



# TOPRAK BİLİMİ VE BİTKİ BESLEME DERGİSİ

<http://dergi.toprak.org.tr>



## Sakarya ili ormanlık alan topraklarından *Streptomyces* türlerinin izolasyonu, karakterizasyonu ve bazı ekstraselüler enzimlerin üretiminin belirlenmesi

Ömrüye Özok <sup>1,\*</sup>, Kerem Özdemir <sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> Bandırma 17 Eylül Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Mühendislik Temel Bilimleri Anabilim Dalı, Balıkesir

### Özet

Bu çalışmada, Sakarya ili sınırlarında bulunan ormanlık alan topraklarından *Streptomyces* cinsi bakterileri izole edilerek bilgisayar yardımıyla teşhisleri yapılmış ve izolatların amilaz, selüloz, L-asparaginaz, proteaz ve lipaz enzimlerinin aktiviteleri belirlenmiştir. Yapılan renk grubu analizinde izolatlar havasal ve misel rengi esas alınarak 4 ana gruba ayrılmıştır. Teşhisleri tamamlanan *Streptomyces* izolatlarının test sonuçları MVSP 3.2 bilgisayar programı ile birbirleri arasındaki benzerlik dendogramları oluşturulmuştur. Tüm izolatların fenotipik ve biyokimyasal karakterleri belirlenerek IDENTAX bilgisayar programına bu veriler aktarılmış, cins içerisindeki pozisyonları belirlenerek teşhisleri yapılmıştır. Bu teşhislere göre 80 izolatın 49'unun *Streptomyces exfoliatus*, 14'ünün *Streptomyces atroolivaceus*, 1'i *Streptomyces albidoflavus*, 1'i *Streptomyces chromofuscus*, 1'i de *Streptomyces purpureus* olduğu belirlenmiştir. Ayrıca tüm izolatların proteaz, amilaz, lipaz, selüloz ve asparaginaz enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Streptomyces*, ekstraselüler enzim, karakterizasyon.

### Isolation and identification of *Streptomyces* species isolated from forest area (Sakarya City) and determination the production of some extracellular enzyme

#### Abstract

In this study, forest area located in the province of Sakarya city soil bacteria of the genus *Streptomyces* isolated and made computer-assisted diagnosis and various enzyme activities of the isolates were determined. All isolates of phenotypic and biochemical characteristics of the data being transmitted to the computer program determined IDENTAX, diagnosis is made by determining their position in the genus. Isolates in the color group analysis based on aerial and substrate mycelium color is divided into four main groups. Diagnostic test results of *Streptomyces* isolates are completed by a computer program MVSP 3.2 and were created similarity dendograms. In addition, all isolates protease, amylase, lipase, cellulase and asparaginase enzyme activity was determined.

**Keywords:** *Streptomyces*, Extracellular enzyme, characterization.

© 2019 Türkiye Toprak Bilimi Derneği. Her Hakkı Saklıdır

### Giriş

Genel olarak habitatları toprak olan *Streptomyces* bakterileri selüloz, lignin, kitin gibi doğal polimerlerin degradasyonunda ve döngüsünde rol alan mikrobiyal topluluğun önemli bir bileşeni olmalarının yanısıra (Semêdo ve ark., 2004), yapısal olarak farklı ve biyolojik olarak aktif çok sayıda bileşiğin kaynağı olarak biyoteknolojik açıdan da önemli bir potansiyele sahiptir (Semêdo 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.,

\* Sorumlu yazar:

Tel. : 0 544 898 25 40

E-posta : [o.ozok@hotmail.com](mailto:o.ozok@hotmail.com)

Geliş Tarihi : 30 Aralık 2018

Kabul Tarihi : 21 Nisan 2019

e-ISSN : 2146-8141

DOI : 10.33409/tbbbd.595174

2004). . *Streptomyces* cinsi üyelerinin yeni, ticari olarak önemli ve farmakolojik olarak aktif anitibiyotik, enzim, enzim inhibitörü gibi antimikrobiyal madde üretme yetenekleri *Streptomyces* bakterilerini prokaryotlar arasında önemini artırmaktadır. Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleridir (Wiseman, 1987). Bu mikroorganizmalar yalnızca enzim üretme yeteneklerine göre değil, mikroorganizmaların toksik ve patojen olmamasına göre de seçilmiştir. Bugün endüstride kullanılan birçok enzim mikrobiyal kökenli olduğu için, endüstriyel enzimlerin kullanımında, mikroorganizma kullanımı artmıştır (Demain ve Solomon, 1981). Antimikrobiyal maddeler, çok az yoğunlukta dahi mikroorganizma gelişimini engelleyen biyolojik kökenli sekonder metabolitler olup, mikroorganizmanın çoğalmasını engelleyici "bakteriostatik" veya "fungustatik" olabildikleri gibi; mikroorganizmanın ölümüne sebep olan "bakterisidal" veya "fungusidal" maddelerde olabilirler. Mikroorganizmalar tarafından üretilen, düşük molekül ağırlıklı, organik doğal ürünler olan antimikrobiyal maddeler seçici toksiteye sahip olduklarından çok düşük konsantrasyonlarda bile mikroorganizmaya zararlı olup makroorganizmaya zarar vermezler.

Bu çalışmada amaç; Sakarya ili ormanlık alanlarından toplanan toprak numuneleri kullanılarak izole edilen *Streptomyces* bakterilerinin karakterizasyon ve bilgisayar destekli teşhisi yapılarak, izole edilen tüm bakterilerin çeşitli enzim aktiviteleri de (amilaz, proteaz, lipaz, selülaz, asparaginaz) belirlenmeye çalışılmıştır.

## Materyal ve Yöntem

Bu araştırmanın materyalini Sakarya ilinin 5 farklı lokasyonlarından özellikle ormanlık alanlardan alınan toprak numuneleri oluşturmaktadır. 1. lokasyon Karaçam çıkışı, 2. lokasyon Doğançay/aşağı mahalle, 3.lokasyon Doğançay/Yukarı mahalle, 4. lokasyon Geyve/kuzey, 5. lokasyon Geyve/güney olarak belirlenerek alınan toprak numunelerinin laboratuvarında nem ve pH değerleri belirlenmiştir.

### *Streptomyces* Türlerinin İzolasyonu ve Saflaştırılması

Bu çalışmada *Streptomyces* bakterilerinin izolasyonu için klasik dilüsyon ve yüzeye yayma yöntemi kullanıldı. Daha sonra, her toprak örneğinden 1 gr tartılarak içerisinde 9 ml ringer çözeltisi bulunan 20 ml'lik steril cam şişelere konuldu. Her bir toprak örneği homojen hale getirildi ve otomatik pipet ile aseptik şartlarda 0.5 ml alınarak içerisinde 4.5 ml ringer çözeltisi bulunan steril cam tüplere konuldu. *Streptomyces* bakterilerinin izolasyonu için M65 besi yeri hazırlandı ve 25°C'de 14 gün inkübasyona bırakılan izolasyon plaklarındaki olası farklı *Streptomyces* suşları, koloni morfolojileri dikkate alınarak seçilmiştir. İzole edilen bu koloniler cycloheximide (50 ug/ml), nystatin (50 ug /ml) ve novobiosin (0.5 ug/ml) ilaveli Bennet's Agar besiyeri (DSMZ) yüzeyine çizgi plak yöntemiyle transfer edilerek tek koloni düşürülmeye çalışıldı. Bu işlem, saf kültürler elde edilene kadar tekrarlanmıştır.

### Renk Gruplandırması

Saflaştırılan toplam 80 *Streptomyces* suşunun renk gruplandırılması için Oatmeal Agar (Shirling ve Gottlieb, 1966) besi ortamına ekimi yapıldı. Çizgi ekim metoduyla inoküle edilen izolatlar 14 gün 28°C'de inkübe edildikten sonra havasal miselyum rengi substrat miselyum renkleri renk kataloğuna göre tespit edildi ve gruplandırma yapıldı. İzolatların melanin pigmenti üretip üretmediğini belirlemek için pepton yeast extract iron agar (Shirling ve Gottlieb, 1966) besi ortamına öze yardımıyla ekim yapıldı ve 28°C'de 7 gün süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda petri kabı içerisinde üremiş olan kolonilerden siyahımsı renk oluşumu melanin pigmenti üretiminin olduğunu, renk değişimi olmamış koloniler ise melanin üretmeyen koloniler olarak değerlendirilmiştir. Sonuçta hem havasal ve substrat miselyum renk hem de melanin pigment üretimi dikkate alınarak tüm izolatlar gruplandırıldı.

### Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları

Daha önceden saflaştırılıp -20°C'de gliserol içerisinde saklanan *Streptomyces* izolatları 6 adet patojen yada non-patojen (*S.pneumonia*,*E.fealeus*, *E.coli*,*S.aureus*, *S.flexneri*, *P.aerogmose*) test organizmasına karşı antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir (Williams ve ark., 1983a). Bennet's agar besi yerine ekilen *Streptomyces* test izolatları 27°C'de 3 gün süre ile aktive edildikten sonra kullanılmış, hazırlanan besiyerinin merkezine çizgi şeklinde her izolat ayrı olarak ekilmiştir. Plak kapları 2 gün süre ve 27°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda üremiş olan *Streptomyces* bakterilerine dik çizgi yöntemi ile patojen test organizmalarının ekimi yapılarak 37°C'de tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Sonuçlar test organizmalarının etrafındaki şeffaf zona bakılarak duyarlıyada dirençli olarak kaydedilmiştir.

## Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Bakterilerin antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının belirlenmesi için yapılan çalışmada hazırlanan besi ortamına sıvı solüsyon olarak hazırlanmış *Streptomyces* bakterileri yayma metodu ile ekim yapılmış ve ticari antibiyotikler (neomisin, oleondamisin, penisilin G, rifamisin) laboratuvar ortamında disklerle emdirme metoduyla hazırlanan antibiyotik diskler şeklinde petri kaplarına yerleştirilmiştir. 2-3 gün 27°C'de inkübasyondan sonra disklerin etrafında meydana gelen şeffaf inhibisyon zonlarına göre o bakterinin diskte bulunan antibiyotiğe duyarlı olduğu belirtilmiştir.

## Degredasyon Aktiviteleri

İzolatlar Ksantin %0.4, Tween 80 %1, Elastin %0.3, Guanin %0.05, Arbutin %1, Tirozin %0,05, Kazein %1, Üre %1, Jelatin %1, Nişasta %1, Tallus acetat olmak üzere 11 substratı degrade edebilme özelliklerine göre incelenmiştir. *Streptomyces* suşları her bir madde için ayrı ayrı besi yerine standart olarak 7 µl ekim yapılmış, degradasyon testleri için Bennett's Agar (Jones, 1949) kullanılmıştır.

## Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

### Amilaz

Amilaz enzimi üretimi için Bennet's agar hazırlanarak %2'lik nişasta ilave edilmiş ve 28°C'de 4 gün inkübe edilmiştir. Besi yeri üzerine lügol damlatılarak etrafında açık renk zon oluşturan bölgeler pozitif sonuç olarak seçilmiştir (Aygan ve ark. 2008).

### Selülaz

Selülaz enzimi üretimi için Bennet's agar hazırlanarak %1 'lik karboksi metil selülaz (saf suda çözülerek) ilave edilmiş ve 28°C'de 4 gün inkübe edilmiştir. Besi yeri üzerine %1'lik Kongo red ilave edilerek koloni etrafında açık sarı renk zon oluşumu pozitif sonuç olarak seçilmiştir. (Hakamada ve ark., 1997).

### L-Asparaginaz

Asparaginaz enzimi üretimi için Bennet's agar hazırlanarak %1'lik asparagin ilave edilmiş ve 28°C'de 4 gün inkübe edilmiştir. Besi yeri üzerine 3 damla fenol damlatılarak etrafında pembeye dönüşen koloniler pozitif sonuç olarak seçilmiştir (Gulati ve ark., 1997).

### Proteaz

Proteaz enzimi üretimi için Bennet's agar hazırlanarak %1'lik yağsız süt tozu ilave edilmiş ve 28°C'de 4 gün inkübe edilmiştir. Besi yeri üzerinde etrafında açık renk zon oluşturan bölgeler pozitif sonuç olarak seçilmiştir (Yin ve ark., 2010).

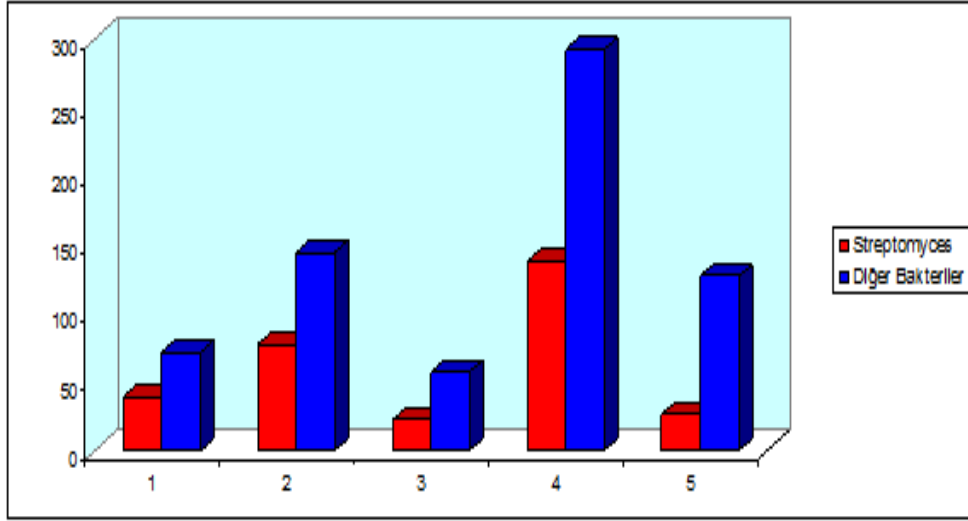
### Lipaz

Lipaz enzimi üretimi için Bennet's agar hazırlanarak %2'lik Tween 80 ilave edilmiş ve 28°C'de 4 gün inkübe edilmiştir. Besi yeri üzerine %0,001'lik rodamin b ilave edilerek etrafında açık renk zon oluşturan koloniler pozitif sonuç olarak seçilmiştir (Karnetova ve ark., 1984).

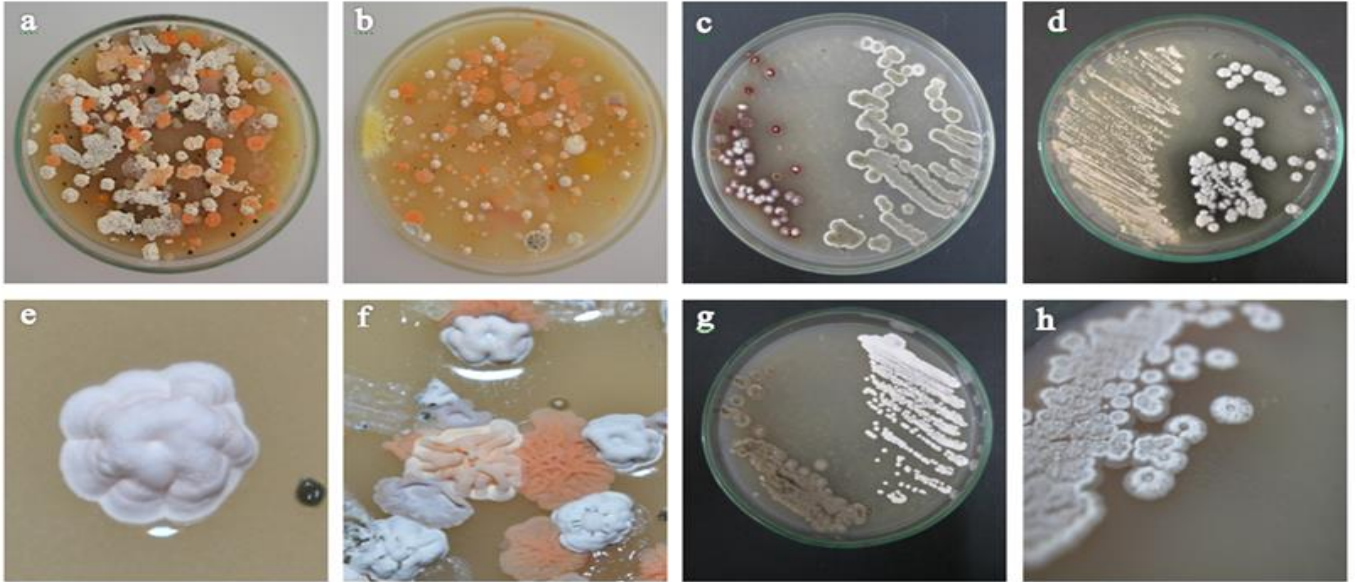
## Bulgular ve Tartışma

Beş farklı lokasyondan alınan toprak numunelerinin izolasyon öncesinde pH ve nem oranları Çizelge 1'de gösterilmiştir. Numunelerin pH 'ları 6,13 (1 nolu numune, Karaçam çıkışı) ile 7,16 (4 nolu numune, Geyve-kuzey) arasında değişti ve bu sonuçlarla nötral toprak tipini oluşturdukları belirlendi. Nem oranları ise %4 (1 nolu numune, Karaçam çıkışı ) ile %9 (3 nolu numune, Doğançay-yukarı mahalle ) arasında değişiklik gösterdi. Bu sonuçlarımız daha önce *Streptomyces* türleri üzerine yapılan biyoçeşitlilik çalışmalarıyla uygunluk göstermiştir (Vickers ve ark., 1984; Williams ve Vickers, 1988; Özdemir, 2008). *Streptomyces* bakterilerinin izolasyonu konusunda bugüne kadar yapılan çalışmalarda genellikle bitki yetişme alanlarına yakın bölgelerden toprak numuneleri alınmıştır (Özdemir, 2008).

Bu çalışmada toplam 5 toprak numunesinden *Streptomyces* bakterilerinin izolasyonu yapıldı. Cycloheximid (50 ug/ml), Nystatin (50 ug/ml), Novabiosin (50 ug/ml) antibiyotikleri eklenmiş M65 besiyerinde gelişen *Streptomyces* kolonileri diğerlerinden oluşturdukları karakteristik misel ve pigment durumlarına göre seçilerek izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca yapılan tüm izolasyon çalışmaları sonucunda sayılan *Streptomyces* bakterilerinin ve toplam canlı bakterilerin sayım sonuçları Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. İzolasyon çalışması sonucu *Streptomyces* için Medium 65 agar besi ortamındaki izolatların toplam bakteri sayım sonuçları.



Şekil 2.İzolasyonu yapılan ve saflaştırılan *Streptomyces* kolonileri. a, b: izolasyon petrileri, c, d, g, h: saflaştırma petrileri, e, f: koloni morfolojileri.

### Renk Gruplandırması

Saflaştırılan toplam 80 *Streptomyces* izolatı Oatmeal Agar besi ortamında ekim sonucu *Streptomyces* test izolatları havasal miselyum rengine göre 4 ana renk grubuna ayrılmıştır.1.grup havasal miselyum rengi beyaz, 2.grup havasal miselyum rengi sarı, 3. Grup havasal miselyum rengi yeşil ve 4.grup havasal miselyum rengi gri olarak belirlenmiştir.4 ana renk grubuna ayırdıktan sonra substrat ve melanin üretimi dikkate alınarak yapılmış ve izolatlar 22 (Beyaz), 37 (Sarı),15 (Gri), ve 3 (Pembe) test organizması içermiştir. Oluşan bu gruplar daha önce yapılan izolasyon ve teşhis çalışmaları ile uygunluk göstermektedir (Atalan ve ark., 2000). Renk grubuna göre ayrılan 4 ana grubun üyelerinin çoğunlukla aynı izolatlar olduğunu belirlenirken, özellikle havasal misel rengi gri olan izolatların IDENTAX teşhis programına göre de *Streptomyces exfoliatus* olarak kesin teşhisi yapılabilmiş, renk grubu ile teşhis matriksi arasında uygunluk gösterdiği belirlenmiştir.

### Antimikrobiyal Aktivite

Saflaştırılmış olan 80 *Streptomyces* suşu toplamda 4 adet patojen ve nonpatojen test mikroorganizmasına karşı antimikrobiyal aktivite özelliklerinin belirlenmesi amacıyla Bennet's agar içeren besi ortamına ekildi. Ekimi yapılan suşların bulunduğu petri kapları 24 saat boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakıldıktan sonra türlerin test engel organizmalarına karşı antimikrobiyal aktiviteleri belirlendi. Çalışmada kullanılan *Escherichia coli*'ye *Streptomyces* izolatlarının % 16,25'i antagonistik etki gösterdi. Diğer patojen ve nonpatojen test mikroorganizmalarından *Salmonella pneumonia* ve *Enterococcus faecalis* % 8,25'i, *Staphylococcus aureus* % 87,5'i, *Shigella flexneri* % 31,25'i, *Pseudomonas aeruginosa* % 13,75'i antimikrobiyal

aktivite göstermiştir. Birçok yazar ayrıca *Streptomyces* izolatlarının gram-pozitif bakterilere karşı oldukça aktif görüldüğünü bildirmiştir (Hamdi ve ark., 1980; Hussein ve ark., 1980; Saadoun ve ark., 1998). Yapmış olduğumuz çalışmada özellikle *Staphylococcus aureus*'a gösterilen mikrobiyal aktivite ile daha önceki çalışmalarla paralellik göstermiştir. Seçkin (2018) yaptığı çalışmada gözlemler sonucunda *Streptomyces* izolatlarının % 28.49'u *Esherichia coli*'ye, % 48.04'i *Staphylococcus aureus*'a ve % 6.70'i *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı antagonistik etkide bulunduğunu belirtmiştir.

### Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Test organizmalarının Neomisin (100 µg/ml), Rifampisin (50 µg/ml), Oleandomisin (100 µg/ml) ve Penisilin G (50 µg/ml) antibiyotiklerine karşı duyarlılıkları tespit edildi. Tüm izolatların %83,75'i Neomisine, %71,25'i Rifampisine, %63,75'i Penisilin G , %17,50'i Oleandomisine dirençli olduğu belirlendi. Orhan (2013)'nın yapmış olduğu çalışmada izolatların tümünün Oleandomisin ve Penisilin G'ye direnç gösterdiğini ortaya koymuştur. Seçkin (2018)'in çalışmasında 177 izolat içerisinde izolatların neredeyse %50'sinin Penisilin G ve Oleandomisin'e direnç gösterdiğini belirtmiştir. Yapılan çalışmaların sonuçlarının farklı olması muhtemelen farklı habitatlardan kaynaklanmaktadır.

### Degradasyon Aktiviteleri

*Streptomyces* suşlarının %96,75'i ksantini, %99,6 elastini, %100'ü guanin, tirozin, nişasta ve tween 80'i, %99,8'i arbutini, %77,25'i üreyi, %95'i jelatini, %97,5'i kazeini, degrade edebilme kabiliyeti gözlenirken, tallus asetat hiçbir izolatta degrade yeteneği göstermemiştir. Orhan (2013) ve Seçkin (2018) yapmış olduğu degradasyon testlerinde sonuçlar %80 üzerindedir ve bu çalışmamızla paralellik göstermiştir. Ertaş ve ark., (2013)'nin yapmış olduğu çalışmada da *yine* Actinomycetales ordosuna ait *Micromonosora* bakterileri benzer sonuçlar göstermiştir.

### Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Proteaz, lipaz, kitinaz ve aljinat liazlar gibi çeşitli enzimlerin denizsel *Streptomyces*'ler tarafından üretildiği bildirilmiştir (Dharmaraj, 2010). *Streptomyces* ayrıca, L-asparagini L-aspartik aside ve amonyağa dönüştüren ve kemoterapötik bir ajan olarak kullanılan bir enzim olan iyi bir L asparaginaz kaynağı olarak da görev yapar (Fisher ve Wray, 2002). L-asparaginaz son yıllarda antikarsinojenik potansiyeli nedeniyle artan ilgi görmüştür. *S. karnatakensis*, *S. venezualae*, *S. longsporusflavus* ve *S. albidoflavus* gibi birçok karasal *Streptomyces*, saptanabilir miktarda L-asparaginaz üretme yeteneğine sahiptir (Narayana ve ark., 2008). *S. aurantiacus* gibi deniz *Streptomyces*'lerinden L-asparaginaz üretimi konusunda sınırlı sayıda rapor bulunmaktadır (Gupta ve ark., 2007).

Enzim aktivitesine göre asparaginaz (+) türlerin %84,6'sı *S.exfoliatus* türü olduğu belirlenerek bu izolatların birbirlerine olan benzerliğide %96,72 olarak belirlenmiştir. Asparaginaz (+) türlerden D0018 izolatı %99,34 oranında *S.purpureus* olduğu belirlenmiştir. Selülaz (+) olan D0074 türümüzünde %99,98 oranında *S.exfoliatus* olduğu belirlenmiştir. Amilaz ve Lipaz enzim aktivitesi için tüm izolatlarımız (-) sonuç göstermiştir. Proteaz (+) izolatlarımızın çoğunluğu *Streptomyces exfoliatus*, bir izolatın da *Streptomyces atroolivaceus* olduğu belirlenmiştir.

Enzim aktivite çalışmaları IDENTAX programına göre toplam *Streptomyces* izolatlarının %15'i asparaginaz, %5'i proteaz, sadece D0074 suşu selülaz enzim aktivitesi gösterirken, hiçbir suşta amilaz ve lipaz enzimleri aktivite göstermemiştir.

### Nümerik Analiz Sonuçları ve Bilgisayar Yardımıyla Teşhis

Seçilen 80 *Streptomyces* test suşu için yapılan 69 farklı testin sonuçları MVSP 3.2 (Multi-Variate Statistical Package) programında  $S_{SM}$  katsayısına göre UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average Cluster ) analizleri yapılmıştır (Şekil 3). Dendogram %85 benzerlik oranına göre toplam 9 küme oluştururken bu kümelerin 4'ü major, 5'i minör olur iken, 2 tane tekli üye oluşturmuştur. Oluşan kümeler IX. küme 39 izolat içerirken, diğer major gruplar 10'un üzerinde izolat içermiştir. IX. kümede yer alan D0001 ve D0080 nolu izolatların 4 nolu (Geyve -kuzey) lokasyondan olduğu ve %99 'a yakın benzerlik gösterip IDENTAX teşhis programında da aynı tür olduğu tespit edilmiştir. Tekli üyelerden D0055, D0056 izolatları 4 nolu (Geyve -kuzey), D0059, D0060, D0064 izolatları 5 nolu (Geyve-güney) lokasyondan alınmıştır. Yoğun olarak test suşları %95 üzerinde benzerlik göstermiştir. İzolatların tümünde oluşturduğu kümelere bulunan üyelerin rakım ve alındığı lokasyon bakımından paralellik gösterdiği görülmüştür.

Williams ve arkadaşları (1983a), 394 tip *Streptomyces* bakterisini incelemiş ve 139 karaktere göre % 77,5 benzerlik gösterenleri, 19 büyük ve 40 küçük küme grubuna ayırmıştır. Bu veriler ile olasılık tanımlama matriksi oluşturan Williams ve arkadaşları aynı yıl (Williams ve ark., 1983b) en önemli 41 karakteri seçmiş ve 19 *Streptomyces* kümesi ve belirleyici olarak 2 *Streptioverticillium* ve "*Nocardia mediteiranea*" ile olasılık tanımlama matriksini, MATIDEN

bilgisayar programında kullanmışlardır. Yine [Öztürk \(2000\)](#) yapmış olduğu çalışmada  $S_{SM}$  analizi ile % 82,5 benzerlik seviyesi gösteren yedi majör, 9 minör ve 10 tek üyeli küme belirlemiştir. Bizim çalışmamız da nümerik analiz için yapılan 69 test sonuçlarının tamamı MVSP 3.2 (Multi-Variate Statistical Package; Ek IV) programına 1/0 olarak girilerek analizleri yapılmıştır. UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic average) Cluster Analizi  $S_{SM}$  (simple matching coefficient) benzerlik dendogramları oluşturulmuştur. Bu dendogramda ( $S_{SM}$ ) sonuçlarına göre % 85 benzerlik oranı esas alındığında test *Streptomyces* bakterileri 9 grup ve 2 tekli üyeye ayrılmıştır.  $S_{SM}$  kofisiyenti ile elde edilen dendogramdaki kümeler en az bir ve en fazla 39 suş içermiştir. Ayrıca çalışmamızda test organizmaları  $S_{SM}$  katsayısına göre oluşan kümeler renk gruplandırmasında oluşan kümelerle uygunluk göstermiştir. 4 major , 5 minör ve 2 tek üyeli küme oluşmuştur. Farklı lokasyonlardan izole edilen test suşları nümerik taksonomi dendogramında çoğunlukla homojen kümeler oluşmuştur. Bu noktada farklı habitatlarda yaşayan *Streptomyces* türlerinin farklılık gösterdiğini belirtebiliriz. Sonuçlarımız topraktan izole edilmiş suşların pigmentasyonuna göre oluşan kümeler aynı nümerik taksonlara ayrıldığını desteklemektedir ([Williams ve Vickers, 1988](#)). Her ne kadar nümerik analiz sonucu oluşan dendogram tekli üyeler barındırsa da izole edilen test suşları oluşan kümelerde tam olarak ayrışma göstermiştir. Yani aynı lokasyondan izole edilen suşlar çoğunlukla aynı kümelerde yer almıştır.

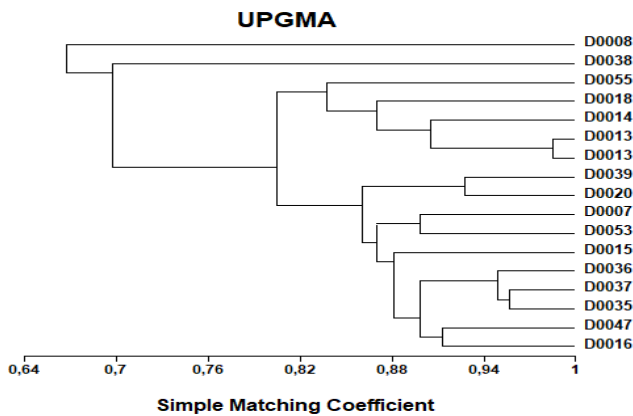
[Williams ve ark., \(1983b\)](#) ve [Langham ve ark. \(1999\)](#) tarafından *Streptomyces* major kümeler için belirledikleri teşhis matrislerine göre yapılan teşhislerde 1. renk grubundan seçilen izolatlar *S. exfoliatus*, *S. atroolivaceus*, *S. chromofuscus*, *S. purpureus* oldukları belirlenmiştir. Renk gruplandırması aynı olan *Streptomyces* türleri nümerik analiz sonucu aynı grupta yer almıştır ve çalışmalarımızla uyumluluk göstermiştir.

*Streptomyces* suşlarının yapılan testlere göre bilgisayar yardımıyla teşhisleri için IDENTAX Bacterial Identifier 1.2 programı kullanılarak tek benzerlik matrisi kullanılmıştır. Bu majör ([Williams ve ark., 1983b](#)) ve minör kümeler ([Langham ve ark., 1999](#)) için belirlenen benzerlik matrisidir. Bu matris ile teşhis edilen suşların mevcut benzerlik matrisleri içerisinde en fazla benzerlik gösterdikleri tür en yakın takson olarak kabul edilmiştir. Sonuçta toplam 80 *Streptomyces* suşundan 13 tanesi dışındaki toplam 67 izolatın programa göre kesin teşhisleri yapılmıştır. 13 adet izolatın mevcut taksonomik gruplarda yer alan türlerle %85'in altında benzerlik göstermesinden dolayı teşhisin tamamlanamadığı belirlenmiştir.

Kullandığımız teşhis matrisi [Williams ve ark., \(1983b\)](#) tarafından topraktan izole edilen *Streptomyces* suşlarının %81,3'ünü, [Stanton \(1984\)](#) sudan izole ettiği suşların %43,8'ini, [Goodfellow ve Haynes \(1984\)](#) deniz suyundan izole ettikleri suşların %70'ini ve [Atalan \(1995\)](#) ise %80'ini doğru teşhis etmişlerdir. Yine [Saddler \(1988\)](#) farklı habitatlarda izole ettiği *Streptomyces* suşlarının %70'ini teşhis etmiştir. Çalışmamızda ise test suşlarımızın %83,75'i teşhis edilmiştir. Bu değer önceki teşhis oranları ile uygunluk göstermektedir. Bununla birlikte teşhis matrisi mevcut *Streptomyces* türlerin verilerini tam içermediği için eksik kalmaktadır.

Çizelge 1 .Toplanan toprak numunelerinin nem ve pH değerleri

| Lokasyon   | Alınan lokasyon           | Nem (%) | pH   |
|------------|---------------------------|---------|------|
| 1.lokasyon | Karaçam çıkışı            | 4       | 6,13 |
| 2.lokasyon | Doğançay (Aşağı mahalle)  | 9       | 6,89 |
| 3.lokasyon | Doğançay (Yukarı mahalle) | 9       | 6,79 |
| 4.lokasyon | Geyve (Kuzey)             | 8       | 7,16 |
| 5.lokasyon | Geyve (Güney)             | 8       | 6,69 |



Şekil 3. Tüm *Streptomyces* test izolatlarından seçilen temsilcilere 69 farklı karakter bakımından uygulanan test sonuçlarının MVSP 3.2. (Multi Variate Statistical Package) programı ( $S_{SM}$ : Simple Matching Coefficient) Basit Eşleştirme Katsayısı ile oluşturulan dendogramı.

## Sonuç

*Streptomyces* bakterileri endüstriyel anlamda oldukça önemli bir cinstir. Dolayısıyla bu cinslerin teşhisi önem arz etmektedir. Yaptığımız çalışma ile *Streptomyces* bakterilerinin 69 farklı testle bilgisayar yardımı ile teşhisleri yapılmıştır. Enzim aktivite sonuçlarını göz önünde bulundurarak, özellikle asparaginaz enzimi için türlerimizin %15'inin pozitif olması ile sonuçlarımızın oldukça anlamlı olduğu ve asparaginaz enziminin uygulamalı tıpta kullanımı düşünüldüğü zaman pozitif suşlarımızın bu enzimin biyoteknolojisinde oldukça faydalı olacağı kanaatindeyiz.

Sonuç olarak, endüstriyel enzimler olan amilaz, selüloz, L-asparaginaz, proteaz ve lipaz çeşitli mikroorganizmalardan elde edilebilirler. Günümüzde birçok endüstriyel kullanım alanı bulmuş olan bu enzimler yapılan çalışmaların ışığında kullanım alanlarının gelecekte daha da artacağı açıktır.

## Kaynaklar

- Atalan E, Manfio GP, Ward AC, Kroppenstedt RM, Goodfellow M. 2000. Biosystematic studied on novel *Streptomyces* from soil. *Antonie van Leeuwenhoek* 77:337-353.
- Atalan E. 1995. Identification of *Streptomyces* isolated from environmental soil samples using rapid enzyme data. *Journal of Environmental Science and Health Part A* 30(6):1133-1143.
- Aygan A, Arıkan B, Korkmaz H, Dinçer S, Çolak O. 2008. Highly thermostable and alkaline  $\alpha$ -amylase from a halotolerant-alkaliphilic *Bacillus* sp. AB68. *Braz. J. Microbiol.* 39(3):547-53.
- Demain AL, Solomon, NA. 1981. In *Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering*, pp. 3-14. Scientific American, Freeman &Comp., San Francisco.
- Dharmaraj S. 2010. Marine *Streptomyces* as a novel source of bioactive substances. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26:2123-2139.
- Ertaş M, Özdemir K, Atalan E. 2013. Isolation and characterization of *Micromonospora* bacteria from various soil samples obtained around Lake Van. *African Journal of Biotechnology* 12(21):3283-3287.
- Fisher SH, Wray Jr LV. 2002. *Bacillus subtilis* 168 contains two differentially regulated genes encoding L-asparaginase. *Journal of Bacteriology* 184:2148-2154
- Goodfellow M, Haynes JA. 1984. Actinomycetes in marine sediments. In *Biological biochemical and biomedical aspect of Actinomycetes*. Academic Pres, Newyork, 452-472.
- Gulati R, Westphal JD, Shortell SM. 1997. Customization or Conformity? An Institutional and Network Perspective on the Content and Consequences of TQM Adoption. *Administrative Science Quarterly* 42:366-394.
- Gupta N, Mishra S, Basak UC. 2007. Occurrence of *Streptomyces aurantiacus* in mangroves of Bhitarkanika. *Malaysian Journal of Microbiology* 3:7-14.
- Hakamada Y, Koike K, Yoshimatsu T, Mori H, Kobayashi T, Ito S. 1997. Thermostable alkaline cellulase from an alkaliphilic isolate, *Bacillus* sp. KSM-S237. *Extremophiles*, 1:151-156.
- Hamdi YA, Ahmed D, Al-Tai, A.M. 1980. Genera and species of actinomycetes isolated from Iraqi soils. *Egyptian Journal of Microbiology* 15:7-22.
- Hayakawa M, Yoshida Y, Imura Y. 2004. Selective isolation of bioactive soil Actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster. *Journal of Applied Microbiology* 96:973-981.
- Hussein AM, Rajab AM, Elgammal AA, Mansour FA, Sami E, Helmy M, Sheheta NE. 1980. Taxonomy of gray pigmented *Streptomyces* spp. isolated from Egyptian soil. *Egyptian Journal of Botany* 23:9-16.
- Jones KL. 1949. Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic. *Journal of Bacteriology* 57:141-145.
- Karnetova J, Mateju J, Rezarka T, Prochazka P, Nohynek M, Rokes J. 1984. Estimation of lypsae activity by the diffusion plate method. *Folia Microbiologica* 29:346-347.
- Langham CD, Williams ST, Sneath PHA, Mortimer AM. 1999. New probability matrices for identification of *Streptomyces*. *Journal of General Microbiology* 135:121- 133.
- Narayana KJP, Kumar KG, Vijayalakshmi M. 2008. L-asparaginase production by *Streptomyces albidoflavus*. *Indian Journal of Microbiology* 48:331-336.
- Orhan E, 2013. Tuzcul Habitatlardan Alınan Toprak Numunelerinden Halofilik *Streptomyces* Türlerinin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Teşhisi. Yüksek Lisans Tezi. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- 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.
- Öztürk E, 2000. Termofilik *Streptomyces*'lerin İzolasyonu ve Nümerik Taksonomisi. Y.L.Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Samsun, Türkiye.
- Saadoun I, Mohammadi MJ, Al-Momani F, Meqdam M. 1998 Diversity of soil streptomycetes in northern Jordan. *Actinomycetes* 9:53-58.
- Saddler GS. 1988. Selective isolation and rapid identification of streptomycetes. Ph.D. Thesis, Department of Microbiology, University of Newcastle upon Tyne (UK).

- Seçkin H, 2018. Van Gölüne Dökülen Akarsulardan Streptomyces Türlerinin İzolasyonu Teşhisi ve Moleküler Tanısı. Doktora Tezi. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Semêdo L, Gomes RC, Linhares AA, Duarte GF, Nascimento RP, Rosado AS, Margis-Pinheiro M, Margis R, Silva K, Alviano CS, Manfio GP, Soares R, Linhares LF, Coelho R. 2004. Streptomyces drozdowiczii sp. nov., a novel cellulolytic streptomycete from soil in Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:1323-1328.
- Shirling EB, Gottlieb D. 1966. Methods for characterization of Streptomyces species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 16:313-340.
- Stanton LJ. 1984. Actinomycetes Associated with Freshwater Habitats. PhD thesis, University of Newcastle upon Tyne.
- Vickers JC, Williams ST, Ross GW. 1984. A taxonomic approach to selective isolation of Streptomyces. In Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of actinomycetes, pp. 553-561. Edited by L. Ortiz-Ortiz, L. F. Bojalil and V. Yakoleff. Academic Press: Orlando.
- Williams ST, Goodfellow M, Alderson G, Wellington EMH, Sneath PHA, Sackin MJ. 1983a. Numerical classification of Streptomyces and related genera. *Journal of General Microbiology* 129:1743-1813.
- Williams ST, Goodfellow M, Wellington EMH, Vickers JC, Alderson G, Sneath PHA, Sackin MJ, Mortimer AM. 1983b. A probability matrix for identification of some streptomycetes. *Journal of General Microbiology* 129:1815- 1830.
- Williams ST, Vickers JC. 1988. Detection of actinomycetes in the natural environment-problems and perspectives. In Biology of Actinomycetes 88, Edited by Y. Okami, T. Beppu ve H. Ogawara, Japan Scientific Societies Pres, Tokyo, 265-270.
- Wiseman A. 1987. Handbook of Enzymes Biotechnology. Second Edition. C 3. The Application of Enzymes in Industry p. 274-373.
- Yin C, Kikuchi K, Hochgreb T, Poss KD, Stainier DY. 2010. Handz Regulates Extracellular Matrix Remodeling Essential for Gut-Looping Morphogenesis in Zebrafish. *Developmental Cell* 18(6): 973-984