

---

*Araştırma Makalesi / Research Article*

---

## **Sapanca Gölü (Sakarya) Havzası Toprak ve Sedimentlerinden *Streptomyces* Cinsi Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Teşhisi**

Dilara Hande ÜNAL<sup>1</sup>, Kerem ÖZDEMİR<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Van Yüzcü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Van

<sup>2</sup>Bandırma On Yedi Eylül Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Bandırma, Balıkesir

---

### **Öz**

Bu çalışmada, Sakarya ili sınırlarında bulunan Sapanca Gölü havzası toprak ve sedimentlerinden *Streptomyces* cinsi bakterileri izole edilerek karakterizasyon ve teşhisi yapılmıştır. Toplam 6 farklı lokaliteden alınan 12 toprak numunesinin fiziko-kimyasal analizleri yapılmış ve pH'larının 6,12 ile 7,58 değerleri arasında olduğu saptanmıştır. Saflaştırılan 60 *Streptomyces* izolatu havasal, misel ve difüzye pigment rengi esas alınarak 4 ana gruba ayrılmıştır. *Streptomyces* izolatlarına, antibiyotik duyarlılığı, degradasyon aktivitesi, büyüme, azot ve karbon kaynağı kullanımı testleri uygulanmıştır. Tüm izolatların fenotipik ve biyokimyasal karakterleri belirlenerek IDENTAX bilgisayar programına bu veriler aktarılmış, cins içerisindeki pozisyonları belirlenerek teşhisleri yapılmıştır. Teşhis edilenler türler arasında *Streptomyces cyaneus*, *Streptomyces filipinensis*, *Streptomyces exfoliatus*, *Streptomyces chromogenus*, *Streptomyces chromofuscus*, *Streptomyces griseoruber*, *Streptomyces antibioticus*, *Streptomyces lydicus*, *Streptomyces lavendulae* ve *Streptomyces purpureus* türleri bulunmaktadır. Teşhisleri tamamlanan *Streptomyces* izolatlarının test sonuçları MVSP 3.2 bilgisayar programı ile birbirleri arasındaki benzerlik dendogramları oluşturulmuştur. Renk kümelerini temsilen seçilen 4 suşun DNA izolasyon ve dizi analizleri yapılmış ve 27F ile 1492R evrensel primerleri kullanılarak 16S rDNA geni kısmi olarak PCR ile çoğaltılmıştır. Bu dört bakterinin GenBank veri tabanındaki türlerle olan akrabalık dereceleri ve genetik pozisyonları dendogramlar şeklinde ortaya konmuştur.

**Anahtar kelimeler:** *Streptomyces*, 16S rDNA, Sapanca Gölü.

---

## **Isolation, Molecular Characterization and Identification of Bacteria the Genus *Streptomyces* from Basin Sedimentary Soil of Sapanca Lake (Sakarya)**

---

### **Abstract**

In this study, *Streptomyces* bacteria were characterized and identified after being isolated from the soil and sediments of Lake Sapanca in Sakarya province. Physico-chemical analyzes of 12 soil samples taken from 6 different localities on total, were carried out. It was determined that the pH values of the soil samples were between 6.12 and 7.58. The purified 60 *Streptomyces* isolates were divided into 4 main groups based on air, micelle and diffuse pigment colour. *Streptomyces* isolates were analysed and tested for antibiotic susceptibility, degradation activity, growth, nitrogen and carbon source use. Phenotypic and biochemical characteristics of all isolates were determined and these data were transferred to IDENTAX computer program and their positions were identified and diagnosed. Species identified include *Streptomyces cyaneus*, *Streptomyces filipinensis*, *Streptomyces exfoliatus*, *Streptomyces chromogenus*, *Streptomyces chromofuscus*, *Streptomyces griseoruber*, *Streptomyces antibioticus*, *Streptomyces lydicus*, *Streptomyces lavendulae* ve *Streptomyces purpureus*. The test results of the *Streptomyces* isolates, which have been diagnosed, were compared with the MVSP 3.2 computer program to establish similarity dendograms. DNA isolation and sequence analysis of 4 selected colonies were performed and 27F and 1492R universal primers were used to amplify the 16S rDNA gene partially by PCR. The genesis and genetic positions of these four bacteria with the species in the GenBank database are presented as dendograms.

**Keywords:** *Streptomyces*, 16S rDNA, Lake Sapanca.

---

\*Sorumlu yazar: [keremozdemir@bandirma.edu.tr](mailto:keremozdemir@bandirma.edu.tr)

Geliş Tarihi: 14.03.2019, Kabul Tarihi: 30.07.2019

## 1. Giriş

1928 yılında Alexander Flaming'in ilk doğal antibiyotik olan penisilini keşfi ile *Streptomyces* çalışan bilim insanları bu bakterilerde doğal sekonder metabolit arayışına hızlı bir giriş yapmışlardır. *Streptomyces* bakterilerinin doğal sekonder metabolitleri üzerine çalışmalar, Waksman ve öğrencisi Albert Schatz'ın *Mycobacterium tuberculosis*'e karşı ilk etkili antibiyotik olan *Streptomyces griseus*'un bir ürünü; streptomycin'i keşfetmesi ile hız kazanmıştır [1]. Bu keşifle beraber 1950 ve 1960'lı yıllarda çok sayıda antibakteriyel ve antifungal antibiyotikler bulunmuş ve bu dönem antibiyotik keşiflerinin Altın Çağ'ı olarak adlandırılmıştır [2,3]. Bu doğrultuda *Streptomyces* türlerinin ürettiği biyoteknolojik açıdan önemli primer ve sekonder metabolitlerden dolayı son 40 yıl içerisinde dünya çapında daha geniş çalışmalar yapılmıştır [4].

*Streptomyces* türleri Gram-pozitif, aerobik, katalaz pozitif, asit-fast olmayan, G+C oranı %69-78 arasında değişen ve yaşam döngüleri süresince morfolojik farklılaşma gösteren bakterilerdir. *Streptomyces* türleri çoğu bakteri türünde görülmeyen miselyumlardan oluşmaktadırlar. Uygun şartlarda toprakta bulunan dinlenme halindeki sporları, henüz bilinmeyen bir sinyal yoluyla vejetatif ve sonrasında havasal miselyumları oluşturur [5]. Çoğunlukla *Streptomyces* türleri topraktan izole edilmelerine rağmen hem sucul hem de karasal habitatlarda oldukça geniş dağılım gösterirler [6,7]. İzolatların dünyanın birçok farklı bölgesinden izole edilmeleri bu durumu açıklamaktadır. *Streptomyces* bakterileri toprakta saprofit olarak yaşarlar ve bitki ve hayvan kısımlarının ayrıştırılmasında önemli bir role sahiptirler. Çoğunlukla da kitin, polisakkarit, protein, aromatik bileşenler ve lignoselülozu içeren tortuların degradasyonundan sorumlu ekstraselüler enzimler üretirler. *Streptomyces* türleri bir lignoselüloz bileşiğindeki selüloz ve hemiselüloz ile birlikte doğada bulunan lignini ayrıştırabilir. Bundan dolayı besinlerin döngüsüne ve dönüştürülmesine katkı sağlamaktadırlar [7]. Ayrıca birçok türü toprak fungusunu parçalar ya da inhibe eder.

*Streptomyces* türleri actinomisetler arasında ekonomik açıdan önemli bir gruptur. Çünkü sekonder metabolit üreticilerin başında gelirler. 23000'den fazla bilinen mikrobiyal sekonder metabolitin %42'si Aktinobakterler, %42'si funguslar ve %16'sı diğer bakteriler tarafından üretilir. Günümüze kadar bilinen antibiyotiklerin yaklaşık üçte ikisi Aktinobakteriler tarafından, bunların da yaklaşık %75'i *Streptomyces* bakterileri tarafından üretilir [8]. Ayrıca *Streptomyces* türlerinin ürettiği diğer değerli metabolitler; immunosupressif (bağışıklık baskılayıcı), pestisit, antifungal, antiviral, antioksidan, antitümoral, antiparazitik, antihipertansif (kan basıncını düşüren) ve antikanser ilaçlarını kapsar. Bu kapasitelerinden dolayı *Streptomyces* bakterileri prokaryotlar arasında ayrı bir öneme sahiptir.

## 2. Materyal ve Metot

Bu araştırmanın materyalini; Sapanca Gölü (Sakarya) çevresinden toplanan sediment örnekleri oluşmaktadır.

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

Toplanan sediment örneklerinin ilk olarak pH ölçüldü ve nem tespitleri yapılmıştır. *Streptomyces* bakterilerin izolasyonu için M65 ve SM3 besi yeri hazırlandı. 1/10'luk ve 1/10.000'lik seyreltmelerden M65 ve SM3 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 ve SM3 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. Saflaştırılan suşların renk gruplandırması için oatmeal agar (ISP 3) [9]; besiyerine çizgi ekim metoduyla ekim yapıldı. İzolatlar 14 gün 28°C'de inkübe edildikten sonra havasal miselyum rengi ve substrat miselyum renkleri renk kataloğuna göre tespit edildi ve gruplandırma yapıldı.

## 2.2. Potansiyel *Streptomyces* suşlarının karakterizasyonu ve teşhisi

60 potansiyel *Streptomyces* izolatu Uluslararası *Streptomyces* Projesi tarafından verilen talimatlara uyarak karakterize edildi [9-11]. Makro-morfolojik, mikro-morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasallar ile kemotaksonomik özellikleri belirlendi. Fizyolojik ve biyokimyasal testler tuz toleransı, karbon kullanımı, azot kaynakları, melanin sentezi, degradasyon testleri, antibiyogram, gelişim testlerini içermiştir [12].

Test organizmaları Williams ve arkadaşları tarafından belirtilen major *Streptomyces* grupları için tespit edilen teşhis matrislerine göre teşhis edildi [7]. Bilgisayar yardımıyla teşhis için IDENTAX Bacterial Identifier 1.2 programı kullanıldı. Seçilmiş olan 60 *Streptomyces* test suşu için yapılan 61 farklı test sonuçlarının MVSP 3.2 (Multi-Variate Statistical Package) programında  $S_{SM}$  (Simple Matching Coefficient) konfisyentlerine göre UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average Cluster) analizleri yapıldı ve dendogram oluşturuldu. Spor zincir morfolojisi elektron mikroskobu (SEM) ile belirlendi.

## 2.3. Genomik DNA'nın izolasyonu ve saflaştırılması

Çalışmada renk gruplandırması ve nümerik analiz sonucu elde edilen dendogram gruplarına göre toplam 4 test organizması seçilerek, her bir suşun tek bir kolonisi alındı 7 gün boyunca 28 °C'de M65 agar besiyerinde geliştirildi. İzole edilen bakterilerden genomik DNA izolasyonu için Ausubel ve arkadaşlarının metodu modifiye edilerek kullanıldı [13].

## 2.4. 16S rDNA geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılması

Bakterilerin bütün hücre DNA'sı izole edildikten sonra 27F ve 1492R evrensel primerleri kullanılarak 16S rDNA gen bölgesi amplifiye edildi [14]. PCR programı başlangıç 95°C'de 5 dk, 35 döngü, denatürasyon için 95°C'de 1 dk, annealing 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 jelde (0.5 X TBE tampon) koşuturuldu. Yaklaşık 5 µl PCR ürünü jel yükleme boyası ile birlikte karıştırılarak jele yüklendi ve 100 voltta 1 saat boyunca koşuturuldu [15]. Temsilci test organizmalarının 16S rDNA amplifikasyon ürünleri saflaştırıldıktan sonra hedef bölgenin baz dizilimi ABI PRISM Genetic Analyzer otomatik sekanslama cihazı kullanılarak elde edildi.

## 2.5. Sekans benzerlikleri ve filogenetik analiz

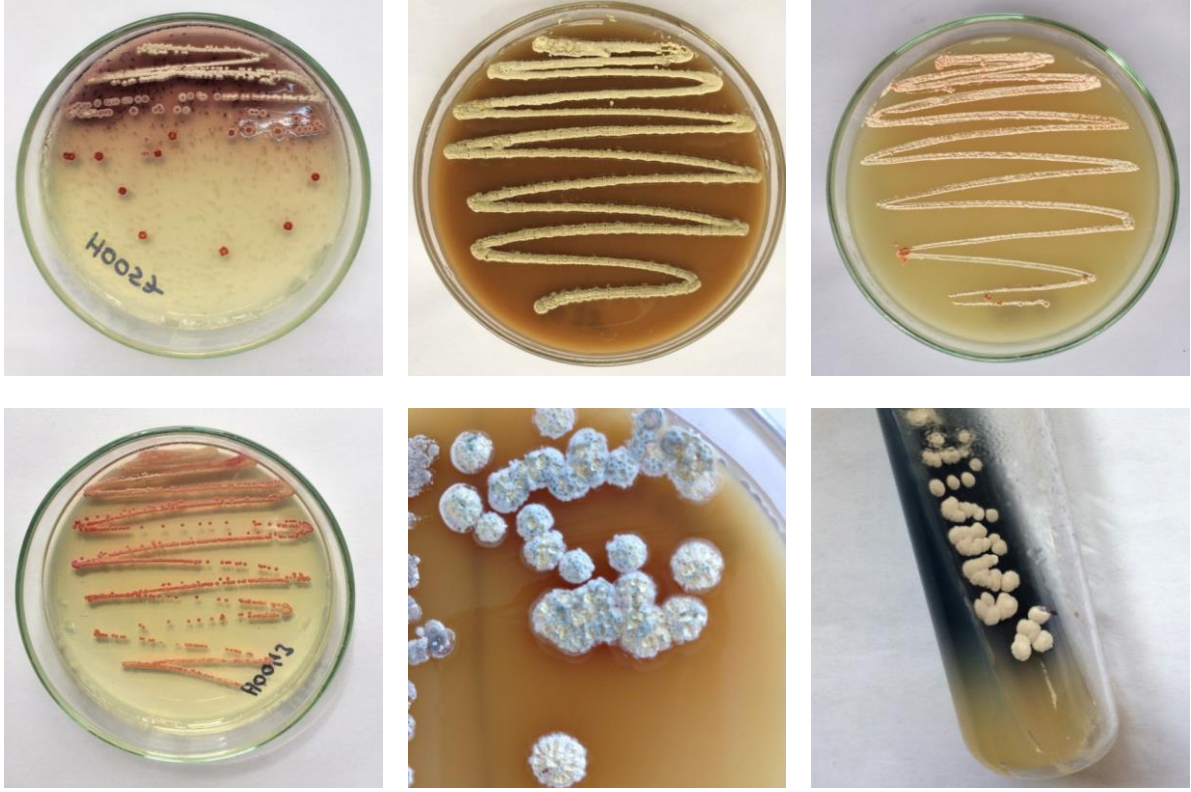
NCBI/GenBank data bank aracılığıyla *Streptomyces* 16S rDNA nükleotid baz dizileri Mega7 programı kullanılarak hem veri tabanındaki yakın türlerle hem de kendi aralarında analiz edildi. Tüm izolatların 16S rDNA nükleotid baz dizileri filogenetik dendogramların oluşturulması için kullanıldı. İzolatların baz dizileri NCBI gen bankasına kaydedildi ve giriş numaraları (accession number) alındı. Mega7 programı ile neighbour-joining metodu kullanılarak türlerin sekans yapılan gen bölgelerine göre filogenetik pozisyonları ve benzerlik oranları belirlendi. Türlerle en yakın en az üç takson ile benzerlik oranları tablo olarak sunuldu ve son olarak türlerin akrabalık durumlarının şematize edildiği dendogramlar oluşturuldu.

## 3. Bulgular ve Tartışma

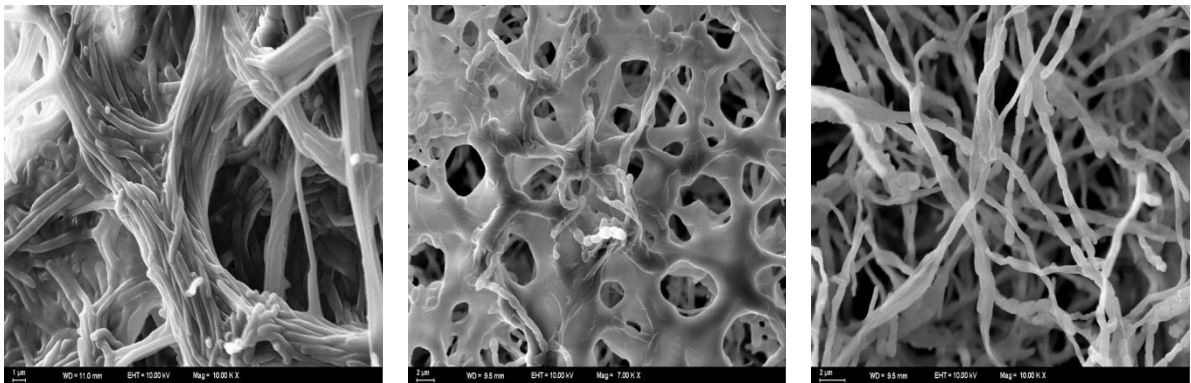
Sakarya-Sapanca Gölü ve çevresinden alınan 12 toprak numunesinin izolasyon öncesinde ölçülen pH değerleri 6,12 ile 7,58 arasında değişiklik gösterdi. Bennett's Agar besi ortamında saflaştırılan toplam 60 *Streptomyces* suşu Oatmeal Agar besi ortamında ekim sonucu test izolatları 4 renk grubuna ayrıldı. Renk gruplandırması substrat, havasal miselyum ve difüziye pigment rengi dikkate alınarak yapıldı. Oluşan 4 renk grubu sırasıyla 29 (beyaz), 7 (sarı), 22 (gri) ve 2 (krem) test organizması içerdi.

Bilgisayar yardımıyla teşhis için IDENTAX Bacterial Identifier 1.2 programı kullanıldı. Bu program yardımıyla test suşlarının major taksonlar için oluşturulan matrislere göre teşhisleri yapıldı. Sonuçta 60 *Streptomyces* suşundan 20 tanesi %85'in altında benzerlik gösterdi. Seçilmiş olan 60 *Streptomyces* test suşu için yapılan 61 farklı test sonuçlarının MVSP 3.2 (Multi-Variate Statistical

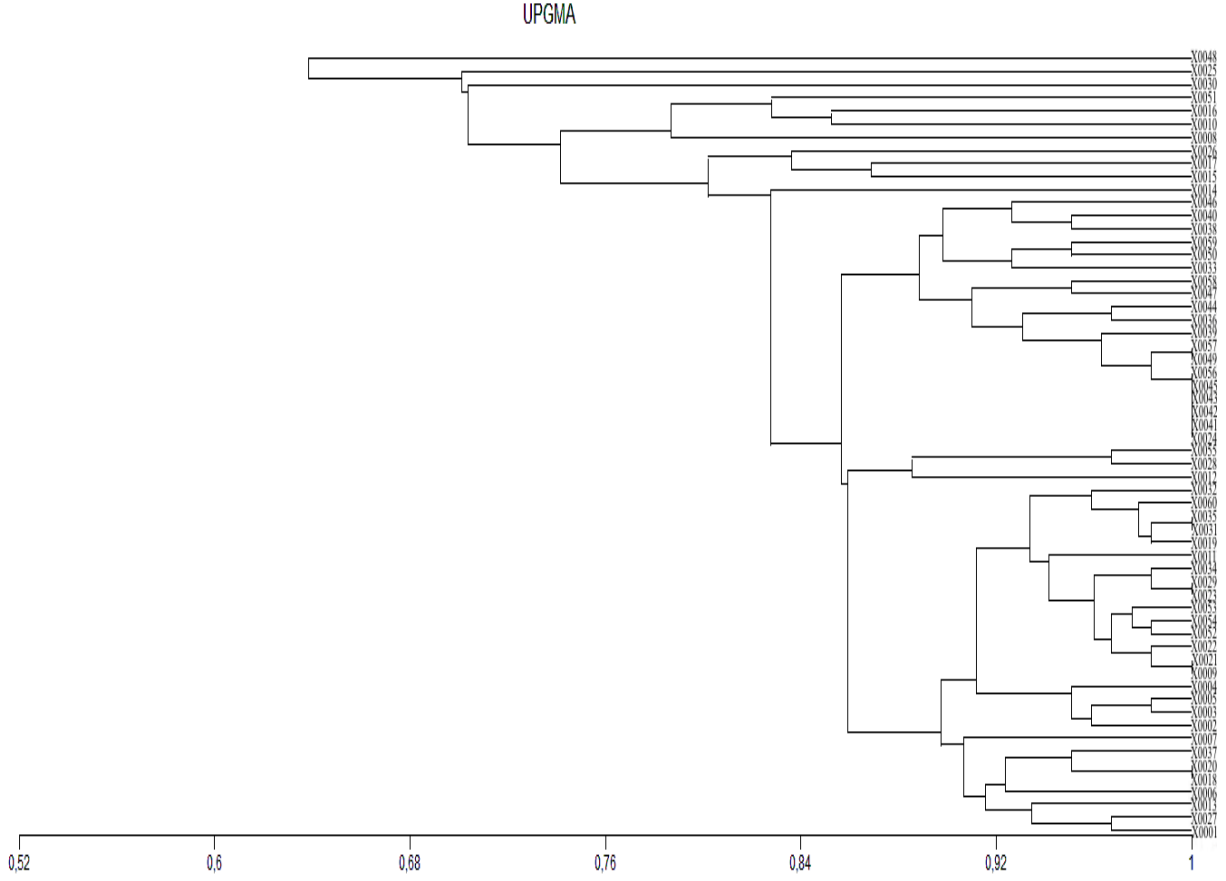
Package) programında SSM konfisiyentlerine göre UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average Cluster) analizleri yapıldı. SSM-UPGMA (Simple Matching Coefficient) konfisiyent analizlerine göre seçilen mikroorganizmaların dendogramı oluşturuldu. Dendogram %85 benzerlik oranına göre toplam 3 küme oluşturdu. Bu kümelerin 1'i major, 2'si minör iken, 7 tanesi tekli üyedir.



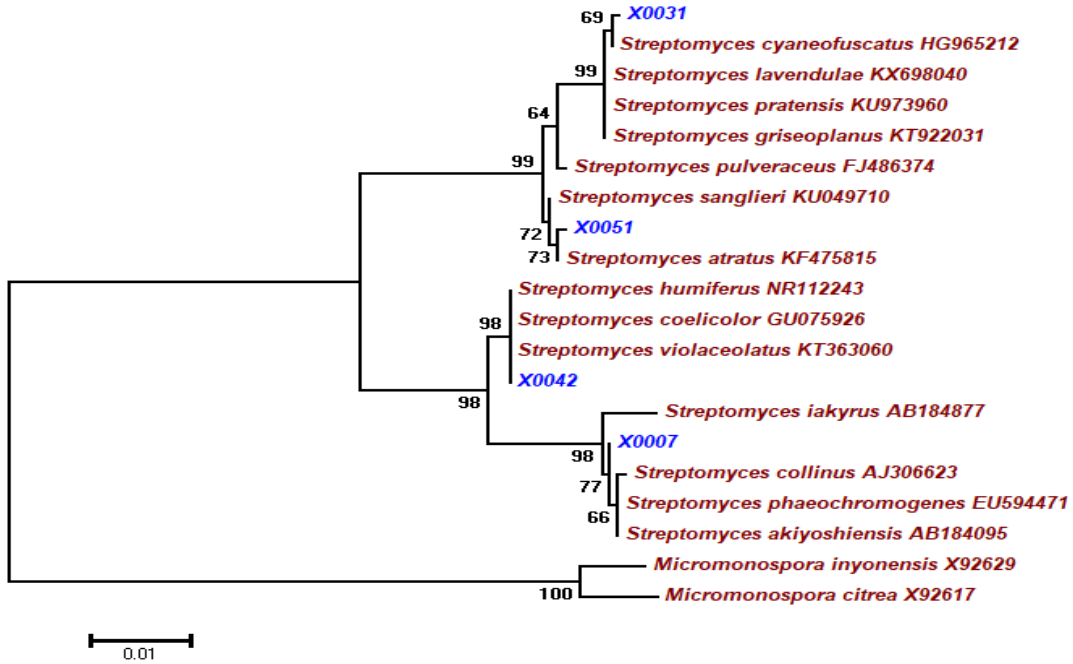
Şekil 1. Saflaştırma çalışmalarında *Streptomyces* suşlarının Medium 65 ve Bennet's Agar besi ortamlarında 27°C'de 14 gün inkübasyon sonucu gelişen kolonileri



Şekil 2. Bazı *Streptomyces* türlerinin koloni gelişiminin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenmesi



Şekil 3. 60 *Streptomyces* test izolatu için 61 farklı karakter bakımından uygulanan test sonuçlarının MVSP 3.2. (Multi Variate Statistical Package) programı (SSM) Simple Matching Coefficient ile oluşturulan dendrogram



Şekil 4. *Streptomyces* izolatlarının 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre Mega7 programı ile oluşturulan filogenetik dendrogramı

*Streptomyces* bakterileri genelde su ve toprağı içeren bütün ekosistem tiplerinde bulunurlar ancak toprak ortamını diğerlerine tercih ederler [24]. Özdemir ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada toprakta izole edilen 139 *Streptomyces* suşu 39 renk grubuna ayrılmıştır [25]. Biz de çalışmamızda koloni sayım sonuçlarına göre göl içerisinden alınan toprak numunelerinde daha az *Streptomyces* bakterisine rastlamış olmamız literatürler ile paralellik göstermektedir.

Morfolojik tanıda önemli bir kriter olan renk tespitleri, olgunlaşmış ve spor vermiş kültürler üzerindeki havasal ve substrat miselyum rengine, difüziye pigment üretip üretmediğine, varsa rengine bakılarak yapılmaktadır. Renk tespitleri için kullanılan ortam literatürlerde belirtilmiş olan Oatmeal besi ortamıdır ve gözlemler 7, 14 ve 21. günlerde kuzeye bakan bir pencerede parlak gün ışığında yapılmalıdır [9]. Bunlar göz önünde bulundurularak izole edilen 60 *Streptomyces* suşu 4 renk grubuna ayrıldı. Oluşan bu gruplar Atalan ve arkadaşları tarafından bildirilen sonuçlarla paralellik gösterdi [26]. *Streptomyces* suşlarının yapılan testler doğrultusunda bilgisayar yardımıyla teşhisleri için IDENTAX Bacterial Identifier 1.2 programı kullanıldı. Bu program yardımıyla test suşlarının major taksonlar [11] için oluşturulan matrikse göre teşhisleri yapıldı. Bu matriks ile teşhis edilen suşların mevcut benzerlik matriksleri içerisinde en fazla benzerlik gösterdikleri tür en yakın takson olarak kabul edildi. Sonuçta toplam 60 *Streptomyces* suşundan 20 tanesi mevcut taksonomik gruplarda yer alan türlerle %85'in altında benzerlik gösterdi. Yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında %85'in altında benzerlik gösteren tür sayısının fazla olduğu belirlendi. Williams ve arkadaşları tarafından programa girilmesi önerilen veri sayısı en az 50 olmalıdır [19]. Teşhis matriksi mevcut *Streptomyces* türlerin verilerini tam içermediği için eksik kalmaktadır.

Nümerik analiz için uygulanan 61 test sonucunun tamamı MVSP 3.2 (Multi-Variate Statistical Package) programına 1/0 olarak girildi. UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic average) Cluster Analizi yapıldı ve  $S_{SM}$  (simple matching coefficient) benzerlikleri dendogramları oluşturuldu. Oluşturulan dendogramda  $S_{SM}$  sonuçlarına göre %85 benzerlik oranı esas alındığında 2 minör, 1 major küme, 7 tane tekli üye oluştu. Major küme 49 izolat içerdi. Dendogramda aralarındaki benzerlik oranı %100 olan türlerin çoğunlukla aynı lokalitelerden izole edildiği görüldü.

*Streptomyces* türlerini teşhis etmek için morfolojik özellikleri ve karbon kaynaklarını kullanma özelliklerine dayanan tanılama metotları günümüzde hala kullanılmakta olan ve geçerliliği olan metotlardır. Morfolojik ve fizyolojik metotlar ile tanı çalışmaları için kolonilerin çok iyi sporulasyon vermiş olması gerekir. *Streptomyces* türleri ise 15-20 gün hatta bazen daha fazla bir sürede spor verebilmektedirler. Kültürlerin spor zincirlerin şeklinin de gözlenmesi için kolonilerin tam sporulasyon vermiş olması gerekir. Ancak kültürlerin spor zincir morfolojilerinde zamanla değişiklikler olacağından dolayı fazla yaşlanmamış olması gerekir. Yani *Streptomyces* türlerinin morfolojik ve fizyolojik özelliklerine dayanılarak yapılan tanı çalışmaları hassasiyet, zaman ve emek ister. Bu nedenle *Streptomyces* türlerinin teşhisine yönelik çalışmalarda hız ve pratiklik kazanmak için moleküler metotlara başvurulur. Ayrıca güvenilirlik sorunu olmadığı için moleküler metotlar önemli bir yer almıştır. Moleküler metotlardan biri olan 16S rDNA gen dizileme filogenetik akrabalığın değerlendirilmesinde ve bakterilerin taksonomik pozisyonlarının belirlenmesinde temeli oluşturan bir tekniktir [18].

Bu çalışmada, renk gruplarını temsilen seçilen X0007, X0031, X0042 ve X0051 izolatlarının 16S rDNA gen bölgesi 27F ve 1492R primerleri ile çoğaltılmıştır. Bu gen bölgesinin sekans analizi sonuçları alınarak Codon Code Aligner V.6.0.2 programında tüm nükleotitler elektroferogramlara bakılarak tek tek kontrol edilmiştir. 16S rDNA gen dizileri NCBI'dan elde edilmiş ve izolatların gen dizileriyle birlikte hizalanmıştır. Bu çalışmada, türler arasındaki genetik uzaklığı belirlemek için filogenetik analizlere uygun formatlara getirilmiş 16S rDNA dizileri, Maksimum Olabilirlik algoritması seçilerek Jukes ve Cantor'un uzaklık matrisi ile filogenik ağaçlar oluşturulmuştur.

X0007 izolatı için oluşturulan filogenetik ağaçta *Streptomyces* bakterileri güçlü bir homoloji ile kümelenmiştir. Dış grup olarak *Micromonospora inyonensis* ve *Micromonospora citrea* seçilmiştir. X0007 izolatına ait gen dizisi ve NCBI'dan alınan izolatların gen dizileri 16S rDNA gen bölgesi filogenetik analizinde; X0007 suşunun filogenetik konumunu belirlemek için 16S rDNA sekansı analizi yapıldı. Toplam 1314 nükleotidlik 16S rDNA geni belirlenmiştir. X0007 nolu izolatın karşılaştırılan 1314 nt'lik bölgesinde 11 nükleotit farklılığı ve % 99,16 benzerlik oranıyla *Streptomyces iakyrus* AB184877 suşu ile sıkı bir homoloji ile kümelenmiştir.

X0031 izolatı için oluşturulan filogenetik ağaçta *Streptomyces cyaneofuscatus* HG965212, *Streptomyces lavendulae* KX698040, *Streptomyces pratensis* KU973960 ve *Streptomyces griseoplanus*



KT922031 bakterileri genel olarak güçlü bir homoloji ile kümelenmiştir. X0031 izolatına ait gen dizisi ve NCBI'dan alınan izolatların gen dizileri 16S rDNA gen bölgesi filogenetik analizinde; X0031 suşunun filogenetik konumunu belirlemek için 16S rDNA sekansı analizi yapıldı. Toplam 1338 nükleotidlik 16S rDNA geni belirlenmiştir. X0031 nolu izolatın karşılaştırılan 1338 nt'lik bölgesinde 12 nükleotit farklılığı ve % 99,25 benzerlik ile *Streptomyces cyaneofuscatu*s HG965212 suşu ile sıkı bir homoloji ile kümelenmiştir.

X0042 izolatı için oluşturulan filogenetik ağaçta *Streptomyces humiferus* NR112243, *Streptomyces coelicolor* GU072956 ve *Streptomyces violaceolatus* KT363060 bakterileri güçlü bir homoloji ile kümelenmiştir. X0042 suşunun toplam 1372 nükleotidlik 16S rDNA geni belirlenmiştir. X0042 nolu izolatın 1372 nt'lik bölgesi karşılaştırılmış ve 3 baz farklılığı görülmüştür. X0042 izolatı %99,78 oranıyla *Streptomyces violaceolatus* KT363060 suşu ile benzerlik göstermiştir.

X0051 izolatı için oluşturulan filogenetik ağaçta *Streptomyces pulveraceus* FJ486374, *Streptomyces sanglieri* KU049710 ve *Streptomyces atratus* KF475815 bakterileri güçlü bir homoloji ile kümelenmiştir. X0051 nolu izolatın 1382 nükleotidlik bölgesi karşılaştırılmış ve 4 baz farklılığı görülmüştür. X0042 izolatı %99,71 oranıyla *Streptomyces atratus* KF475815 suşu ile benzerlik göstermiştir.

**Tablo 1.** *Streptomyces* izolatlarının filogenetik ve moleküler olarak benzerlik oranları

NO	Renk Grubu	MVSP	IDENTAX	NCBI BLAST
X0007	1	3	<i>Streptomyces filipinensis</i>	<i>Streptomyces iakyrus</i> (%99) <i>Streptomyces collinus</i> (%99) <i>Streptomyces phaeochromogenes</i> (%99) <i>Streptomyces akiyoshiensis</i> (%99)
X0031	2	3	<i>Streptomyces cyaneus</i>	<i>Streptomyces cyaneofuscatu</i> s (%99) <i>Streptomyces lavendulae</i> (%99) <i>Streptomyces pratensis</i> (%99) <i>Streptomyces griseoplanus</i> (%99)
X0042	3	3	<i>Streptomyces cyaneus</i>	<i>Streptomyces humiferus</i> (%99) <i>Streptomyces coelicolor</i> (%99) <i>Streptomyces violaceolatus</i> (%99)
X0051	4	Tekli	<i>Streptomyces purpureus</i>	<i>Streptomyces pulveraceus</i> (%99) <i>Streptomyces sanglieri</i> (%99) <i>Streptomyces atratus</i> (%99)

#### 4. Sonuç ve Öneriler

Sakarya ili sınırları içerisindeki Sapanca Gölü'nün 6 farklı lokalitesinden alınan toprak ve sediment örneklerinden 60 *Streptomyces* bakterisi izole edilmiştir. 60 *Streptomyces* suşlarının renk gruplandırması yapılarak ve 4 grup elde edilmiştir. Nümerik taksonomik çalışmalar için uygulanan 61 farklı fenotipik ve biyokimyasal test sonucunda suşların dendogramları oluşturularak klasik taksonomik çalışmalar sonucu elde edilen verilen benzerlik dendogramı olarak sunulmuştur. İzole edilen 60 suşun IDENTAX programına göre teşhisleri yapılmış ve 47 izolat *Streptomyces cyaneus* olarak teşhis edilmiş olması tür çeşitliliği için ana habitatın toprak olduğu gerçeğini doğrulamaktadır. Moleküler karakterizasyon çalışmaları için renk gruplarını temsilen 4 suş seçilerek ve filogenetik konumlarını belirlemek için 16S rDNA sekansı analizleri yapılmış, dizi analizlerine göre tüm izolatlar *Streptomyces*

cinsine dahil olduğu NCBI gen bankası verileri ile filogenetik ağaçları oluşturulmuştur. Çalışmamızda X0007, X0031, X0042 ve X0051 suşlarının yapılan moleküler teşhis ve fenotipik özelliklerine dayalı bilgisayar yardımıyla teşhis sonuçlarının aynı olmadığı görüldü. IDENTAX teşhis programı ile yapılan teşhis çalışmalarının daha sağlıklı sonuçlar vermesi için literatürlerde belirtilen major kümeler ile birlikte minör kümeler için belirlenen teşhis matrisleri de kullanılmasının yanı sıra mutlaka moleküler analizlerle desteklenmesinin sonuçları daha doğru ortaya koyacağı açıktır.

## Teşekkür

Bu çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından FYL-2016-5499 Nolu Proje ile Desteklenmiştir.

## Kaynaklar

- [1] Seipke R., Kaltenpoth M., Hutching, M., 2012. *Streptomyces* as symbionts: an emerging and widespread theme. *FEMS Microbiology Reviews*, 36 (4): 862-876.
- [2] Bérđy J., 2005. Bioactive microbial metabolites. *Journal of Antibiotics*, 58: 1–26.
- [3] Hopwood D., 2004. New Drugs by Manipulating *Streptomyces* genes. *Microbiology Today*, 34: 64–65.
- [4] Goodfellow M., Erika Q., Katarzyna W., Pawel M., Abdalla O., Ahmed F., Mohamed H., Jolanta Z., 2007. *Streptomyces sudanensis* sp. nov., a new 76 pathogen isolated from patients with actinomycetoma. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, 22: 18157699.
- [5] Chater KF., Losick R., 2001. Mycelial life style of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its relatives. In *Bacteria as Multicellular Organisms* (Edited by J.A. Shapiro, M. Dworkin). Oxford Univ. Press, Newyork. 149–82.
- [6] Kutzner K.J. 1981. The family Streptomycetaceae. In: Starr MP, Stolp H, Traper HG, Balows A, Schlegel HG (eds) *The prokaryotes, A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria*, vol. 2, Springer-Verlag, New York, 2028-2090.
- [7] Williams S.T., Goodfellow M., Alderson G., 1989. Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 4 (edited by Williams, Sharpe, Holt). Williams & Wilkins, Baltimore, pp: 2452–2492.
- [8] Newman D.J., Cragg G.M., Snader K.M. 2003. Natural Products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *Journal of Natural Products*, 66: 1022–1037.
- [9] Shirling E.B., Gottlieb D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16: 313-340.
- [10] Szabo I.M., Marton M., Buti I., Fernandez C.A. 1975. Diagnostic key for the identification of species of *Streptomyces* and *Streptoverticillium* included in the International *Streptomyces* project. *Acta Bot Acad Sci Hung.*, 21: 387–418.
- [11] Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Baltimore: The Williams & Wilkins Co.
- [12] Nitsch, B., Kutzner H. J. 1969. Egg-yolk as a diagnostic medium for Streptomycetes. *Experientia* 25: 113–6.
- [13] Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. 1994. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley and Sons, New York. 2.0.1–2.14.8.
- [14] Lane D.J. 1991. 16S/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds., *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic*, John Wiley and Sons, New York, 115-175.
- [15] Awla F.M., Ozdemir K., Ertas M., 2017. Irak-Erbil'den Alınan Bazı Toprak Numunelerinden *Streptomyces* Bakterilerinin İzolasyonu, Ekstraselüler Hidrolitik Enzim Kabiliyetlerinin Belirlenmesi ve 16S rDNA Analizi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi/ Journal of the Institute of Natural & Applied Sciences*, 22 (2): 132-138.
- [16] Williams S.T., Goodfellow M., Aldersons G., Wellington E.M.H., Sneath, P.H.A., Sackin M.J. 1983a. Numerical Classification of *Streptomyces* and Related Genera. *Journal of General Microbiology*, 129: 1743-1813.



- [17] Williams S.T., Goodfellow M., Wellington E.M.H., Vickers J.C., Aldersons G., Sneath P.H.A., Sackin M.J. Mortimer A.M. 1983b. A probability matrix for identification of some Streptomyces. *Journal of General Microbiology*, 129: 1815-1830.
- [18] Özdemir K. 2008. *Lens orientalis* (Boiss.) Hand & Mazz ve Cicer anatolicum Alef. Rizosferinden Streptomyces türlerinin izolasyonu, teşhisi ve karakterizasyonu. Doktora Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- [19] Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J., Smith G.J.A., Struhl K. 1994. In: *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, New York, 2.1.1–2.1.3.
- [20] Kim B., Sahin N., Minnikin D.E., Zakrzewska-Czerwinska J., Mordarski M., Goodfellow M. 1999. Classification of thermophilic *Streptomyces*, including the description of *Streptomyces thermoalkalitolerans* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 7-17.
- [21] Rintala H., Nevalainen A., Rönkä E., Suutar M. 2001. PCR primers targeting the 16S rRNA gene for the specific detection of streptomyces. *Molecular and Cellular Probes*, 15: 337–347.
- [22] Lanoot B, Vancanneyt M., Bart H., Vandemeulebroecke K. 2005. Grouping of Streptomyces using 16S-ITS RFLP fingerprinting. *Research in Microbiology*, 156: 755–762.
- [23] Sembiring L., Goodfellow M. 2008. Ecological approach to unravel Streptomyces diversity as an unsurpassed sources of natural bioactive products. *Microbiology Indonesia*, 2 (2): 49-56.
- [24] Atalan E., Manfio G.P., Ward A.C., Kroppenstedt R.M., Goodfellow M. 2000. Biosystematic studied on novel Streptomyces from soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 77: 337-353.
- [25] Ozdemir K., Ogun E., Ertas M., Acar S., Atalan E. 2014. Identification of biodiversity of some *Streptomyces* species and determination of a restriction fragment length polymorphism (RFLP) profile of 16S rDNA gene region. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 13 (16): 978-988
- [26] Langham C.D., Williams S.T., Sneath P.H.A., Mortimer A.M. 1989. New probability matrices for identification of *Streptomyces*. *Journal of General Microbiology*, 135: 121–133.