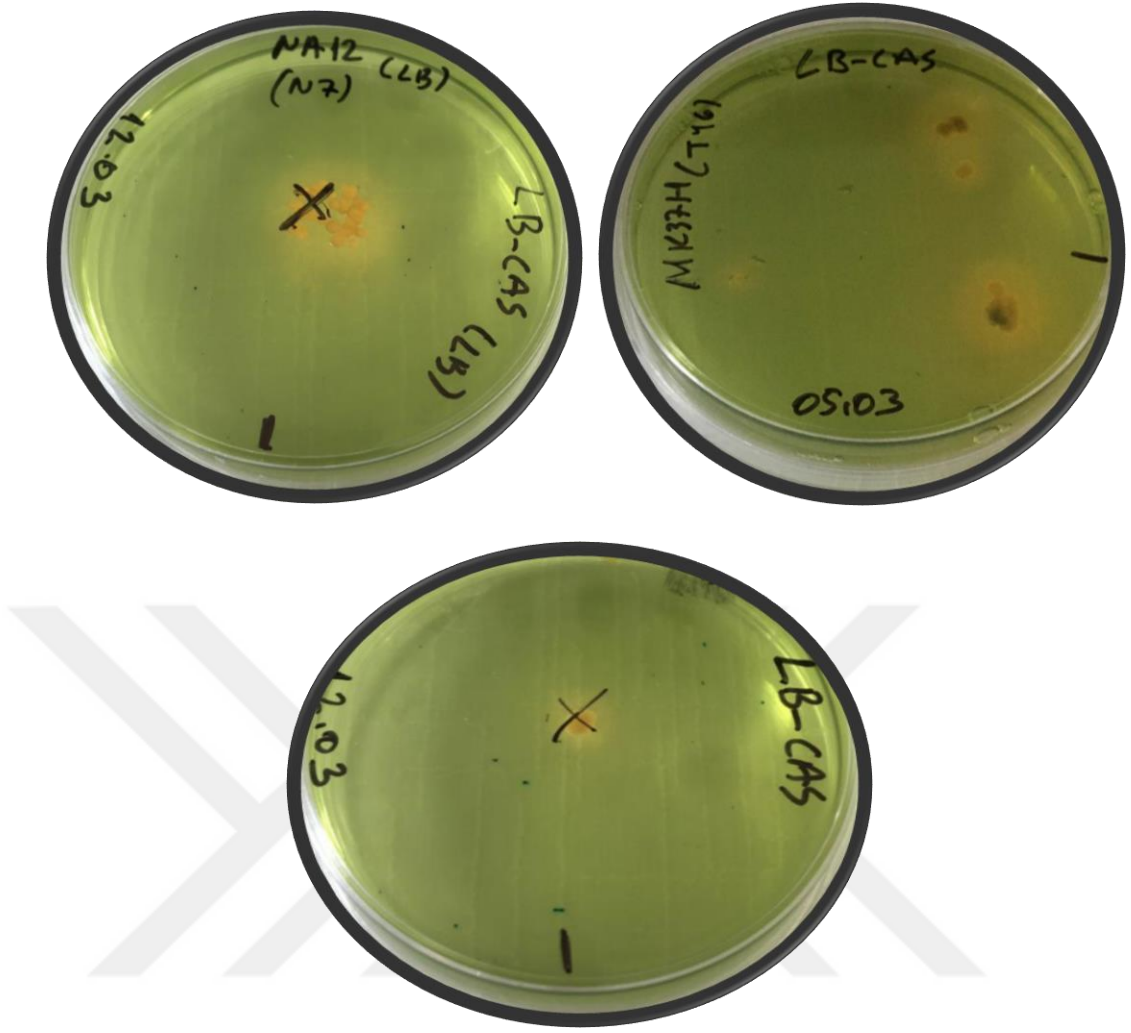
verirken süreler kontrol edildiğinde ise NA12 ve MK37H için 7 gün, GTS18 için ise 4 gün yeterli olduğu gösterilmiştir. Sonraki çalışmalarda 7 günlük inkübasyon süresi üzerinden ilerlenmiştir.



Şekil 4. 3 Mikroorganizmaların besiyerlerinde üreme görselleri (Üst taraf: MK37H, Alt Sol Taraf: NA12, Alt Sağ Taraf: GTS18)

#### 4.3. CAS Agar ile Siderofor Varlığının Gözlemlenmesi

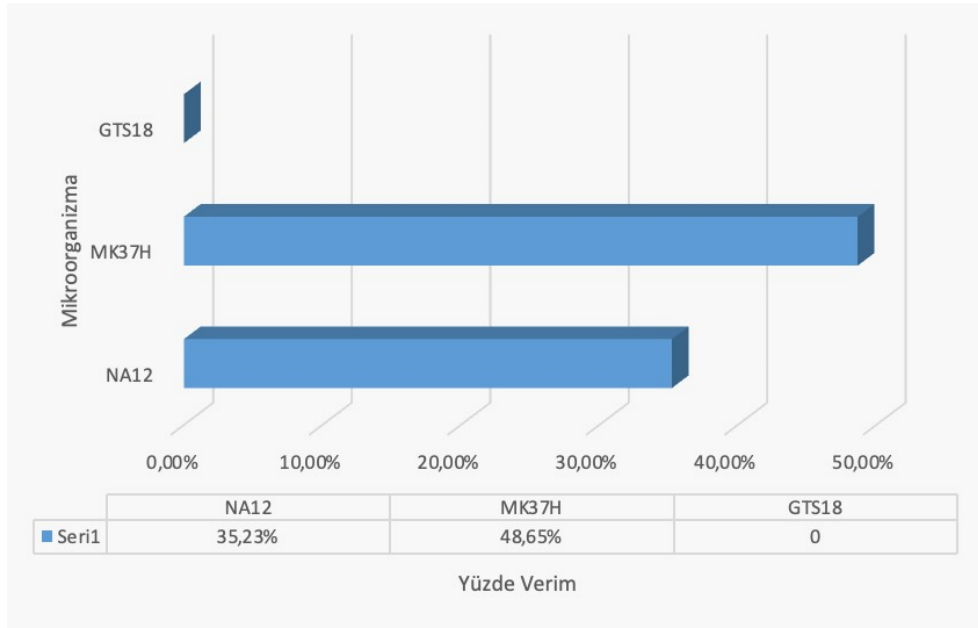
Sideroforlar düşük demir varlığında ortaya çıkan kompleks yapılarıdaki demir-spesifik yapılardır. Çalışmamızda mikroorganizmaların siderofor üretim yönünden pozitifliğini incelemek için öncelikle mikroorganizmalar katı besiyerden alınarak sıvı LB besiyeri içerisinde geliştirilmiştir. 7 günlük inkübasyon süresinin sonunda sıvı besiyerlerinden 10 µL alınarak hazırlanan CAS agarın tam orta noktasına gelecek şekilde damlatılmış ve sarı-turuncu zon çaplarının oluşması için 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda oluşan zon çapları not edilmiştir. Sonuçlara göre siderofor NA12 ve MK37H özelinde gerçekleşirken GTS18 özelinde çok fazla üretim görülmemiştir. Siderofor üretim görseli Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. LB-CAS agar üzerinde siderofor üretiminin gösterimi (Sarı-turuncu zonlar siderofor üretimi olduğunu göstermektedir.)

#### 4.4. Sıvı CAS Testi ile Siderofor Veriminin Hesaplanması

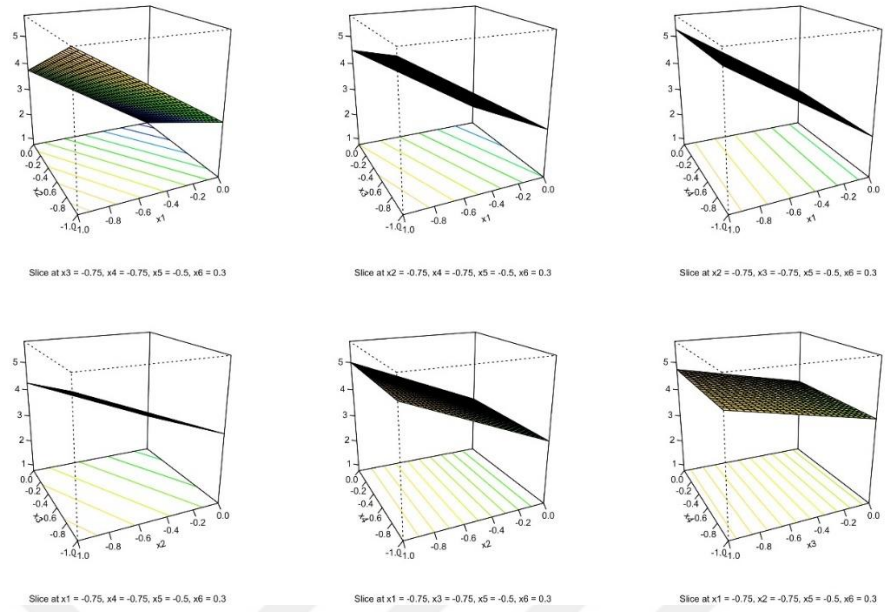
Sideroforlar hücrede üretilip dışarı salındığı için mikroorganizmaların sıvı besiyeri içerisine gönderdikleri sideroforların tespiti için sıvı CAS testi uygulanmıştır. CAS deneyinde meydana gelen renk değişim sonucu 630 nm dalga boyunda ölçülerek optimizasyon öncesi siderofor verimi hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre elde edilen siderofor verimi MK37H için % 48,65, NA12 için % 35,23, GTS18 için ise tespit edilememiştir.



Şekil 4.5. Optimizasyondan önce siderofor üretim yüzde hesaplamasının gösterimi

#### 4.5. Yanıt Yüzey Yöntemi ile İçeriklerin Optimizasyonu

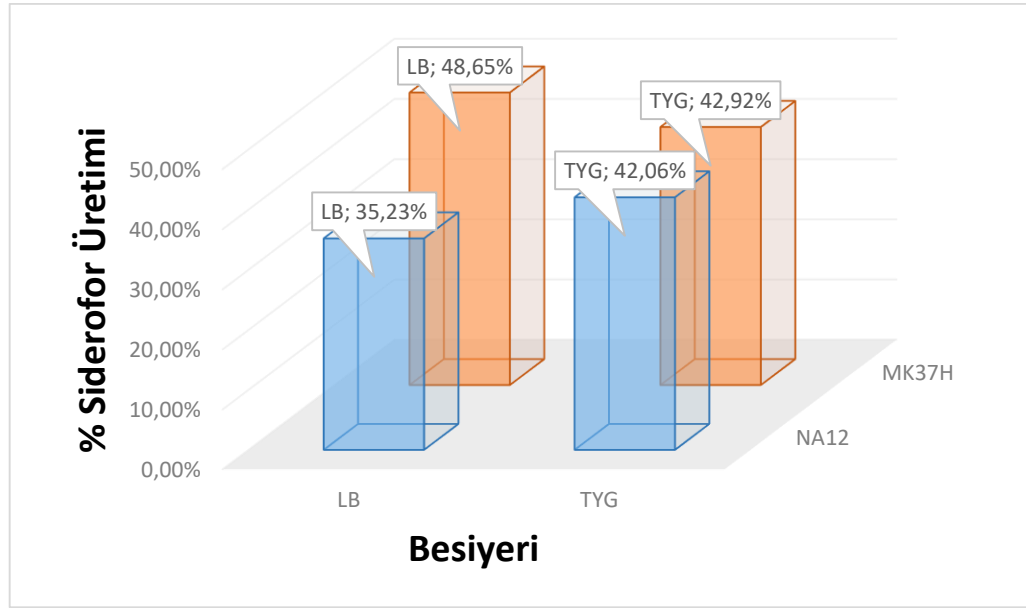
Yanıt yüzey yöntemi, biyoinformatik araçların gelişmesiyle birlikte fazla laboratuvar maliyetlerinin aşağı çekilmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu sebeple yapmış olduğumuz çalışmada elde edilen verilerin kullanılmasıyla analiz gerçekleştirilmiş ve Şekil 4.6'daki sonuçlar elde edilmiştir. Şekildeki sonuçlara bakıldığında son görseldeki kutu içerisindeki renkli alanın TYG besiyeri ve nişasta kullanımı ile daha optimize sonuçlar elde edildiği görülmektedir.



Şekil 4. 6 Yüzey yanıt yöntemi ile besiyeri içeriklerine ait biyoinformatik analiz temelli optimizasyon görseli

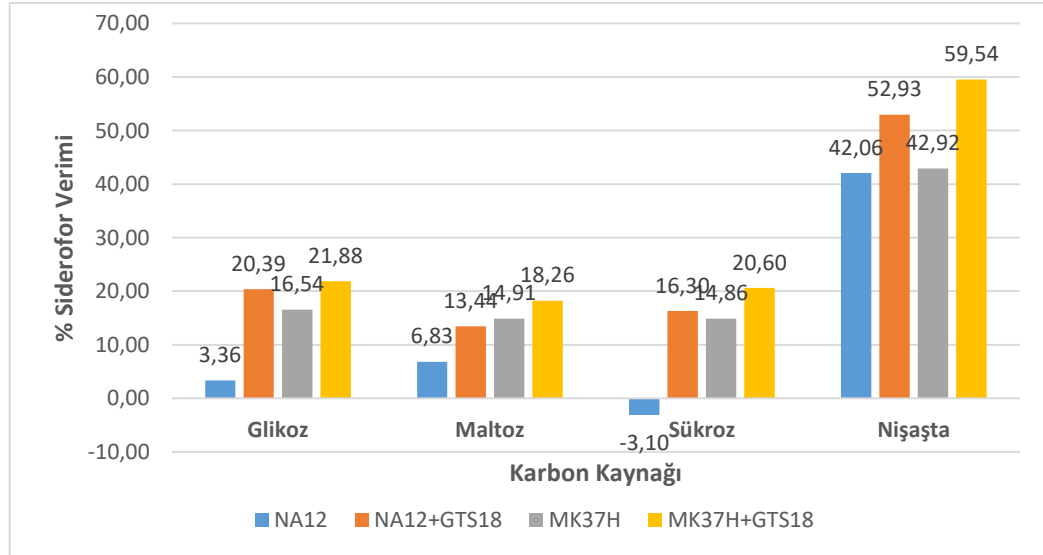
#### 4.6. Siderofor Üretiminin Karbon Kaynağı ve Birlikte Kültürleme Metodu Kullanılarak Sıvı Besiyeri ile Optimizasyonu

Karbonhidratlar, mikroorganizmaların üremeleri için en temel besin kaynağıdır. Ayrıca mikroorganizmaların üremesi için uygun besiyerlerinin kullanımı, üretilen sekonder metabolit miktarını arttırabilmektedir. Bu amaçla, son konsantrasyon litrede 4 g olacak şekilde LB ve TYG besiyerleri içerisinde sırasıyla glikoz, maltoz, sükroz ve nişasta eklenerek sıvı besiyerleri hazırlanmıştır. Ardından sıvı besiyerinden üretilmiş mikroorganizmalardan 1/100 oranında eklenerek 28 °C’de 7 gün inkübasyon yapılmıştır. Inkübasyon sonunda siderofor ölçümü daha önceki ölçümler gibi yapılmıştır.



Şekil 4. 7 Mikroorganizmalara ait LB ve TYG besiyerlerinden elde edilen yüzde siderofor verim görseli

Sideroforların karbon kaynağı ve besiyeri farklılıklarına göre elde edilen siderofor üretim miktarları Şekil 4.8’de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre siderofor verimi en iyi TYG besiyeri kullanımı ve nişastadan elde edilirken sırasıyla NA12 % 42,06, NA12+GTS18 % 52,93, MK37H % 42,92, MK37H+GTS18 % 59,54 sonucunu vermiştir.

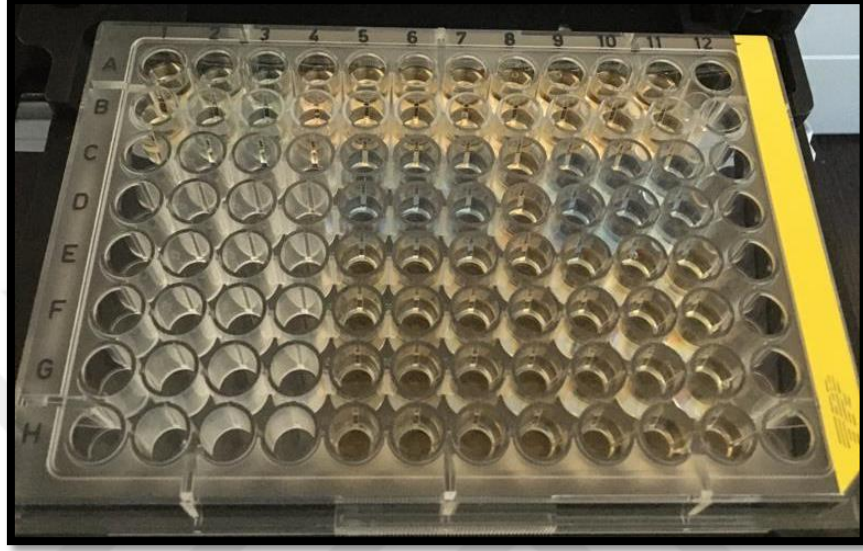


Şekil 4.8. TYG sıvı besiyerinde karbon kaynağı ile elde edilen % siderofor verimi

#### 4.7. Desferrioksamin B Sideroforunun Ekstraksiyonu

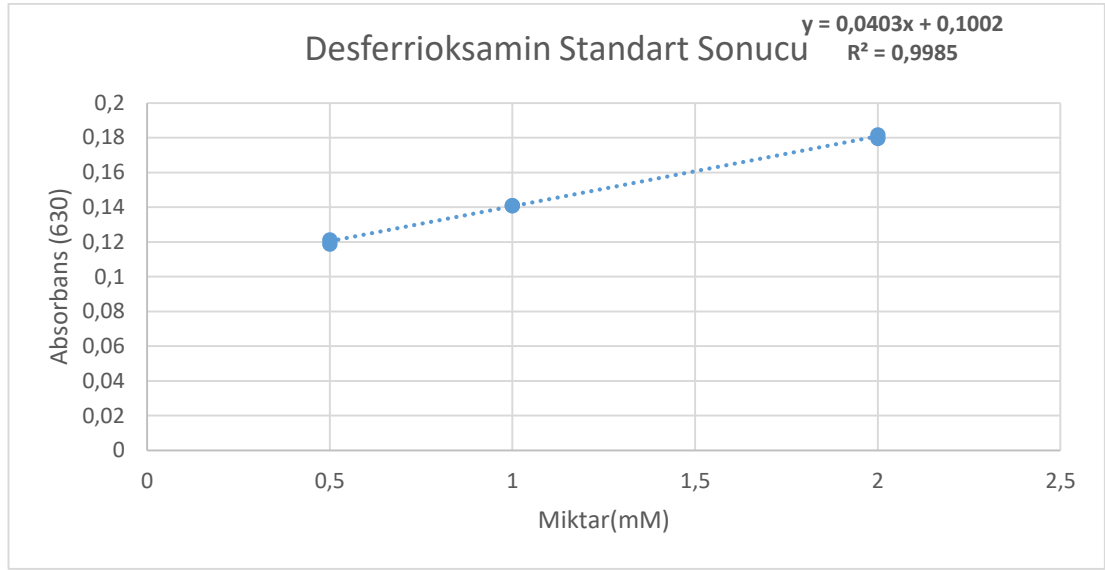
Titanyum dioksit nanopartikülü, düşük pH’larda desferrioksamin B sideroforu ile kompleks yapı oluşturduğu alkali pH’da ise birbirlerinden ayrıldığı bilinmektedir.

Çalışmamızda pH değişimlerinden yararlanarak mikroorganizmalardan üretilen desferrioksamın B sideroforunun ekstraksiyonu yapılmıştır. Ekstraksiyon sonrasında elde edilen siderofor çözeltisinin pH'sı 7'ye ayarlandıktan sonra 630 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapılarak (Şekil 4.9) standart desferrioksamın ile kıyaslanmıştır.



Şekil 4.9. Farklı miktarlarda üretilen sideroforun mikroparka yöntemi ile analiz gösterimi

Standart desferrioksamın ölçümü sonrasında excell programında hazırlanan eğri (Şekil 4.10) ile numunelerden elde edilen desferrioksamın B miktarı hesaplanmıştır. Hesaplanan değerler Şekil 4.11'de gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Standart desferalin 630 nM'de ölçüm sonucunda hesaplanan eğrinin gösterimi

Bu sonuçlara göre TYG-Nişasta sıvı besiyeri kullanılarak elde edilen desferrioksamin B miktarı NA12 için 0,191 mM, NA12+GTS18 için 0,198 mM, MK37H için 0,196 mM, MK37H+GTS18 için ise 0,204 mM olarak hesaplanmıştır.

| Karbon Kaynağı     | NA12           | NA12+GTS18     | MK37H          | MK37H+GTS18    |
|--------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Glikoz-LB          | ↓ 0,101        | ↓ 0,107        | ↓ 0,105        | ↓ 0,107        |
| Glikoz-TYG         | ↑ 0,190        | ↑ 0,184        | ↑ 0,186        | ↑ 0,185        |
| Nişasta-LB         | ↓ 0,112        | ↓ 0,115        | ↓ 0,111        | ↓ 0,116        |
| <b>Nişasta-TYG</b> | <b>↑ 0,191</b> | <b>↑ 0,198</b> | <b>↑ 0,196</b> | <b>↑ 0,204</b> |
| Maltoz-LB          | ↓ 0,103        | ↓ 0,105        | ↓ 0,105        | ↓ 0,106        |
| Maltoz-TYG         | ↑ 0,189        | ↑ 0,187        | ↑ 0,187        | ↑ 0,186        |
| Sükroz-LB          | ↓ 0,099        | ↓ 0,106        | ↓ 0,105        | ↓ 0,107        |
| Sükroz-TYG         | ↑ 0,180        | ↑ 0,177        | ↑ 0,181        | ↑ 0,177        |

Şekil 4.11. Optimizasyon sonucunda elde edilen siderofor (mM) miktarlarının kantitatif analiz sonuçları. (Kırmızıdan yeşile gidildikçe siderofor üretim miktarı artmaktadır)

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Aktinobakteriler, küflere ve diğer bakterilere kıyasla biyoaktif sekonder metabolit üretimi açısından en önemli doğal kaynaklar olarak kabul edilmektedir. Antimikrobiyal, sitotoksik, immün baskılayıcı gibi farklı aktivitelere sahip birçok biyoaktif bileşik aktinobakterilerden izole edilerek karakterize edilmiştir. Ancak, aktinobakteriler tarafından sentezlenen sideroforlar ile ilgili çalışmalar yetersiz düzeydedir. *Streptomyces* türlerinin, bağımsız olarak düzenlenebilen ve habitatta etkili bir şekilde çalışan farklı sideroforları üretebildiği bilinmektedir. Farklı *Streptomyces* türlerinin desferrioksamin G, B ve E gibi karakteristik desferrioksamin sideroforlarını ürettiği bildirilmiştir (Challis ve Hopwood, 2003). *Streptomyces pilosus* tarafından üretilen desferrioksamin B (ticari adı Desferal), mesilat tuzu olarak piyasada bulunmakta olup hastalarda demir zehirlenmesinin tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak ilaç, hidrofilik olması nedeniyle, uzun sürede deri altına uygulanmak zorundadır (Nakouti vd., 2012). Ayrıca etki mekanizması çalışmalarından elde edilen verilere göre desferrioksamin B parazit içerisine girerek hücre içerisindeki demiri bağlayabilmekte ve buna bağlı olarak *Plasmodium falciparum* enfeksiyonunun tedavisinde de kullanılmaktadır (Miethke ve Marahiel, 2007).

Literatürde *Streptomyces* türleri tarafından siderofor aracılığıyla demir edinimi, siderofor biyosentezi ve düzenlenmesi konuları üzerine araştırmalar mevcuttur (Barona-Gomez vd., 2004; Flores ve Martin, 2004; Bunet vd., 2006; Kadi vd., 2007; Tunca vd., 2007, 2009). Bu araştırmaların sonucunda *Streptomyces* türleri tarafından üretilen önemli bir siderofor grubu olan desferrioksaminlerin tarım, biyolojik arıtma ve tıp gibi birçok biyoteknolojik süreçte uygulama alanına sahip olduğu gösterilmiştir (Dimpka vd., 2008, 2009; Rajkumar vd., 2010; Banin vd., 2008). *Streptomyces* cinsi üyeleri, yeni hidroksamat siderofor coelichelin ve katekol sideroforlar da dâhil olmak üzere farklı sideroforları üretebildiği halde sadece desferrioksaminlerin biyoteknolojik uygulama alanına sahip olduğu gösterilmiştir (Tierrafría vd., 2011). Bu kimyasal kompleksinin bir üyesi olan desferroksamin B, aşırı demir yüklenmesinin tedavisi için 1960'lı yıllarda Desferal® adı ile piyasaya sürülmüştür (Gaseumann vd., 1964; Keri vd., 2005). Literatürde deri altına uygulanan bu demir-şelatlayıcı ilacın yerini alabilecek başka ilaçlar için yapılmış olan çalışmalar mevcuttur (Chaston ve Richardson, 2003). Ancak, klinik olarak bu çalışmalar

başarısızlıkla sonuçlanmış ve desferrioksamin B günümüzde aşırı demir yüklenmesinin ana tedavisini oluşturmaktadır (Tierrafría vd., 2011).

Araştırmamız yerli kaynaklardan elde edilen *Micromonospora craterilacus* NA12, *Streptomyces* sp. MK37H ve *Nocardia* sp. GTS18 mikroorganizmaları ile birlikte kültürleme teknikleri kullanılarak LB ve TYG besiyerleri kullanılarak desferrioksamin B siderofor üretiminin optimizasyonunu kapsamaktadır. Siderofor üretiminin tespitinde CAS (Chrome Azurol sulfonate) testi kullanılmıştır. CAS testi sonucunda NA12 ve MK37H suşlarında siderofor üretimi gözlenir iken, GTS18 suşunda siderofor varlığına rastlanmamıştır.

Desferrioksamin B sideroforunun üretiminde Schwyn ve Neillands (1987)'in geliştirdiği metotta bazı karmaşık deneylerin olmasından dolayı Loudon ve arkadaşlarının (2011) geliştirdiği LB-CAS besiyeri ile sıvı besiyeri içerisindeki siderofor varlığının tespit edilebileceği gösterilmiştir. Buna göre, çalışmamızda LB-CAS besiyeri kullanılarak mikroorganizmalarda desferrioksamin B siderofor üretiminin varlığı kontrol edilmiştir. Sonuç olarak, *Micromonospora craterilacus* NA12'de %35,23, *Streptomyces* sp. MK37H'de %48,65 siderofor üretimi tespit edilmiştir.

Siderofor üretiminde mikroorganizmalar için uygun besiyeri ortamları kritik öneme sahiptir. Bu nedenle LB-CAS testine ek olarak mikroorganizmaların iyi üreme gösterdiği TYG sıvı besiyeri ile CAS solüsyonu birleştirilerek TYG-CAS hazırlanmıştır. Ayrıca LB ve TYG besiyerlerinin içerisine karbon kaynağını kontrol etmek amacı ile litrede 4 gr olacak şekilde glikoz, maltoz, sükroz ve nişasta eklemesi yapılmıştır. Elnahas ve arkadaşlarının (2021) toksik metallerin ve petrol sızıntılarının ortadan kaldırılmasına ilişkin yapmış olduğu çalışmada kullandığı karbon kaynaklarından nişastanın siderofor üretiminde 11,7 g/l ile en yüksek verimi gösterdiğini bildirmiştir. Bizim çalışmamızda ise mikroorganizmaların üremesine ve siderofor üretimine en çok katkı sağlayan besiyeri TYG-Nişasta besiyeri olmuştur. Bu besiyerinden elde edilen siderofor miktarı ise *Micromonospora craterilacus* NA12 için %42,06, *Streptomyces* sp. MK37H için ise %42,92 olmuştur.

Besin kaynaklarının yanı sıra mikolik asit içeren mikroorganizmalar ile yapılan birlikte kültürleme çalışmaları ile siderofor üretim miktarının arttığı bilinmektedir. Wang vd., (2021) *Streptomyces* tarafından kodlanan yeni sekonder metabolitleri keşfetmek için onları mikolik asit içeren mikroorganizmalar ile birlikte kültürleyerek elde ettiği sekonder metabolitlerin aktivitesini karşılaştırmıştır. Yapılan çalışma,

birlikte kültürleme sonucunda sekonder metabolit üretiminin %82,9 oranında arttığını göstermiştir. Ayrıca birlikte kültürleme ile 49’u yeni olmak üzere birçok farklı sekonder metabolit tespit edilmiştir (Wang vd., 2021). Bu bilgiler ışığında mikolik asit üreticisi olan *Nocardia* sp. GTS18 ile birlikte kültürleme sonucunda desferrioksamin B siderofor üretiminde artmış görülmüştür. Bu artış NA12+GTS18 için %52,93, MK37H+GTS18 için ise %59,54 olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak birlikte kültürleme ile *Micromonospora craterilacus* NA12’de %10,87 ve *Streptomyces* sp. MK37H’de %16,62 oranında verim artışı tespit edilmiştir.

Bu tez çalışması ile desferrioksamin bileşiklerinin, ülkemizden izole edilen yeni aktinobakteri suşları kullanılarak üretilmesi ve üretim sürecinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu alışma, ülkemizde desferrioksamin aktif bileşiğinin yerli genetik kaynaklar kullanılarak üretildiğini gösteren ilk çalışma özelliğine sahiptir.

## 6. ÖNERİLER

Bu tez çalışması ile daha önceki çalışmalarda toprak ve göl sedimenti örneklerinden izole edilmiş olan *Micromonospora craterilacus* NA12, *Streptomyces* sp. MK37H ve *Nocardia* sp. GTS18 izolatları kullanılarak desferrioksamin biyosentezinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Mevcut durumda ithal edilen Desferal ilacının etken maddesi olan desferrioksamin, ilk kez bu çalışma ile yerli mikrobiyal kaynaklar kullanılarak üretilmiştir. İleriki dönemlerde, desferrioksamin üretimindeki verimin artırımı için pH, sıcaklık, inokülasyon miktarı ve farklı konsantrasyonlarda demir kullanımı gibi etkenlerin test edilerek üretimdeki verimliliğin artırılmasına yönelik çalışmalar yapılması gerekmektedir. Ardından desferrioksamin üretiminin büyük ölçekli biyoreaktörlerde gerçekleştirilerek, bu sideroforun ilaç etken maddesi olarak formülize edilebileceği sanayi işbirlikli projelerin hazırlanması gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

- Abdelmohsen, U. R., Grkovic, T., Balasubramanian, S., Kamel, M. S., Quinn, R. J., & Hentschel, U. (2015). Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes. *Biotechnology advances*, 33(6), 798-811.
- Anandan, R., Dharumadurai, D., & Manogaran, G. (2016). An Introduction to Actinobacteria. In D. Dhanasekaran, & Y. Jiang (Eds.), *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/62329>
- Araujo-Melo, R. D. O., de Oliveira, T. H. B., de Oliveira, C. V. J., de Araújo, J. M., de Sena, K. X., & Coelho, L. C. B. B. (2019). Actinobacteria: a renewable source of bioactive molecules with medical, industrial and pharmacological importance. *Advances and Trends in Biotechnology and Genetics*, 1, 63-79.
- Abreu, C., Rocha-Pereira, N., Sarmiento, A., & Magro, F. (2015). Nocardia infections among immunomodulated inflammatory bowel disease patients: a review. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 21(21), 6491.
- Arora, N. K., & Verma, M. (2017). Modified microplate method for rapid and efficient estimation of siderophore produced by bacteria. *3 Biotech*, 7(6), 1-9.
- Ateş, H. (2019). Çevresel örneklerden aktinobakterilerin izolasyonu ve biyoaktivite profillerinin belirlenmesi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Samsun
- Ay, H., Nouioui, I., Klenk, H. P., Cetin, D., Igual, J. M., Sahin, N., & Isik, K. (2020). Genome-based classification of *Micromonospora craterilacus* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from Nemrut Lake. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113(6), 791-801.
- Ay, H. (2016). Farklı krater gölleri sediment ve kıyı topraklarından aktinomisetlerin izolasyonu ve polifazik taksonomisi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Samsun
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier-Kolthoff, J. P., Klenk, H. P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & van Wezel, G. P. (2015). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 80(1), 1-43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., ... & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.
- Barry, S. M., & Challis, G. L. (2009). Recent advances in siderophore biosynthesis. *Current opinion in chemical biology*, 13(2), 205-215.
- Baltz RH. Marcel Faber Roundtable: is our antibiotic pipeline unproductive because of starvation, constipation or lack of inspiration? *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2006 Jul;33(7):507-13. doi: 10.1007/s10295-005-0077-9. Epub 2006 Jan 18. PMID: 16418869.
- Bajbouj, K., Shafarin, J., & Hamad, M. (2018). High-dose deferoxamine treatment disrupts intracellular iron homeostasis, reduces growth, and induces apoptosis in metastatic and nonmetastatic breast cancer cell lines. *Technology in cancer research & treatment*, 17, 1533033818764470.
- Berdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *The Journal of antibiotics*, 58(1), 1-26.
- Bérty J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *The Journal of antibiotics*, 65(8), 385-395. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.27>

- Bellotti, D., & Remelli, M. (2021). Deferoxamine B: A natural, excellent and versatile metal chelator. *Molecules*, 26(11), 3255.
- Bhatti AA, Haq S, Bhat RA. Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. *Microb Pathog*. 2017 Oct;111:458-467. doi: 10.1016/j.micpath.2017.09.036. Epub 2017 Sep 18. PMID: 28923606.
- Brown-Elliott, B. A., Brown, J. M., Conville, P. S., & Wallace Jr, R. J. (2006). Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. *Clinical microbiology reviews*, 19(2), 259-282
- Blin, K., Shaw, S., Kloosterman, A. M., Charlop-Powers, Z., Van Wezel, G. P., Medema, M. H., & Weber, T. (2021). antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W29-W35.
- Challis, G. L., & Hopwood, D. A. (2003). Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(suppl\_2), 14555-14561.
- Challis, G. L. (2005). A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases. *Chembiochem*, 6(4), 601-611.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). CDC Public Health Image Library (PHIL). Available online: <https://phil.cdc.gov> (accessed on 20 September 2022).
- Cornelis, P., Andrews, S.C., Iron Uptake and Homeostasis in Microorganisms. 302. Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2010
- Crichton, R. R., Ward, R. J., & Hider, R. C. (2019). The efficacy of iron chelators for removing iron from specific brain Bölgés and the pituitary—ironing out the brain. *Pharmaceuticals*, 12(3), 138.
- Das, S., Ward, L. R., & Burke, C. (2008). Prospects of using marine actinobacteria as probiotics in aquaculture. *Applied microbiology and biotechnology*, 81(3), 419-429.
- Dhakal, D., Rayamajhi, V., Mishra, R., & Sohng, J. K. (2019). Bioactive molecules from *Nocardia*: diversity, bioactivities and biosynthesis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 46(3-4), 385-407.
- Deka, P., Passari, A. K., & Singh, B. P. (2020). Actinobacteria as a potential natural source to produce antibiofilm compounds: An overview. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Biofilms*, 91-99.
- Dolin, R., Bennett, J. E., & Mandell, G. L. (2005). Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. In Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (pp. 1727-3662).
- Di Nicola, M., Barteselli, G., Dell'Arti, L., Ratiglia, R., & Viola, F. (2015). Functional and structural abnormalities in deferoxamine retinopathy: a review of the literature. *BioMed research international*, 2015.
- Egbers, P. H., Harder, T., Koch, B. P., & Tebben, J. (2020). Siderophore purification with titanium dioxide nanoparticle solid phase extraction. *Analyst*, 145(22), 7303-7311.
- Elnahas, M. O., Hou, L., Wall, J. D., & Majumder, E. L. W. (2021). Bioremediation Potential of *Streptomyces* sp. MOE6 for Toxic Metals and Oil. *Polysaccharides*, 2(1), 47-68.
- Fan, D., & Fang, Q. (2021). Siderophores for medical applications: imaging, sensors, and therapeutics. *International Journal of Pharmaceutics*, 597, 120306.
- Felnagle, E. A., Jackson, E. E., Chan, Y. A., Podevels, A. M., Berti, A. D., McMahon, M. D., & Thomas, M. G. (2008). Nonribosomal peptide synthetases involved in the production of medically relevant natural products. *Molecular pharmaceutics*, 5(2), 191-211.

- Fine, J. M., Forsberg, A. C., Stroebel, B. M., Faltsek, K. A., Verden, D. R., Hamel, K. A., ... & Hanson, L. R. (2017). Intranasal deferoxamine affects memory loss, oxidation, and the insulin pathway in the streptozotocin rat model of Alzheimer's disease. *Journal of the neurological sciences*, 380, 164-171.
- Genilloud, O. (2012). *Bergey's manual of systematic bacteriology: the Actinobacteria*.
- Hatcher, H. C., Singh, R. N., Torti, F. M., & Torti, S. V. (2009). Synthetic and natural iron chelators: therapeutic potential and clinical use. *Future medicinal chemistry*, 1(9), 1643-1670.
- Heskamp, S., Raavé, R., Boerman, O., Rijpkema, M., Goncalves, V., & Denat, F. (2017). <sup>89</sup>Zr-immuno-positron emission tomography in oncology: state-of-the-art <sup>89</sup>Zr radiochemistry. *Bioconjugate chemistry*, 28(9), 2211-2223.
- Hider, R.C., & Kong, X. (2010). Chemistry and biology of siderophores. *Natural product reports*, 27 5, 637-57.
- Hirsch, A. M., & Valdés, M. (2010). Micromonospora: an important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(4), 536-542.
- Hofmann, M., Heine, T., Malik, L., Hofmann, S., Joffroy, K., Senges, C. H. R., Bandow, J. E., & Tischler, D. (2021). Screening for Microbial Metal-Chelating Siderophores for the Removal of Metal Ions from Solutions. *Microorganisms*, 9(1), 111. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010111>
- Holden, V. I., & Bachman, M. A. (2015). Diverging roles of bacterial siderophores during infection. *Metallomics : integrated biometal science*, 7(6), 986–995. <https://doi.org/10.1039/c4mt00333k>
- Hoskisson, P. A., Hobbs, G., & Sharples, G. P. (2000). Response of Micromonospora echinospora (NCIMB 12744) spores to heat treatment with evidence of a heat activation phenomenon. *Letters in applied microbiology*, 30(2), 114-117.
- Hu, S., Hua, Y., Keep, R. F., Feng, H., & Xi, G. (2019). Deferoxamine therapy reduces brain hemin accumulation after intracerebral hemorrhage in piglets. *Experimental neurology*, 318, 244-250.
- Jiang, G., Zhang, Y., Powell, M. M., Zhang, P., Zuo, R., Zhang, Y., Kallifidas, D., Tieu, A. M., Luesch, H., Loria, R., & Ding, Y. (2018). High-Yield Production of Herbicidal Thaxtomins and Thaxtomin Analogs in a Nonpathogenic Streptomyces Strain. *Applied and environmental microbiology*, 84(11), e00164-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00164-18>
- Kadi, N., & Challis, G. L. (2009). Siderophore biosynthesis: a substrate specificity assay for nonribosomal peptide synthetase-independent siderophore synthetases involving trapping of acyl-adenylate intermediates with hydroxylamine. *Methods in enzymology*, 458, 431-457.
- Kandel, S. L., Joubert, P. M., & Doty, S. L. (2017). Bacterial Endophyte Colonization and Distribution within Plants. *Microorganisms*, 5(4), 77. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5040077>
- Khoshlahni, N., Sagha, M., Mirzapour, T., Zarif, M. N., & Mohammadzadeh-Vardin, M. (2020). Iron depletion with deferoxamine protects bone marrow-derived mesenchymal stem cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Cell Stress and Chaperones*, 25(6), 1059-1069.
- Kontoghiorghe, G. J. (2020). Advances on chelation and chelator metal complexes in medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2499.

- Kontoghiorghes, G. J., & Kontoghiorghes, C. N. (2020). Iron and chelation in biochemistry and medicine: new approaches to controlling iron metabolism and treating related diseases. *Cells*, 9(6), 1456.
- Kontoghiorghes, G. J., Kolnagou, A., Kontoghiorghes, C. N., Mourouzidis, L., Timoshnikov, V. A., & Polyakov, N. E. (2020). Trying to solve the puzzle of the interaction of ascorbic acid and iron: Redox, chelation and therapeutic implications. *Medicines*, 7(8), 45.
- Lam, K. S. (2006). Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current opinion in microbiology*, 9(3), 245-251.
- Leitch, H. A. (2007). Improving clinical outcome in patients with myelodysplastic syndrome and iron overload using iron chelation therapy. *Leukemia research*, 31, S7-S9.
- Lenth, R. . V. . (2009). Response-Surface Methods in R, Using rsm. *Journal of Statistical Software*, 32(7), 1–17. <https://doi.org/10.18637/jss.v032.i07>
- Louden, B. C., Haarmann, D., & Lynne, A. M. (2011). Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. *Journal of microbiology & biology education*, 12(1), 51–53. <https://doi.org/10.1128/jmbe.v12i1.249>
- Malani, P. N. (2010). Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. *JAMA*, 304(18), 2067-2071.
- Manivasagan, P., Annamalai, N., Ashokkumar, S., & Sampathkumar, P. (2009). Studies on the proteinaceous gel secretion from the skin of the catfish, *Arius maculatus* (Thunberg, 1792). *African Journal of Biotechnology*, 8(24), 7125-7129.
- Mayfield C.I., Williams S.T., Ruddick S.M., Hatfield H.L., (1972) Studies on the ecology of actinomycetes in soil IV. Observations on the form and growth of streptomycetes in soil, *Soil Biology and Biochemistry* olume 4, Issue 1. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(72\)90045-4](https://doi.org/10.1016/0038-0717(72)90045-4).
- Mawang, C. I., Azman, A. S., Fuad, A. M., & Ahamad, M. (2021). Actinobacteria: An eco-friendly and promising technology for the bioaugmentation of contaminants. *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)*, 32, e00679. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00679>
- McTaggart, L. R., Richardson, S. E., Witkowska, M., & Zhang, S. X. (2010). Phylogeny and identification of *Nocardia* species on the basis of multilocus sequence analysis. *Journal of clinical microbiology*, 48(12), 4525-4533.
- Miethke, M., & Marahiel, M. A. (2007). Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 71(3), 413–451. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00012-07>
- Miller, M. J., & Marvin, J. (2008). Siderophores (microbial iron chelators) and siderophore-drug conjugates (new methods for microbially selective drug delivery). University of Notre Dame. Dame. University of Notre Dame.
- Mügge, C., Heine, T., Baraibar, A. G., van Berkel, W. J. H., Paul, C. E., & Tischler, D. (2020). Flavine-dependent N-hydroxylating enzymes: distribution and application. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(15), 6481–6499. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10705-w>
- Neilands, J.B., Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *The Journal of Biological Chemistry*. 270, 26723-6, 1995
- Özbolat G. , Tuli A. (2016) Ağır Metal Toksisitesinin İnsan Sağlığına Etkileri. *aktd.*; 25(4): 502-521.

- Pita-Grisanti, V., Chasser, K., Sobol, T., & Cruz-Monserrate, Z. (2022). Understanding the Potential and Risk of Bacterial Siderophores in Cancer. *Frontiers in oncology*, 12, 867271. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.867271>
- RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>
- Ranjani Anandan, Dhanasekaran Dharumadurai and Gopinath Ponnusamy Manogaran (2016). An Introduction to Actinobacteria, Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications, IntechOpen, DOI: 10.5772/62329
- Procópio, R. E., Silva, I. R., Martins, M. K., Azevedo, J. L., & Araújo, J. M. (2012). Antibiotics produced by Streptomyces. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 16(5), 466–471. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.08.014>
- Ratledge, C., & Dover, L. G. (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annual reviews in microbiology*, 54(1), 881-941
- Richa Salwana, Vivek Sharmab, (2020) Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria. *Microbiological Research* 231 (2020) 126374. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126374>.
- Roth, A., Andrees, S., Kroppenstedt, R. M., Harmsen, D., & Mauch, H. (2003). Phylogeny of the genus *Nocardia* based on reassessed 16S rRNA gene sequences reveals underspeciation and division of strains classified as *Nocardia asteroides* into three established species and two unnamed taxons. *Journal of clinical microbiology*, 41(2), 851-856.
- Salwan R, Sharma V. Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria. *Microbiol Res.* 2020 Jan;231:126374. doi: 10.1016/j.micres.2019.126374. Epub 2019 Nov 12. PMID: 31756597.
- Schalk, I. J., Hannauer, M., & Braud, A. (2011). New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environmental microbiology*, 13(11), 2844-2854.
- Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*, 160(1), 47–56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
- Seipke, R.F., Kaltenpoth, M., and Hutchings, M.I. (2012) Streptomyces as symbionts: an emerging and widespread theme?. *FEMS Microbiol Rev* 36: 862–876
- Sharon, G. (2010). Secondary metabolite production by Streptomycetes in situ and in vivo.
- Shepherd, M. D., Kharel, M. K., Bosserman, M. A., & Rohr, J. (2010). Laboratory maintenance of Streptomyces species. *Current protocols in microbiology*, Chapter 10, Unit–10E.1. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc10e01s18>
- Sujarit, K., Sujada, N., Kudo, T., Ohkuma, M., Pathom-Aree, W., & Lumyong, S. (2017). *Pseudonocardia thailandensis* sp. nov., an actinomycete isolated from a subterranean termite nest. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(8), 2773–2778. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002017>
- Subramani R, Aalbersberg W. Culturable rare Actinomycetes: diversity, isolation and marine natural product discovery. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013 Nov;97(21):9291-321. doi: 10.1007/s00253-013-5229-7. Epub 2013 Sep 22. PMID: 24057404.
- Sun, Y., Shi, Y. L., Wang, H., Zhang, T., Yu, L. Y., Sun, H., & Zhang, Y. Q. (2018). Diversity of Bacteria and the Characteristics of Actinobacteria Community Structure in Badain Jaran Desert and Tengger Desert of China. *Frontiers in microbiology*, 9, 1068. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01068>

- Tan, Z. Q., Leow, H. Y., Lee, D. C. W., Karisnan, K., Song, A. A. L., Mai, C. W., ... & Lai, K. S. (2019). Co-culture Systems for the production of secondary metabolites: Current and future prospects. *The Open Biotechnology Journal*, 13(1).
- Tiwari, K., & Gupta, R. K. (2012). Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. *Critical reviews in biotechnology*, 32(2), 108–132. <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.562482>
- Trujillo, M. E., Bacigalupe, R., Pujic, P., Igarashi, Y., Benito, P., Riesco, R., ... & Normand, P. (2014). Genome features of the endophytic actinobacterium *Micromonospora lupini* strain Lupac 08: on the process of adaptation to an endophytic life style?. *PLoS One*, 9(9), e108522.
- Vinuesa, V., & McConnell, M. J. (2021). Recent advances in iron chelation and gallium-based therapies for antibiotic resistant bacterial infections. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 2876.
- Yagüe, P., López-García, M. T., Rioseras, B., Sánchez, J., & Manteca, A. (2013). Pre-sporulation stages of *Streptomyces* differentiation: state-of-the-art and future perspectives. *FEMS microbiology letters*, 342(2), 79–88. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12128>
- Yu, M., Li, Y., Banakar, S. P., Liu, L., Shao, C., Li, Z., & Wang, C. (2019). New metabolites from the co-culture of marine-derived actinomycete *Streptomyces rochei* MB037 and fungus *Rhinochrysiella similis* 35. *Frontiers in microbiology*, 10, 915.
- Wang, L., Li, X., Mu, Y., Lu, C., Tang, S., Lu, K., ... & Wei, W. (2019). The iron chelator desferrioxamine synergizes with chemotherapy for cancer treatment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 56, 131-138.
- Wang, K., Liu, N., Shang, F., Huang, J., Yan, B., Liu, M., & Huang, Y. (2021). Activation of Secondary Metabolism in Red Soil-Derived *Streptomyces* via Co-Culture with Mycolic Acid-Containing Bacteria. *Microorganisms*, 9(11), 2187. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112187>
- Zenova, G. M., Manucharova, N. A. and Zvyagintsev, D. G. (2011). Extremophilic and extremotolerant actinomycetes in different soil types. *Eurasian Soil Science*, 44: 417-436. Doi: <https://doi.org/10.1134/S1064229311040132>

## EKLER

### EK.1 R Studio RSM Paketi Analiz Kodları

```
→library(rsm)
→yield_data = read.csv(file.choose(), header = T, sep = ";")
→yield_data <- coded.data(dataf, formulas = list(x1 ~ (Glukoz - 5)/5, x2 ~ (Nisasta - 5)/5, x3 ~ (Sukroz - 5)/5, x4 ~ (Maltoz - 5)/5, x5 ~ (NaCL - 5)/5, x6 ~ (Tripton - 5)/5))
→yield_model <- rsm(Yield ~ SO(x1, x2, x3, x4), data = yield_data)
→summary(yield_model)
→par(mfrow = c(2,3))
→contour(yield_model, ~ x1 + x2 + x3 + x4, image = TRUE,)
→jpeg(filename = "graphs/model_contours.jpeg", width = 30, height = 20,
  units = "cm", res = 400, quality = 100)
→par(mfrow = c(2,3))
→contour(yield_model, ~ x1 + x2 + x3 + x4, image = TRUE,)
→dev.off()
→par(mfrow = c(2,3))
→persp(yield_model, ~ x1 + x2 + x3 + x4, col = topo.colors(100), contours = "colors")
→jpeg( filename = "/Users/mkaya/Desktop/deneme/model_3D-1.jpeg", width = 30,
height = 20, units = "cm", res = 400, quality = 100, type = c("quartz"))
→par(mfrow = c(2,3))
→persp(yield_model, ~ x1 + x2 + x3 + x4, col = topo.colors(100), contours = "colors")
→dev.off()
→opt_point <- summary(yield_model)$canonical$xs
→opt_point
→op_point_ru <- code2val(opt_point, codings = codings(yield_data))
→op_point_ru
→opt_point_df <- data.frame( x1 = opt_point[1], x2 = opt_point[2], x3 = opt_point[3],
x4 = opt_point[4])
→best_response <- predict(yield_model, opt_point_df)
→names(best_response) <- "Best yield"
→best_response
```

## ÖZ GEÇMİŞ

Mücahit KAYA, Samsun Çarşamba Lisesi'ni bitirdikten sonra İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi'nden 2017 yılında mezun oldu. 2020 yılında OMÜ LEE Moleküler Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans programına girdi. Lisans mezuniyetinden bu yana Diagen Biyoteknolojik Sistemler A.Ş' de Ar-Ge Biyoinformasyon Uzmanı olarak görev yapan Mücahit KAYA, iyi/orta derecede İngilizce bilmektedir. Temel ilgi alanları: Biyoinformatik, Genomik, Proteomik, Mikrobiyoloji ve Nükleik Asit Ekstraksiyon Teknikleri (24.12.2022).

### İletişim Bilgileri

ORCID ID :0000-0001-6793-536X

### Yayınlar:

1. Karagöz, I. K., Munk, M. R., Kaya, M., Rückert, R., Yıldırım, M., & Karabaş, L. (2021). Using bioinformatic protein sequence similarity to investigate if SARS CoV-2 infection could cause an ocular autoimmune inflammatory reactions?. *Experimental eye research*, 203, 108433. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108433>
2. Kizil, M.C., Kilic, O., Ceyhan, M., Iseri Nepesov, M., Karbuz, A., Kurugol, Z., Hacimustafaoglu, M., Celebi, S., Dinleyici, M., Carman, K.B., Bayhan, C., Balliel, Y., Sutcu, M., Kuyucu, N., Kondolot, M., Kara, S.S., Ocal Demir, S., Cay, U., Gayretli Aydin, Z.G., Kaya, M., Dinleyici, E.C. (2021) Nasopharyngeal Meningococcal Carriage among Children and Adolescents in Turkey in 2018: An Unexpected High Serogroup X Carriage. *Children*, 8, 871. <https://doi.org/10.3390/children8100871>
3. Ergünay, K., Kaya, M., Serdar, M., Akyön, Y. & Yılmaz, E. (2021). A cross-sectional overview of SARS-CoV-2 genome variations in Turkey. *Turkish Journal of Biochemistry*, 46(5), 491-498. <https://doi.org/10.1515/tjb-2021-0119>
4. Suskun, C., Kilic, O., Yilmaz Ciftdogan, D., Guven, S., Karbuz, A., Ozkaya Parlakay, A., ... & Dinleyici, E. C. (2022). Intestinal microbiota composition of children with infection with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and multisystem inflammatory syndrome (MIS-C). *European journal of pediatrics*, 181(8), 3175-3191.
5. Kaya, M ve Ay, H. (2022, Aralık). “*Micromonospora craterilacus* NA12 ve *Streptomyces* Sp. MK37H'den birlikte kültürlenme yoluyla desferrioksamin biyosentezinin optimizasyonu”. 9. Uluslararası Marmara Fen Bilimleri Kongresi Kocaeli Üniversitesi, Kocaeli.
6. Yorulmaz, G. Ö. K. N. U. R., Akalın, A. Y. S. E. N., Kalkan, A., Kaya, M., Varis, A., & Dinleyici, E. N. E. R. Intestinal microbiota composition inpatients with type 2 diabetes and effects of 12 weeks of oral anti-diabetic treatment.