

Araştırma Makalesi – Research Article

Kargı ve Osmancık Çevresindeki Yayla Topraklarının Aktinomiset Çeşitliliği

Demet Tatar^{1*}, Aysel Veyisoğlu²

Geliş / Received: 11/05/2020

Revize / Revised: 04/09/2020

Kabul / Accepted: 15/09/2020

ÖZ

Bu çalışmada Çorum iline bağlı Kargı (Eğinönü), Abdullah ve Osmancık-Başpınar Karaca yaylalarından alınan toprak örneklerinden izole edilen aktinomiset suşlarının 16S rRNA gen bölgesi analizlerine göre aktinomiset çeşitliliğinin saptanması amaçlandı. Dilüsyon plak tekniğinin uygulandığı izolasyon çalışmasında 5 farklı seçici besiyeri kullanıldı. İzolatların beş farklı kültür ortamında kültürel karakterizasyonları yapıldı. Test izolatlarının 16S rRNA gen bölgesinin PZR amplifikasyonu 27F ve 1525R primerleri ile gerçekleştirildi. Filogenetik ağaçlar, MEGA 7.0 yazılım programında neighbor-joining algoritmasıyla oluşturuldu. 5 farklı izolasyon besiyerinden toplam 15 mikroorganizma seçildi ve 16S rRNA gen dizi analizine göre 15 izolatın, altısı *Nocardia* cinsi üyesi, beşi *Streptomyces* cinsi üyesi, biri *Haloactinopolyspora* cinsi üyesi, biri *Micromonospora* cinsi üyesi, biri *Nocardiopsis* cinsi üyesi ve birinin de *Rhodococcus* cinsi üyesi olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler- Aktinomiset, Çeşitlilik, Yayla Toprağı, 16S rRNA Geni

^{1*}Sorumlu yazar iletişim: demettatar@hitit.edu.tr (<https://orcid.org/0000-0002-9317-3263>)

Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Hitit Üniversitesi, Osmancık Ömer Derindere Meslek Yüksekokulu, 19500, Çorum

²İletişim: aveyisoglu@sinop.edu.tr (<https://orcid.org/0000-0002-1406-5513>)

Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Sinop Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, 57000, Sinop

Actinomycetes Diversity of Plateau Soils Near Kargı and Osmancık

ABSTRACT

In this study, it was aimed to determine the diversity of actinomycetes according to 16S rRNA analysis of actinomycete isolates obtained from soil samples taken from Kargı (EğİNönü), Abdullah and Osmancık-Başpınar Karaca plateaus in Çorum Province. The isolates obtained were isolated using a dilution plate technique on 5 different selective media. Cultural characterizations of the isolates were carried out in five different culture media. PCR amplification belonging to 16S rRNA gene region of the isolates was realized out with primers of 27F and 1525R. Phylogenetic trees were formed with the neighbor-joining algorithm in MEGA 7.0 software. A total of 15 microorganisms were selected from 5 different isolation media and according to 16S rRNA gene sequence analysis of 15 isolates, six *Nocardia* isolates, five *Streptomyces* isolates, one *Haloactinopolyspora* isolate, one *Micromonospora* isolate, one *Nocardiopsis* isolate and one *Rhodococcus* isolate were determined.

Keywords- *Actinomycete, Diversity, Plateau Soil, 16S rRNA Gene*

I.GİRİŞ

Aktinomisetler, Actinobacteria filumu ve Actinomycetales ordosuna ait olan filamentöz bakterilerdir. Aktinomisetler, özellikle antibiyotik bileşikler açısından çok sayıda biyoaktif molekül üretme kabiliyetleri nedeniyle tıbbi ve biyoteknoloji endüstrilerindeki en paha biçilmez prokaryotlar olarak kabul edilmektedir. Aktinomisetler içerisinde *Streptomyces* cinsinin antibiyotiklerin % 60'ının üretiminden sorumlu olduğu düşünülmektedir [1-3].

Aktinomisete olan ilgi, temel olarak bazı vitaminler ve enzimlerle birlikte antibiyotik oluşturma yeteneklerine bağlı olarak artmaktadır. 1940 yılında aktinomisin'in keşfi ile başlayan ve devamında aktinomisetler tarafından sentezlenen antibiyotiklere karşı mükemmel bir ilgi ortaya çıkmıştır [4]. Streptomisin, streptomisin, kloramfenikol, tetrasiklinler, eritromisinler, neomisin, novobiosin, oleandomisin, nistatin gibi çok sayıda antibiyotiklerin keşfi gerçekleştirilmiştir. Antibiyotiklerin keşfi ile ilgili bu eğilim yirmi birinci yüzyılda daptomisin, epirubisin, karbapenem analogları, thienamisin gibi yeni antibiyotiklerin eklenmesiyle devam etmektedir [5].

Actinobacteria'lar genomlarında yüksek G+C içeriğine sahip gram-pozitif filamentöz bakterilerdir. Actinobacteria'ların çoğunluğu hem karasal hem de akuatik ekosistemlerde geniş oranda dağılım gösteren serbest yaşayan organizmalardır [6].

Topraktan elde edilen en iyi bilinen aktinomisetler, *Streptomyces* cinsine ait türlerdir. Bunun yanı sıra *Nocardia*, *Micromonospora*, *Micromonospora*, *Actinomyces*, *Actinoplanes* and *Streptosporangium* cinslerine ait türlerde topraktan izole edilmişlerdir [7].

Çin'de Tibet platosu üzerindeki Qinghai yaylasında yer alan toprak örneğinden selülozu parçalama özelliği olan aktinomisetler ile ilgili bir çalışma gerçekleştirilmiştir [8]. Farklı bir çalışmada, İç Moğolistan'daki bir yayladan elde edilen topraklarda fungus ve aktinomiset çeşitliliği araştırılmıştır [9]. Orta Afrika Cumhuriyetindeki Bangui yaylasından yeni bir aktinomiset olan *Kibdelosporangium banguiense* elde edilerek tanımlanmıştır [10]. Türkiye'de yapılan bir çalışmada ise Doğu Karadeniz Bölgesinden alınan farklı yayla topraklarından farklı aktinomisetlerin izolasyonu ve filogenetik analizi gerçekleştirilmiştir [11].

Bu çalışmanın amacı, Türkiye'deki Kargı (Eğinönü), Abdullah ve Osmancık-Başpınar Karaca yaylalarından alınan toprak örneklerinden aktinomiset izolasyonunun gerçekleştirilmesi, izole edilen aktinomisetlerin 16S rRNA sekans analizi yapılarak ait olduğu cinslerin belirlenmesi ve böylece aktinomiset çeşitliliğinin belirlenmesidir.

II.MATERYAL VE METOT

A. Toprak Örneklerinin Toplanması ve Saklanması

Kargı (Eğinönü), Abdullah ve Osmancık Başpınar-Karaca yaylalarından toprak örnekleri alındı. Bu örnekler laboratuvara getirilerek izolasyonun yapılacağı tarihe kadar +4°C' de saklandı.

B. Aktinomiset İzolasyonu

Aktinomisetlerin izolasyonu için dilüsyon plak tekniği kullanılmıştır. Toprak örneklerinden 1 gr tartılıp içerisine cam boncuklar yerleştirilen 9 ml steril Ringer çözeltisi bulunan şişelere konuldu. Bu şekilde her bir toprak örneği için hazırlanan 10⁻¹'lik solüsyonlar toprak kolloidlerine tutunmuş olan aktinomisetlerin sporlarını ve misellerini kolloidlerden ayırmak için 45 dakika süre ile hafifçe çalkalandı. Daha sonra bu 10⁻¹ dilüsyonlar vejetatif formlarının neden olabileceği kontaminasyonları azaltmak amacıyla 55°C'ye ayarlanmış su banyosunda 30 dakika bekletildi ve her bir toprak örneğinin 10⁻¹ dilüsyonları, vorteks karıştırıcı ile karıştırılarak homojen hale getirildi. Otomatik pipet ile aseptik şartlarda 1 ml alınarak içerisinde 9 ml steril ringer çözeltisi bulunan cam tüplere konularak bu şekilde 10⁻²'lik toprak ve sediment dilüsyonları elde edildi. 10⁻¹ ve 10⁻²'lik dilüsyonların her birinden otomatik pipet ile 0.1 ml toprak ve sediment solüsyonları alınıp, seçici izolasyon plaklarının yüzeylerine konularak steril özeyle yayma plak yöntemi ile inoküle edildi (Tablo 1). Her bir dilüsyon için 3 plak hazırlandı ve 28°C' de 21-30 gün süreyle inkübasyona bırakıldı.

Tablo 1. Kullanılan seçici besiyerlerin listesi

No	Besiyeri	Antibiyotik	Referanslar
1	Humik Asit-Vitamin Agar	Sikloheksimid (50 µg/ml) Nalidiksik asit (10 µg/ml)	[12]
2	Nişasta Kazein Agar	Sikloheksimid (50 µg/ml) Rifampisin (5µg/ml)	[13]
3	Modifiye Bennett's Agar	Sikloheksimid (50 µg/ml) Rifampisin (5µg/ml)	[14]
4	NZ-Amin Agar	Sikloheksimid (50 µg/ml)	[15]
5	Gliserol Asparajin Agar-ISP 5	Sikloheksimid (50 µg/ml) Nalidiksik asit (10 µg/ml)	[16]

C. İzolatların Seçimi, Saflaştırılması ve Stoklanması

Seçici besiyerlerinde 21-30 gün inkübasyona bırakılan izolasyon plaklarından aktinomiset suşları koloni morfolojileri dikkate alınarak seçildi. Seçilen suşlar sikloheksimid (50 µg/ml) ilaveli arpa-maya ekstraktları (ISP2) [16] yüzeyine tek koloni düşmesi için çizgi ekim yöntemiyle inoküle edilerek 28°C'de 20 gün inkübasyona bırakıldı. Koloni morfolojisi dikkate alınarak seçilen izolatlar numaralandırılıp saf kültürleri yapılarak % 25 gliserol içeren otoklavlanmış vidalı kapaklı tüplere steril kürdan yardımıyla transfer edilerek -80°C'de stoklandı.

D. İzolatların Kültürel Özellikleri

İzolatların International *Streptomyces* Project (ISP 2-6)[16] besi ortamlarındaki gelişimleri 28 °C sıcaklıkta 10 günlük inkübasyon süresi sonunda değerlendirildi. İzolatların besi ortamlarında, gelişim, spor rengi, hava misel rengi ve çözünür pigment rengi gibi özellikleri Kelly (1964) [17] tarafından önerilen ISCC-NBS renk kataloğu kullanılarak belirlendi.

E. Genomik DNA İzolasyonu

16S rRNA geni ile ilgili PZR çalışmaları için test organizmalarının bazılarının genomik DNA'ları Pitcher vd., [18] tarafından tanımlanan "Guanidin thiosiyanat DNA izolasyon" metoduna ve bazılarının ise Purelink Invitrogen genomik DNA izolasyon kitine göre yapıldı.

F. 16S rRNA Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

Her PZR karışımı (50 µl), primerleri (20 µM), Taq polimeraz tamponunu (HotStarTaq®) ve deoksiniükleosid trifosfat karışımını (Promega) (25 µM) içermektedir. Çözeltiye Taq polimeraz (2.5 U, HotStarTaq®) ve kromozomal DNA (50-300 ng) ilave edildi. 16S rRNA genleri, spesifik primerler 27F ve 1525R ile amplifiye edildi. DNA termal cyclus PZR amplifikasyonu için kullanıldı. PZR koşulları 95 ° C'de (5 dk) ilk denatürasyon basamağı 1 döngü, 95 ° C'de (1 dk) denatürasyon, 55 ° C (2 dk) bağlanma ve 72 ° C'de (3 dk) uzama basamağı 35 döngü olacak şekilde ve 72 ° C'de son bir uzama basamağından oluşmaktadır (10 dakika). Daha sonra PZR ürünleri, % 1,5 agaroz (Merck) jel içerisinde elektroforez kullanılarak yürütüldü ve Gene Genius Bioimaging görüntüleme sistemi ile görüntülendi.

G. 16S rRNA Geni Dizi Analizi ve Filogenetik Dendogramın Oluşturulması

16S rRNA gen bölgesi PZR amplifikasyonları gerçekleştirilen örnekler QIAquick PZR Pürifikasyon Kiti ile saflaştırıldıktan sonra 5 primer ile dizi analizi yapıldı (Tablo 2). İzolatların 16S rRNA gen bölgesi sekans analizi tamamlandıktan sonra elde edilen dizi verisi ChromasPro 1.7.5 programı ile birleştirildi ve Etaxon Server (<http://ezbiocloud.net>) [19] kullanılarak, uluslararası veri tabanlarındaki en yakın akraba türlerin dizi verileri ile karşılaştırıldı ve % benzerlikleri belirlendi. Filogenetik analizler için MEGA 7.0 programı, hizalama için aynı programın CLUSTAL_W [20] seçeneği kullanıldı. Filogenetik dendogramların çizilmesinde Neighbour-Joining [21] metodu ve Jukes-Cantor filogenetik uzaklık matrisi kullanıldı [22]. Oluşturulan filogenetik ağaçların bootstrap analizleri 1000 tekrarlı olarak yapıldı [23]

Tablo 2. 16S rRNA dizileme için kullanılan oligonükleotid primerler

Primer Kodu	Nükleotid Dizileri (5'-3')	Uzunluk	Referanslar
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	20	[24]
518F	CCAGCAGCCGCGGTAAT	17	[25]
800R	TACCAGGGTATCTAATCC	18	[26]
MG5F	AAACTCAAAGGAATTGACGG	20	[26]
MG6F	GACGTCAAGTCATCATGCC	19	[26]

Lane [24]: M = A:S.

III.BULGULAR

A. Aktinomiset İzolasyonu, Saflaştırılması ve Stoklanması

İzolasyon işlemi 5 farklı seçici izolasyon besiyeri kullanılarak gerçekleştirildi. İzolasyon için hazırlanan petripler 28 °C'de 21-30 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. Nişasta Kazein Agar izolasyon petri görüntüsü Şekil 1'de gösterildi. Saflaştırılan 15 izolat, % 25'lik gliserol içeren vidalı kapaklı tüplere aktararak -80 °C'de stoklandı (Tablo 3).



Şekil 1. Abdullah yaylası toprak örneğinin izolasyonu

Tablo 3. Test izolatlarının kaynağı

Laboratuvar No	İzolatların Kaynağı
GA1AY, H2AY, GA2AY, SC1AY, NZ1AY, B1AY	Abdullah Yaylası
GA2KY, NZ1KY, SC1KY, H1KY, B2KY	Kargı (Eğünönü) Yaylası
B2BY, H1BY, SC1BY, NZ2BY	Başpınar-Karaca Yaylası

İzolatların kodları belirlenirken baştaki harfler besiyerinin ilk harflerini ifade etmektedir. Hemen ardından gelen rakam ise kaçınıcı izolat olduğunu göstermektedir. Son iki harf ise örneğin alındığı lokasyonun adıdır (Örn: GA1AY-GA: Gliserol Asparajın Agar-ISP 5, 1. İzolat, AY: Abdullah Yaylası).

B. İzolatların Kültürel Özellikleri

Hava miselyumları genellikle beyaz renkte oluşmuş olup en iyi gelişim ISP 2 ve ISP 3'de gözlemlenmiştir. GA1AY, H2AY, B2BY, NZ1KY izolatları dışında diğer tüm izolatlar tüm kültür ortamlarında iyi bir gelişim göstermiştir. GA1AY izolatının ise tüm kültür ortamlarında zayıf gelişim gösterdiği saptanmıştır (Tablo 4).

Tablo 4. İzolatların farklı besi ortamlarındaki büyüme ve kültürel özellikleri

	Karakteristik	ISP 2	ISP 3	ISP 4	ISP 5	ISP 6
1	Gelişim	Zayıf	Zayıf	Zayıf	Zayıf	Zayıf
	Spor Rengi	Yok	Krem	Yok	Yok	Yok
	Substrat Miselyum	Açık kahverengi	Açık kahverengi	Açık kahverengi	Kahverengi	Kahverengi
	Çözünür pigment	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
2	Gelişim	İyi	İyi	İyi	Zayıf	Zayıf
	Spor Rengi	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
	Substrat Miselyum	Siyah	Koyu kahverengi	Yeşilimsi siyah	Koyu turuncu	Koyu turuncu
	Çözünür pigment	Yeşilimsi siyah	Yok	Yok	Yok	Yok
3	Gelişim	İyi	İyi	İyi	İyi	İyi
	Spor Rengi	Yok	Krem-Beyaz	Krem-Beyaz	Yok	Yok
	Substrat Miselyum	Turuncu	Koyu krem	Koyu krem	Açık turuncu	Koyu turuncu
	Çözünür pigment	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
4	Gelişim	İyi	İyi	İyi	İyi	İyi
	Spor Rengi	Yok	Krem-Beyaz	Krem-Beyaz	Yok	Yok
	Substrat Miselyum	Turuncu	Koyu krem	Koyu krem	Açık turuncu	Koyu turuncu
	Çözünür pigment	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
5	Gelişim	İyi	İyi	İyi	Zayıf	Zayıf
	Spor Rengi	Yok	Krem-Beyaz	Krem-Beyaz	Yok	Yok
	Substrat Miselyum	Turuncu	Koyu krem	Koyu krem	Turuncu	Turuncu
	Çözünür pigment	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
6	Gelişim	İyi	İyi	İyi	İyi	İyi
	Spor Rengi	Krem-Beyaz	Krem-Beyaz	Krem-Beyaz	Yok	Yok
	Substrat Miselyum	Turuncu	Açık turuncu	Açık turuncu	Turuncu	Turuncu
	Çözünür pigment	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
7	Gelişim	İyi	İyi	İyi	İyi	İyi
	Spor Rengi	Krem-Beyaz	Krem-Beyaz	Krem-Beyaz	Yok	Yok
	Substrat Miselyum	Turuncu	Açık turuncu	Açık turuncu	Turuncu	Turuncu
	Çözünür pigment	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
8	Gelişim	İyi	İyi	İyi	İyi	İyi
	Spor Rengi	Krem-Beyaz	Krem-Beyaz	Krem-Beyaz	Yok	Yok
	Substrat Miselyum	Turuncu	Açık turuncu	Açık turuncu	Turuncu	Turuncu
	Çözünür pigment	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
9	Gelişim	İyi	İyi	Zayıf	Zayıf	Zayıf
	Spor Rengi	Yok	Beyaz	Beyaz	Yok	Yok
	Substrat Miselyum	Beyaz	Krem	Krem	Krem	Açık sarı
	Çözünür pigment	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
10	Gelişim	İyi	İyi	İyi	İyi	İyi
	Spor Rengi	Yok	Krem	Krem	Yok	Yok
	Substrat Miselyum	Turuncu	Açık turuncu	Açık turuncu	Turuncu	Turuncu
	Çözünür pigment	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
11	Gelişim	İyi	İyi	İyi	İyi	İyi
	Spor Rengi	Gri	Gri-Beyaz	Gri-Beyaz	Yok	Yok
	Substrat Miselyum	Açık kahverengi	Sarı	Sarı	Kahverengi	Kahverengi
	Çözünür pigment	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
12	Gelişim	İyi	İyi	İyi	İyi	İyi
	Spor Rengi	Gri	Gri-Beyaz	Gri-Beyaz	Yok	Yok
	Substrat Miselyum	Sarı	Sarı	Açık sarı	Sarı	Sarı
	Çözünür pigment	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
13	Gelişim	İyi	İyi	İyi	İyi	İyi
	Spor Rengi	Yok	Gri-Beyaz	Gri-Beyaz	Yok	Yok
	Substrat Miselyum	Krem	Krem	Krem	Beyaz-Sarı	Beyaz-Sarı
	Çözünür pigment	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
14	Gelişim	İyi	İyi	İyi	İyi	İyi
	Spor Rengi	Yok	Gri-Beyaz	Gri	Yok	Yok
	Substrat Miselyum	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Gri	Gri
	Çözünür pigment	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
15	Gelişim	İyi	İyi	İyi	İyi	İyi
	Spor Rengi	Yok	Krem	Krem	Yok	Yok
	Substrat Miselyum	Açık sarı	Açık sarı	Açık sarı	Sarı	Sarı
	Çözünür pigment	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok

1, GA1AY; 2, H2AY; 3, GA2AY; 4, GA2KY; 5, B2BY; 6, H1BY; 7, SC1AY; 8, SC1BY; 9, NZ1KY; 10, SC1KY; 11, H1KY; 12, NZ1AY; 13, NZ2BY; 14, B1AY; 15, B2KY

C. 16S rRNA Geninin PZR Amplifikasyonu ve Filogenetik Analizi

Kargı ve Osmançık çevresindeki yayla topraklarının izole edilen ve sekans analizi tamamlanan 15 izolatın 6'sı *Nocardia* cinsi üyesi, 5'i *Streptomyces* cinsi üyesi, 1'i *Haloactinopolyspora* cinsi üyesi, 1'i *Micromonospora* cinsi üyesi, 1'i *Nocardiopsis* cinsi üyesi ve 1'inin de *Rhodococcus* cinsi üyesi olduğu tespit edildi (Tablo 5). 15 izolatın 16S rRNA gen dizileri GenBank'a depozit edildi. GenBank numaraları Tablo 5'te verilmiştir.

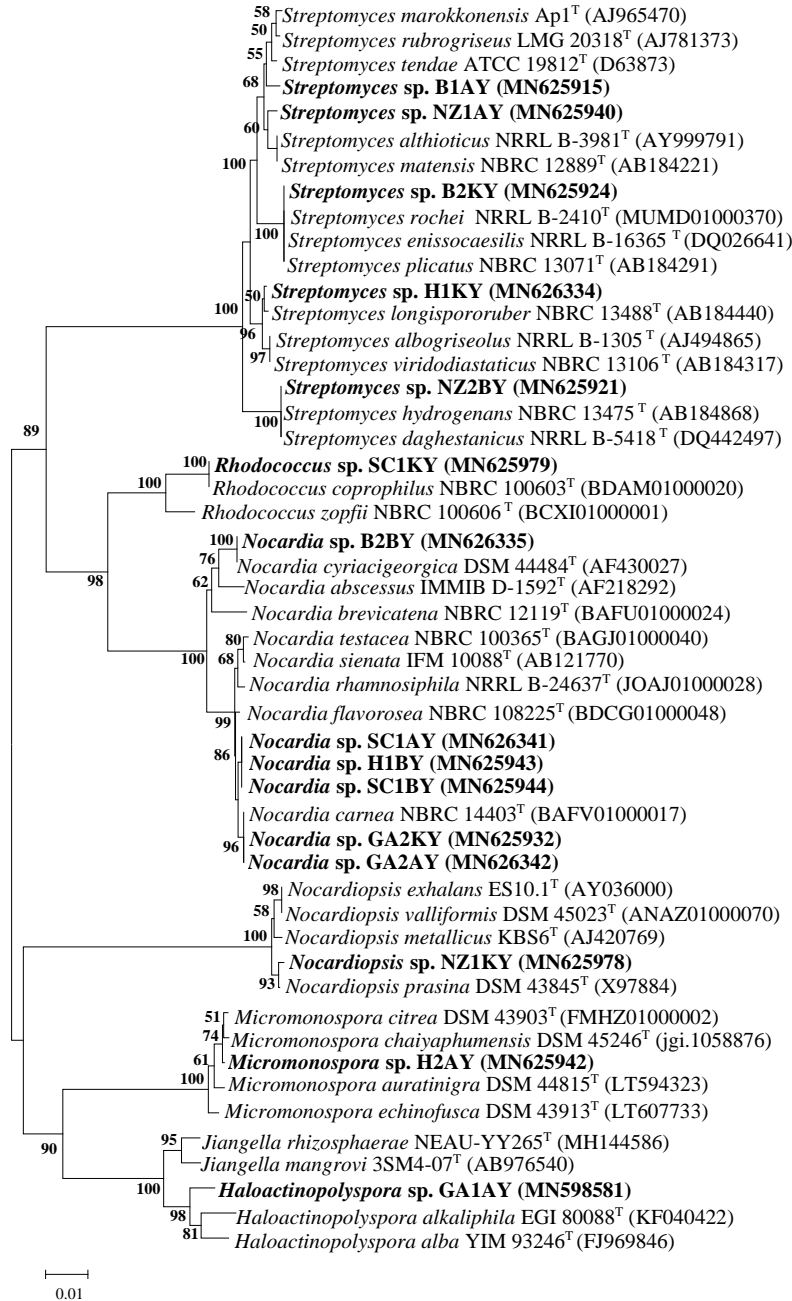
Tablo 5. 16S rRNA dizi analizi sonuçlarına göre *Actinobacteria* sınıfına ait test organizmalarının en yakın tip türleri ile olan nükleotit benzerliği

No	Suş Kodu	İzole Edildikleri Besiyeri	En Yakın Tip Türü	% Benzerlik- Nükleotit Farklılığı	GenBank No
1.	GA1AY	Gliserol Asparajin Agar-ISP 5	<i>Haloactinopolyspora alkaliphila</i> EGI 80088 ^T	% 98.41	MN598581
2.	H2AY	Humik Asit-Vitamin Agar	<i>Micromonospora citrea</i> DSM 43903 ^T	% 99.79	MN625942
3.	GA2AY	Gliserol Asparajin Agar-ISP 5	<i>Nocardia carnea</i> NBRC 14403 ^T	% 100	MN626342
4.	GA2KY	Gliserol Asparajin Agar-ISP 5	<i>Nocardia carnea</i> NBRC 14403 ^T	% 100	MN625932
5.	B2BY	Modifiye Bennett's Agar	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i> DSM 44484 ^T	% 100	MN626335
6.	H1BY	Humik Asit-Vitamin Agar	<i>Nocardia flavorosea</i> NBRC 108225 ^T	% 99.72	MN625943
7.	SC1AY	Nişasta Kazein Agar	<i>Nocardia flavorosea</i> NBRC 108225 ^T	% 99.72	MN626341
8.	SC1BY	Nişasta Kazein Agar	<i>Nocardia flavorosea</i> NBRC 108225 ^T	% 99.72	MN625944
9.	NZ1KY	NZ-Amin Agar	<i>Nocardiopsis prasina</i> DSM 43845 ^T	% 99.86	MN625978
10.	SC1KY	Nişasta Kazein Agar	<i>Rhodococcus coprophilus</i> NBRC 100603 ^T	% 99.93	MN625979
11.	H1KY	Humik Asit-Vitamin Agar	<i>Streptomyces albogriseolus</i> NRRL B-1305 ^T	% 99.79	MN626334
12.	NZ1AY	NZ-Amin Agar	<i>Streptomyces althioticus</i> NRRL B-3981 ^T	% 99.38	MN625940
13.	NZ2BY	NZ-Amin Agar	<i>Streptomyces hydrogenans</i> NBRC 13475 ^T	% 100	MN625921
14.	B1AY	Modifiye Bennett's Agar	<i>Streptomyces marokkonensis</i> Ap1 ^T	% 99.38	MN625915
15.	B2KY	Modifiye Bennett's Agar	<i>Streptomyces rochei</i> NRRL B-2410 ^T	% 100	MN625924

D. 16S rRNA Genine Dayalı Filogenetik Analiz

16S rRNA gen bölgesi nükleotit dizi analizlerine göre *Haloactinopolyspora* cinsine ait GA1AY izolatı *Haloactinopolyspora alkaliphila* EGI 80088^T ve *Haloactinopolyspora alba* YIM 93246^T tip türlerine sırasıyla % 98.41 ve % 97.96 benzerlik göstermektedir. Filogenetik dendogramda ise GA1AY izolatı, *Haloactinopolyspora alkaliphila* EGI 80088^T ve *Haloactinopolyspora alba* YIM 93246^T tip türleri ile birlikte kümelenmiştir. *Micromonospora* cinsi üyesi olan H2AY izolatı, en yakın akraba türleri olan *Micromonospora citrea* DSM 43903^T ve *Micromonospora chaiyaphumensis* DSM 45246^T ile sırasıyla % 99.79 ve % 99.58 benzerlik göstermektedir. 16S rRNA gen bölgesi dizi analizlerine bağlı filogenetik dendograma göre *Micromonospora* cinsine ait H2AY izolatı *Micromonospora citrea* DSM 43903^T ve *Micromonospora chaiyaphumensis* DSM 45246^T tip türleriyle beraber kümelenmiştir. 16S rRNA gen bölgesi nükleotit dizi analizlerine göre *Nocardia* cinsine ait GA2AY ve GA2KY izolatlarının her ikisi de, *Nocardia carnea* NBRC 14403^T türü ile % 100'lük bir benzerlik göstermektedir. 16S rRNA gen bölgesi nükleotit dizi analizlerine dayalı filogenetik dendograma göre *Nocardia* cinsine ait GA2AY ve GA2KY izolatları, *Nocardia carnea* NBRC 14403^T türü ile birlikte kümelenmiştir. *Nocardia* cinsine ait B2BY izolatı *Nocardia cyriacigeorgica* DSM 44484^T ile % 100'lük bir benzerliğe sahip olup aynı zamanda filogenetik dendogramda birlikte kümelenmiştir. 16S rRNA gen bölgesi nükleotit dizi analizlerine göre *Nocardia* cinsine ait H1BY, SC1AY ve SC1BY izolatlarının hepsi *Nocardia flavorosea* NBRC 108225^T ile % 99.72 benzerlik göstermektedir. Filogenetik dendogramda H1BY, SC1AY ve SC1BY izolatlarının üçü birlikte kümelenmiştir. *Nocardiopsis* cinsine ait NZ1KY izolatı, *Nocardiopsis prasina* DSM 43845^T ile % 99.86 benzerlik göstermektedir. NZ1KY izolatı, *Nocardiopsis prasina* DSM 43845^T ile filogenetik dendogramda birlikte kümelenmiştir. *Rhodococcus* cinsine ait SC1KY izolatı *Rhodococcus coprophilus* NBRC 100603^T tip türü ile % 99.93'lük bir benzerlik sergilemekte ve filogenetik dendogramda birlikte kümelenmektedir. 16S rRNA gen bölgesi nükleotit dizi analizlerine göre H1KY izolatı, *Streptomyces albogriseolus* NRRL B-1305^T tip türü ile % 99.79 benzerliğe sahiptir. NZ1AY izolatı, *Streptomyces althioticus* NRRL B-3981^T ile % 99.38 benzerlik göstermektedir. NZ2BY izolatı, *Streptomyces hydrogenans* NBRC 13475^T türü ile % 100 benzerlik gösterir. B1AY izolatı, *Streptomyces*

marokkonensis Ap1^T ile % 99.38'lik benzerlik göstermektedir. B2KY izolatu ise, *Streptomyces rochei* NRRL B-2410^T tip türü ile % 100 benzerliğe sahiptir (Tablo 5, Şekil 2).



Şekil 2. Sekansı yapılan tüm izolatların 16S rRNA dizilerine dayalı filogenetik ilişkilerini gösteren dendogram. Neighbour-Joining algoritmasına göre çizilmiş ağaçta, % 50'nin üzerinde desteklenen dallanma noktaları için bootstrap değerleri verildi. Nükleotit pozisyon değişimi 0,01'dir.

IV. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Geleneksel mikrobiyolojik metotlara dayanarak mikroorganizmaların sınıflandırılması (morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal) mikroorganizmaların taksonomik pozisyonlarının net bir şekilde belirlenmesini sağlayamamaktadır. Bu nedenle, günümüzde polifazik taksonomi olarak adlandırılan, moleküler teknikler aracılığıyla elde edilen bilgilerle morfolojik ve biyokimyasal verilerin bir arada değerlendirildiği ileri bir yaklaşım kullanılmaya başlanmıştır [27].

5 farklı seçici izolasyon besiyeri kullanılarak elde edilen 15 izolatın 16S rRNA gen bölgesi dizi analizleri sonuçlarına göre % 40'ı *Nocardia*, % 33.3'ü *Streptomyces*, % 6.6 'sı *Haloactinopolyspora*, % 6.6'sı *Micromonospora*, % 6.6'sı *Nocardiopsis* ve % 6.6'sının da *Rhodococcus* cinsi üyesi olduğu tespit edildi.

15 İzolatın ISP 2-6 [16] kültür ortamlarındaki gelişimleri değerlendirildi. Bunun sonucunda, GA1AY izolatının tüm kültür ortamlarında zayıf gelişim gösterdiği gözlemlenirken, GA1AY, H2AY, B2BY, NZ1KY izolatları dışında diğer tüm izolatlar ISP 2-6 kültür ortamlarında iyi bir gelişim göstermiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada Çorum iline bağlı Kargı (Eğinönü), Abdullah ve Osmancık-Başpınar Karaca Yaylalarından alınan toprak örneklerinden aktinomiset izolasyonu ve filogenetik analizleri gerçekleştirilmiştir.

16S rRNA dizi analizi tamamlanan test izolatlarının filogenetik analizlerine göre en yakın akrabaları ile en fazla nükleotit farkı gösteren izolatlara öncelik verilerek moleküler, kemotaksonomik ve fenotipik analizlerin tamamlanması ve ileriki çalışmalarda literatüre kazandırılması planlanmaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Hitit Üniversitesi (ODMYO19003.18.001) tarafından desteklenmiştir. Çalışmaya katkılarından dolayı Prof. Dr. Nevzat Şahin'e (Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü) teşekkür ediyorum.

KAYNAKLAR

- [1] Fguira, L.F., Fotso, S., Ameer-Mehdi, R.B., Mellouli, L., & Laatsch, H. (2005). Purification and Structure Elucidation of Antifungal and Antibacterial Activities of Newly Isolated *Streptomyces* sp. Strain US80. *Research in Microbiology*, 156, (3), 341-345.
- [2] Mellouli, L., Ameer-Mehdi, R.B., Sioud, S., Mansour, S., & Bejar, S. (2003). Isolation, Purification And Partial Characterization of Antibacterial Activities Produced by A Newly Isolated *Streptomyces* sp. US24 Strain. *Research in Microbiology*, 154, (5), 345-352.
- [3] Singh, L.S., Baruah, I., & Bora, T.C. (2006). Actinomycetes of Loktak Habitat: Isolation and Screening for Antimicrobial Activities. *Biotechnology*, 5, (2), 217-221.
- [4] Cassell, G. H., & Mekalanos, J. (2001). Development of Antimicrobial Agents in The Era of New and Reemerging Infectious Diseases and Increasing Antibiotic Resistance. *JAMA*, 285, (5), 601-605.
- [5] Sivaramkrishna, H., & Girish, M. (2009). Microbes An Eternal Source of Innovative Drugs. *Express Pharma*, 16-30 June.
- [6] Macagnan, D., Romeiro, R.D.S., de Souza, J.T., & Pomella, A.W.V. (2006). Isolation of Actinomycetes and Endospore-Forming Bacteria from The Cacao Pod Surface and Their Antagonistic Activity against The Witches' Broom and Black Pod Pathogens. *Phytoparasitica*, 34, 122-132.
- [7] Arifuzzaman, M., Khatun, M.R., & Rahman, H. (2010). Isolation and Screening of Actinomycetes from Sundarbans Soil for Antibacterial Activity. *African Journal of Biotechnology*, 9, 4615-4619.
- [8] Cai, Y., Xue, Q., Chen, & Zhang, R. (2009). Study on Cellulose-decomposed Actinomycetes in Soil in the Eastern of the Qinghai Plateau. *Modern Applied Science*, 3, (2), 83-88.

- [9] Zhao, J., Shao, Y., Zhao, Z., Liu, F., Zhou, H., & Li, Z. (2011). Diversity of Fungi and Actinomycetes in Soil of Enclosed and Grazing Wetland on Inner Mongolian Plateau. *Advanced Materials Research*, Vols. 356-360, 2703-2706.
- [10] Pascual, J., González, I., Estévez, M., Benito, P., & Trujillo, M.E., et al. (2016). Description of *Kibdelosporangium banguiense* sp. nov., A Novel Actinomycete Isolated From Soil of The Forest of Pama, on The Plateau of Bangui, Central African Republic. *Antonie van Leeuwenhoek*, 109, 685-695.
- [11] Isik, K., Gencbay, T., Ozdemir-Kocak, F., & Cil, E. (2014). Molecular Identification of Different Actinomycetes Isolated from East Black Sea Region Plateau Soil by 16S rDNA Gene Sequencing. *African Journal of Microbiology Research*, 8, (9), 878-887.
- [12] Hayakawa, M., & Nonomura, H. (1987). Humic Acid-Vitamin Agar, A New Medium for The Selective Isolation of Soil Actinomycetes. *Journal of Fermentation Technology*, 65, 501-509.
- [13] Küster, E., & Williams, S.T. (1964). Selection of Media for Isolation of Streptomycetes. *Nature*, 202, 928-929.
- [14] Jones, K.L. (1949). Fresh Isolates of Actinomycetes in which The Presence of Sporogenous Aerial Mycelia is A Fluctuating Characteristic. *Journal of Bacteriology*, 57, 141-145.
- [15] Atlas, R.M. (2010). Handbook of Microbiological Media, *Fourth Edition*, 1249, CRC Press, USA.
- [16] Shirling, E. B., & Gottlieb, D. (1966). Methods for Characterization of *Streptomyces* Species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16, 313-340.
- [17] Kelly, K. L. (1964). Color-name charts illustrated with centroid colors. Inter-Society Color Council-National Bureau of Standards, Supplement to NBS Circ. 533, Standard sample No. 2106, Chicago.
- [18] Pitcher, D.G., Saunders, N.A., & Owen, R.J. (1989). Rapid Extraction of Bacterial Genomic DNA with Guanidium Thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, 8, 151-156.
- [19] Kim, O.S., Cho, Y.J., Lee, K., Yoon, S.H., Kim, M., Na, H., Park, S.C., Jeon, Y.S., Lee, J.H., Yi, H., Won, S., & Chun, J. (2012). Introducing EzTaxon-e: A Prokaryotic 16S rRNA Gene Sequence Database with Phylotypes that Represent Uncultured Species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 716-721.
- [20] Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33, 1870-1874.
- [21] Saitou, N., & Nei, M. (1987). The Neighbour-Joining Method: A New Method for Constructing Phylogenetic Trees. *Molecular and Biological Evolution*, 4, 406-425.
- [22] Jukes, T.H., & Cantor, C.R. (1969). Evolution of protein molecules. In *Mammalian Protein Metabolism*, 3, 21-132. Edited by H. N. Munro. New York: Academic Press.
- [23] Felsenstein, J. (1985). Confidence Limits on Phylogeny: An Approach Using The Bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.
- [24] Lane, D.J. (1991). 16S/23S rRNA Sequencing. In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., eds., *John Wiley and Sons*, New York, NY, 115-175.
- [25] Buchholz-Cleven, B.E.E., Rattunde, B., & Straub, K.L. (1997). Screening for Genetic Diversity of Isolates of Anaerobic Fe(II)-Oxidizing Bacteria Using DGGE and Whole-Cell Hybridization. *Systematic and Applied Microbiology*, 20, 301-309.

- [26] Chun, J. (1995). Computer Assisted Classification and Identification of Actinomycetes. PhD thesis. Department of Microbiology, University of Newcastle, Newcastle upon Tyne, UK.
- [27] Prakash O., Verma M., Sharma P., Kumar M., Kumari K., Singh A., Kumari H., Jit S., Gupta S. K., & et al. (2007). Polyphasic Approach of Bacterial Classification – An Overview of Recent Advances. *Indian Journal of Microbiology*, 47, (2), 98-108.