

## Irak-Erbil'den Alınan Bazı Toprak Numunelerinden *Streptomyces* Bakterilerinin İzolasyonu, Ekstraselüler Hidrolitik Enzim Kabiliyetlerinin Belirlenmesi ve 16S rDNA Analizi

Farhan Mohammad AWLA, Kerem ÖZDEMİR<sup>1\*</sup>, Metin ERTAŞ

<sup>1</sup> Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, VAN  
\*keremozdemir@hotmail.com

**Özet:** Bu çalışmada Irak'ın Erbil ilinde belli noktalardan alınan toprak numunelerinden *Streptomyces* cinsi bakterileri izole edilerek bazı ekstraselüler enzimlerin aktiviteleri belirlenmiş ve 16S rDNA gen bölgesinin filogenetik analizi yapılmıştır.

Seyreltme plak yöntemi ile 26 farklı *Streptomyces* cinsi bakteri izole edilmiş ve daha sonra saflaştırma işlemi yapılmıştır. İzole edilen 26 *Streptomyces* suşuna yapılan ekstraselüler hidrolitik enzim aktivitesi çalışmalarında 3 izolat ksilinaz aktivitesinde, 19 izolat amilaz aktivitesinde ve 15 izolat proteaz aktivitesinde pozitif sonuç gösterirken hiçbir izolat lipaz aktivitesi göstermemiştir.

Genomik DNA'sı izole edilen 7 izolatın 16S rDNA gen bölgesi 27F ve 1492R evrensel primerleri ile amplifiye edilip sekans analizi yapılmıştır. Bu sonuçlar Mega7.0.18 paket programı ile Maximum Likelihood algoritması kullanılarak filogenetik uzaklık matrisi olan Jukes ve Cantor metodu ile filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Oluşan filogenetik ağaçta NCBI'dan dizileri alınan *Streptomyces* suşları ile çalışmamızda kullanılan suşlar güçlü bir homoloji ile kümelenecek filogenetik analizleri yapılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Erbil, Ekstraselüler enzim, *Streptomyces*, 16S rDNA

## Determination of Extracellular Hydrolytic Enzyme Production Capacity and 16s rDNA Analysis of *Streptomyces* Bacteria Isolated From Some Soil Samples Collected In Erbil Iraq

**Abstract:** At this work, some soil samples taken from different locations from Erbil-Iraq. The *Streptomyces* bacteria by isolating, some extracellular enzymes is determined what activities they do and 16S rDNA gene field's phylogeny analyse has been made.

26 different types of bacteria have been isolated and then purification process has been with dilution plate method. In the extracellular hydrolytic enzyme activity studies on 26 *Streptomyces* strains, no isolate showed lipase activity, whereas 3 isolates showed positive results in xylanase activity, 19 isolate amylase activity and 15 isolate protease activity.

7 isolate which genomic DNA of it isolated, sequence analyse of that has been done by amplified with universal primer as, 16S rDNA gene field 27F and 1492R. With these results phylogenetic tree have been made by using Mega 7.0.18 package and ML algorithm and method of phylogenetic distance matrix of Jukes and Cantor. At the created phylogenetic tree, *Streptomyces* strains that their lines taken by NCBI.

**Keywords:** Extracellular enzyme, Erbil, *Streptomyces*, 16S rDNA

### Giriş

*Streptomyces* bakterileri Gram pozitif toprak bakterileri olup *Actinomycetales* takımına dahildirler. Bu cinsin 900'den fazla tanımlanmış türü mevcuttur. Kompleks bir yaşam döngüsüne sahip olan bu organizmalar uygun koşullar altında funguslara benzer geniş misel formları oluştururlar ancak prokaryotik oluşları ile mantarlardan ayrılırlar (Chater, 2001).

*Streptomyces* bakterileri hem karasal ortamlarda hem de sucul ortamlarda yaygın olarak bulunmaktadır. Çoğu *Streptomyces* tam saprofit olup bir kısmı bitki ve hayvanlarla parazitik ilişki içerisinde (Sembiring ve ark., 2008). *Streptomyces* bakterilerinin doğadaki rolü ile ilgili çok kısıtlı bilgiler olmasına rağmen toprak ekosisteminde özellikle selüloz, nişasta, kitin gibi organik maddelerin degradasyonundan sorumlu ekstraselüler enzimleri üretmeleri ve

madde döngüsünde rol aldıkları bilinmektedir (Cao ve ark., 2004). Toprak aktinomisetleri üzerine yoğunlaşan çalışmalarda, geniş bir yayılım gösteren ve sıklıkla izole edilen *Streptomyces* türleri dikkat çekmektedir.

Genel olarak habitatları toprak olan *Streptomyces* bakterileri yapısal olarak farklı ve biyolojik olarak aktif çok sayıda bileşiğin kaynağı olarak biyoteknolojik açıdan da önemli bir potansiyele sahiptir (Semêdo ve ark., 2004; Hossain ve ark., 2004). *Actinomycetales* takımının bu üyeleri, antibiyotiklerin ve endüstriyel yönden yararlı enzim, enzim inhibitörü gibi sekonder metabolitlerin kaynağı olarak bilinmekle birlikte, şimdiye kadar keşfedilmiş, doğal olarak meydana gelen antibiyotiklerin yarısından fazlasının bu organizmalar tarafından üretildiği bildirilmiştir (Hayakawa ve ark., 2004). Habitatlarındaki rekabete karşı sekonder metabolit sağladığı antogonistik etki sayesinde bazı besin avantajlarına sahip oldukları düşünülmektedir.

Bu sekonder metabolitlerden olan enzimler, hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalize eden protein yapısında moleküllerdir. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata da girmiştir (Wiseman, 1987).

Bu çalışmada Irak'ın Erbil ilinden toplanan toprak numunelerinden *Streptomyces* bakterileri izole edilerek bazı ekstraselüler hidrolitik enzim aktiviteleri belirlenip 16S rDNA analizi ile filogenetik ilişkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

### Materyal ve Yöntem

Bu araştırmanın materyalini; Irak'ın Erbil ilinde farklı noktalardan alınan toprak örnekleri oluşmaktadır.

### Toprak örneklerinden *Streptomyces* bakterilerinin izolasyonu ve saflaştırılması

*Streptomyces* bakterilerin izolasyonu için M65 besi yeri hazırlandı. 1/10'luk ve 1/10.000'lik seyreltmelerden M65 plakların yüzeyine 100µl ilave edilerek iyice yayıldı. Petri kapları 27°C'de 7 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu müteakip üreyerek havasal misel ve substrat miseli oluşturan koloniler, muhtemel *Streptomyces* bakteri kolonileri olarak değerlendirildi. M65 besiyerinde gelişen karışık kültürden steril Bennets agar besiyerlerine öze yardımıyla çizgi plak yöntemi ile ekimler yapılarak saf kültürler elde edildi. Saf kültürler % 20'lik gliserol içeren kriyojenik tüplere aktarılıp derin dondurucuda muhafaza edildi. Tüm izolatların teşhisi için renk gruplandırılması tamlanarak substrat ve havasal misel renkleri belirlendi.

### Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi:

#### Amilaz

İzolatların tümüne Amilaz enzimi üretimi için Bennet's agar hazırlandı ve içerisine %2'lik nişasta ilave edildi. 28 °C'de 4 gün inkübe edildi. Besi yeri üzerine lügol damlatılarak etrafında açık renk zon oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

#### Ksilinaz

İzolatların tümüne ksilinaz enzimi üretimi için Bennet's agar hazırlandı ve içerisine %1 'lik ksilan ilave edildi. 28 °C'de 4 gün inkübe edildi. Koloni etrafında açık renk zon oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

#### Proteaz

İzolatların tümüne Proteaz enzimi üretimi için Bennet's agar hazırlandı ve içerisine %1'lik yağsız süt tozu (Skim milk powder) ilave edildi. 28 °C'de 4 gün

inkübe edildi. Besi yeri üzerinde etrafında açık renk zon oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

### Lipaz

İzolatların tümüne lipaz enzimi üretimi için Bennet's agar hazırlandı ve içerisine %2'lik Tween 80 ilave edildi. 28°C'de 4 gün inkübe edildi. Besi yeri üzerine %0,001'lik rodamin B ilave edildi. Koloniler etrafında açık renk zon oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

### 16S rDNA Geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) İle Çoğaltılması

İzole edilen bakterilerden genomik DNA izolasyonu için Ausubel ve ark., (1994) metodu modifiye edilerek kullanıldı. Bakterilerin bütün hücre DNA'sı izole edildikten sonra 27F ve 1492R (Lane, 1991) primerleri kullanılarak 16S rDNA gen bölgesi amplifiye edildi. PCR programı başlangıç 95°C'de 5 dk, 35 döngü, denatürasyon için 95°C'de 1 dk, anneling 55°C'de 1 dk, uzama için 72°C'de 1 dk ve son olarak 72°C'de 10 dk olarak ayarlandı. PCR'da çoğaltılmış 16S rDNA'ları % 1'lik 0.5 µg/ml ethidium bromide içeren agaroj jelle (0.5 X TBE tampon) koşturuldu. Yaklaşık 5 µl PCR ürünü jel yükleme boyası ile birlikte karıştırılarak jelle yüklendi ve 100 voltta 1 saat boyunca koşturuldu.

### 16S rDNA Gen Bölgesinin Analizi

16S rDNA sekanslama ABI PRISM<sup>R</sup> BigDye<sup>TM</sup> FS, *AmpliTaq<sup>R</sup>* DNA Polimeraz içeren Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit kullanılarak PE Applied Biosystems tarafından önerilen protokole göre yapıldı. NCBI/GenBank (Benson ve ark., 2004), EMBL (European Molecular Biology Lab., Kanz ve ark., 2005) gibi databanklar aracılığıyla

*Streptomyces* 16S rDNA nükleotid baz dizileri MEGA 7 programı kullanılarak hem veri tabanındaki yakın türlerle hem de kendi aralarında analiz edildi ve filogenetik pozisyonlarını belirlemek için dendogramları oluşturuldu.

### Bulgular

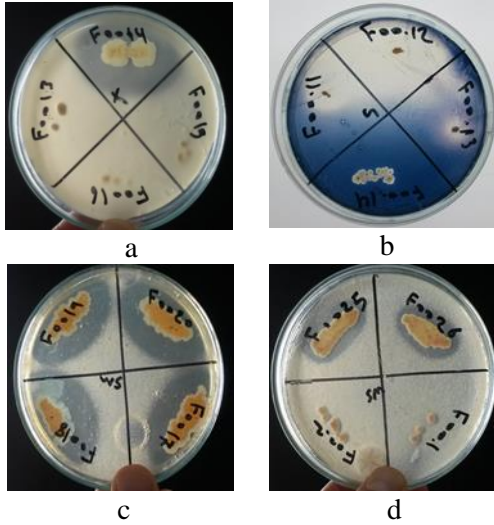
Bu çalışmada toplanan 4 toprak numunesinden *Streptomyces* bakterilerinin izolasyonu yapıldı. Cycloheximid (50 ug/ml), Nystatin (50 ug/ml), Novabiosin (50ug/ml) antibiyotikler eklenmiş M65 besiyerinde gelişen *Streptomyces* kolonileri diğerlerinden oluşturdukları karakteristik misel ve pigment durumlarına göre seçildi ve toplam 26 *Streptomyces* bakterisi izole edildi.

### Renk Gruplandırması

Saflaştırılan toplam 26 *Streptomyces* izolatu Oatmeal Agar besiyerine ekilerek sarı, beyaz ve kahverengi havasal misel oluşturmuş ve 3 renk grubuna ayrılmıştır.



Şekil 1. Saflaştırılmış *Streptomyces* suşları



Şekil 2. Bazı suşların enzim aktiviteleri (a:Ksilanaz aktivitesi; b:Amilaz aktivitesi; c,d:Proteaz aktivitesi).

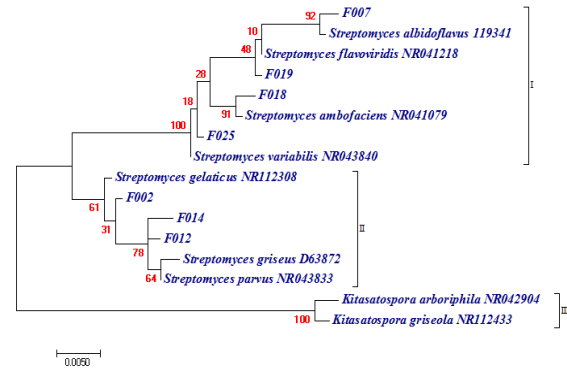
### Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Yapılan enzim aktivite çalışmalarında toplam 26 *Streptomyces* izolatının %73'ü amilaz, %57'si proteaz, %11'i Ksilanaz aktivitesi gösterirken izole edilen suşlardan hiçbiri Lipaz aktivitesi göstermemiştir (Şekil 2).

### 16S rDNA Geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) İle Çoğaltılması ve 16S rDNA Gen Bölgesinin Analizi

Temsilci olarak seçilen 7 *Streptomyces* bakterisinden saf olarak elde edilmiş DNA örneklerinin 16S rDNA genini kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu için evrensel iki primer 27F ve 1492R (Lane, 1991) kullanılarak Thermal Cycler (MyGenie-96 Gradient Thermal Cycler, Korea)' da PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Amplifiye ürünler %1,5'lik kontrol agaroz jelde (40 ml 1xTBE tampon, 0,4 g agaroz) 100 Voltta 45 dakika DNA markör ile birlikte yürütüldü. 7 izolatın 16S rDNA gen sekanslarını taksonomik hiyerarşiye sokabilmek için BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)

kullanılarak Gen Bankasındaki veritabanı ile karşılaştırılmıştır. Test organizmaları ve ilgili cinslerin tip türlerinin dizi analizine bağlı filogenetik dendrogramları Maximum Likelihood algoritması kullanılarak oluşturuldu. Maximum Likelihood algoritması için filogenetik uzaklık matrisi Jukes-Cantor metodu izlenerek gerçekleştirildi (Jukes ve Cantor, 1969). Filogenetik analizler için oluşturulan filogenetik ağaçların bootstrap analizleri 1000 tekrarlı olarak MEGA 7 (Kumar ve ark., 2008) paket programında gerçekleştirildi. *Streptomyces* filogenetik dendrogramında *Streptomycetacea* familyasının bir üyesi olan *Kitasatospora* cinsi dış grup olarak kullanıldı. *Streptomyces* gruplarını temsil eden çalışma izolatları ve ilgili tip türlerinin 16S rDNA nükleotid dizileme analizleri sonucu Maximum Likelihood matrisiyle oluşturulan filogenetik ağaçlar Şekil 3'te verilmiştir. Oluşturulan filogenetik ağaçta *Streptomyces* bakterileri kendi içinde kümelendiği gözlenmiştir.



Şekil 3. 16S rDNA analizi sonucu oluşan Maximum Likelihood filogenetik ağacı.

### Tartışma ve Sonuç

Günümüzde, aktinomisetlerin sistematigi nümerik, kemotaksonomik ve moleküler metotların bir bütünü olarak

açıklanmaya çalışılmaktadır. Polifazik taksonomi olarak nitelendirilen bu üçlü yaklaşım ile mikroorganizmaların tür seviyesinde tanımlanması daha doğru ve net olarak yapılabilmektedir. Polifazik taksonomi, kimyasal, moleküler ve fenotipik analizlerden elde edilen verilerin birlikte değerlendirilmesi ve bu verilerin birbiri ile uyumlu olması esasına dayanmaktadır. Moleküler sistemattaki önemli gelişmeler genom organizasyonu, genom replikasyonu ve değiştirilen genom kompozisyonu olarak bilinen birçok mekanizmayla düzenlenebilmektedir (Brown-Elliott ve ark., 2006 ).

Mikrobiyal yolla enzim üretiminin ilk aşaması uygun mikroorganizmanın seçimidir. Kültür ortamı ve fermantasyon koşulları da enzim üretimini etkileyen önemli parametrelerdir. Ortam içeriğinin optimize edilmesi amacıyla farklı kaynaklı karbon, azot ve metal iyon kaynakları kullanılmaktadır.

Enzimler, endüstride hemen her alanda kullanılabilen ve bu alanların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Bu nedenle birçok bilim adamı doğal kaynaklardan bakteri izolasyonuna gitmekte, böylelikle yeni türlerin ortaya çıkması sağlanmaktadır. Çalışmamızda ekstraselüler hidrolitik enzimlerden amilaz, lipaz, ksilanaz ve proteaz enzimleri endüstriyel alanda en sık kullanılan ve izole ettiğimiz suşların çoğunda aktivitesini belirlediğimiz enzimler olup Ramesh ve Mathivanan (2009) yapmış olduğu marin actinomycetes ve *Streptomyces* bakterilerinin enzim üretim çalışmalarına paralellik göstererek amilaz enziminin % 73'ünde, proteaz enziminin %57'sinde pozitif sonuçlar gösterdiği göze çarpmaktadır.

Bu çalışmada, türler arasındaki genetik uzaklığı belirlemek için filogenetik analizlere uygun formatlara

getirilmiş 16S rDNA dizileri, Maksimum Likelihood algoritmasına tabi tutulmuştur. Analiz sonucunda oluşan filogenetik ağaçta *Streptomyces* bakterileri güçlü bir homoloji ile kümelenmiştir. Dış grup olan *Kitasatospora* cinsinde bu familyaya üye olup ayrı bir küme oluşturarak bu analizin güvenilirliğini pekiştirmiştir.

*Streptomyces* cinsine ait toplam 7 izolatın 16S rDNA gen bölgesi filogenetik analizlerinde; F007 nolu izolatın karşılaştırılan 1379 nt'lik bölgede 5 nükleotit farklılığı ve % 99,7 benzerlik ile *Streptomyces albidoflavus* 119341'a, F019 nolu izolatının karşılaştırılan 1379 nt'lik bölgede 15 nükleotit farklılığı ve % 98,7 benzerlik ile *Streptomyces variabilis* NR043840'e, F025 nolu izolatın karşılaştırılan 1379 nt'lik bölgede 15 nükleotit farklılığı ve % 98,7 benzerlik ile *Streptomyces flavoviridis* NR041218'e ve F018 nolu izolatın karşılaştırılan 1379 nt'lik bölgede 4 nükleotit farklılığı ve % 99,7 benzerlik ile *Streptomyces ambofaciens* NR041079'e e benzerlik gösterdiği belirlenmiş ve I. kümede olduğu görülmüştür. F012 nolu izolatın karşılaştırılan 1379 nt'lik bölgede 5 nükleotit farklılığı ve % 99,7 benzerlik ile *Streptomyces parvus* NR043833'a, F014 nolu izolatın karşılaştırılan 1379 nt'lik bölgede 7 nükleotit farklılığı ve % 99,3 benzerlik ile *Streptomyces griseus* D63872'a ve F002 nolu izolatın karşılaştırılan 1379 nt'lik bölgede 6 nükleotit farklılığı ve % 99,4 benzerlik ile *Streptomyces gelaticus* NR112308'a benzerlik gösterdiği belirlenmiş ve II. kümede olduğu görülmüştür.

Bu çalışmanın sonucunda, F002, F007, F012, F014, F018, F019 ve F025 nolu izolatların 16S rDNA gen bölgesi analizi ile en yakın tip türlerinden farklılıkları belirlenmiştir. İlgili toprak izolatlarına uygulanacak DNA-DNA homolojisi, tüm hücre analizleri,

detaylı yağ asidi ve menaquinon analizleri gibi kimyasal karakterizasyon, elektron mikroskopisi spor morfolojisi görüntüleme ve en yakın ilişkili oldukları tip türleriyle yapılacak nümerik testlerle literatüre birer yeni tür olarak kazandırılması amaçlanmaktadır. Bu

çalışmanın olası yeni türlerin sistematik konumlarını kazanmaları ve aynı zamanda yakın disiplinlere de enzim ve aktif bileşik gibi konular için araştırma materyali kazandıracağını da düşünmekteyiz.

### Kaynaklar

- Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., Wheeler, D. L., 2004. GenBank: update. *Nucleic Acids Res.* 32, D23 – D26.
- Brown-Elliot, B.A., Brown, J.M., Conville, P.S., Wallace, R.J., 2006. Clinical and Laboratory features of the *Nocardia* spp. Based on current molecular taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.*, 19: 259-282.
- Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H., Zhou, S., 2004. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Letters in Applied Microbiology*, 39: 425-430.
- Chater, K. F., 2001. Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3 (2): a checkpoint multiplex? *Current Opinion in Microbiology* 4:667–673.
- Hayakawa, M., Yoshida, Y., Iimura, Y., 2004. Selective isolation of bioaktive soil Actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 973-981.
- Hossain, M. S, Hossain, M. A, Rahman, M. M., Mondol, M. A., Bhuiyan, S. A., Gray, A. I., Flores, M. I., Rashid, M. A., Amides from the fungus *Streptomyces hygrosopicus* and their antimicrobial activity. *Phytochemistry* 65:2147–2151.
- Jukes, T.H., Cantor, C.R., 1969. Evolution of protein molecules. In *Mammalian protein metabolism*, vol. 3, Edited by H.N. Munro. New York: Academic Press., 21-132.
- Kanz, C., Aldebert, P., Althorpe, N., Baker, W., Baldwin, A., Bates, K., Browne, P., van den Broek, A., Castro, M. and other authors 2005. The EMBL nucleotide sequence database. *Nucleic Acids Res* 33, D29–D33.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., Tamura K., 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefing in Bioinformatics*, 9 (4): 299-306.
- Lane, D. J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115–175. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. New York: Wiley.
- Ramesh, S. ve Mathivanan, N., 2009. Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. *World J. Microbiol Biotechnol* 25:2103–2111.
- Sembring, L., Ward, A., C., Goodfellow, M., 2000. Selective isolation and characterisation of members of the *Streptomyces violaceusniger* clade associated with the roots of *Paraserianthes falcataria*. *Antonie van Leeuwenhoek* 78, Numbers 3-4, 353-366.

- Semêdo, L., Gomes, R. C., Linhares, A. A., Duarte, G. F., Nascimento, R. P., Rosado, A. S., Margis-Pinheiro, M., Margis, R., Silva, K., Alviano, C. S., Manfio, G. P., Soares, R., Linhares, L. F., Coelho, R., 2004. *Streptomyces drozdowiczii* sp. nov., a novel cellulolytic streptomycete from soil in Brazil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54: 1323-1328.
- Wiseman, A., 1987. Handbook of Enzymes Biotechnology. Second Edition. Chapter The Application of Enzymes in Industry p. 274-373.