



T.C.

AKSARAY ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ-MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BAZI MAVİ-YEŞİL BAKTERİ SUŞLARININ RAPD-PCR
YÖNTEMİYLE GENETİK KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kadir ARICAK

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Mehmet KARACA

AKSARAY, 2015



T.C.

AKSARAY ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ-MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BAZI MAVİ-YEŞİL BAKTERİ SUŞLARININ RAPD-PCR
YÖNTEMİYLE GENETİK KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kadir ARICAK

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Mehmet KARACA

AKSARAY, 2015

AKSARAY ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ONAY BELGESİ

Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 122307007 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi, “Kadir ARICAK”, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “BAZI MAVİ-YEŞİL BAKTERİ SUŞLARININ RAPD-PCR YÖNTEMİYLE GENETİK KARAKTERİZASYONU” başlıklı tezini, aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Yrd. Doç. Dr. Mehmet KARACA**
 Aksaray Üniversitesi

Jüri Üyesi : **Yrd. Doç. Dr. Mesut ŞAM**
 Aksaray Üniversitesi

Jüri Üyesi : **Yrd. Doç. Dr. Neşe Hayat AKSOY**
 Aksaray Üniversitesi

Teslim Tarihi :

Savunma Tarihi : **04 Mart 2015**

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu ve bu eserleri her kullanışımında alıntı yaparak yararlandığımı belirtir; bunu şerefimle doğrularım.

Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

Kadir ARICAK

İmza

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması, ülkemizin değişik bazı göllerinden toplanan, biyokimyasal ve morfolojik tanımlamaları yapılmış olan Siyanobakteri izolatlarının genetik karakterizasyonunu gerçekleştirmek amacıyla yapılmıştır. Proje kapsamında PCR temelli, hızlı ve güvenilir bir yöntem olan RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-PCR; rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA-PCR) kullanılmıştır.

Deneyisel çalışmalar Aksaray Üniversitesi, Bilimsel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi (ASÜBTAM) - Moleküler Biyoloji ve Metabolizma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Yüksek Lisans öğrencisi Kadir ARICAK'ın tezi olan “Bazı Mavi-Yeşil Bakteri Türlerinin RAPD-PCR Yöntemiyle Genetik Karakterizasyonu” adlı proje Aksaray Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından, 2013/50 kod no. ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam sırasında, ihtiyacım olan her an bilgisi, tecrübeleri ve tüm içtenliğiyle devamlı yanımda olan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Mehmet KARACA'ya,

Siyanobakterilerin belirlenmesinde ve materyallerinin elde edilmesinde yardımlarını esirgemeyen eş danışmanım Aksaray Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Fatma GÜRBÜZ'e,

İstatiksel veri hazırlamada ve dendrogram çizimlerinde bilgi ve tecrübelerini paylaşan Aksaray Üniversitesi Fen-Edb. Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Tolga KANKILIÇ'a,

Proje çalışmalarına sağlamış oldukları destekten ve yardımdan dolayı Aksaray Üniversitesi Rektörlüğü ve Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi yetkililerine,

Yüksek lisans eğitimim süresince bana her konuda destek olan, her zorlukta yanımda olan sevgili eşim Betül ARICAK'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
DOĞRULUK BEYANI.....	i
ÖNSÖZ.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
ŞEKİL DİZİNİ	vii
ÇİZELGE DİZİNİ	viii
SİMGELER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLGİSİ.....	2
2.1. Morfoloji.....	2
2.2. Siyanobakteri Toksinleri.....	6
2.3. Siyanobakterilerin Tanımlanması.....	7
2.3.1. Morfolojik tanımlama.....	7
2.3.2. Moleküler tanımlama	7
2.4. RAPD-PCR.....	10
2.4.1. RAPD-PCR reaksiyonu.....	10
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	12
3.1 Siyanobakterilerin Üretilmesi.....	12
3.2. Siyanobakteri Türleri ve Toplama Alanları.....	14
3.3. Siyanobakteri Genomik DNA İzolasyonu	14
3.4. Genomik DNA Konsantrasyon Ölçümü	15
3.5. RAPD Primerleri	16
3.6. RAPD-PCR Döngü Şartları	17
3.6.1. RAPD-PCR reaksiyon karışımı.....	17
3.6.2. RAPD-PCR döngüsü.....	17
3.7. Agaroz Jel Elektroforezi	18
3.8. Dendrogram Çizimi	18
4. BULGULAR	19
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	32
KAYNAKLAR	34
ÖZGEÇMİŞ.....	37

ÖZET

Siyanobakteriler; geniş yaşam alanına sahip, yüksek çeşitlilik gösteren, ekolojik açıdan önemli organizmalardır. Bu canlıların tanımlanmaları, sınıflandırılmaları oldukça zor ve karmaşıktır. DNA fingerprint ve diğer PCR temelli moleküler yaklaşımlar, son yıllarda bu canlıların moleküler sistematik ve genetik karakterizasyonunda benimsenmeye ve kullanılmaya başlanmıştır.

Bu çalışma kapsamında toplamda 7 bakteri izolatu, 15 farklı rastgele seçilen primerler kullanılarak RAPD-PCR tekniğı ile analiz edilmiştir. Bakteri izolatları, tamamı polimorfik olan 306 adet RAPD-PCR ürünü oluşturmıştır. Seçilen primerlerin %100 polimorfik fragmanlar ortaya çıkardığı ve bakteri türlerinin tanımlamasında yüksek verimlilik sağladığı tespit edilmiştir.

En az 12 ve en fazla 35 farklı PCR fragmanı sırasıyla OPA-14 ve HİP-GC primerleri ile elde edilmiştir. RAPD-PCR ürünlerinin fragman büyüklüğü 175-3000 bp arasında değişmektedir.

Bakteri izolatları arasındaki genetik akrabalık ilişkisini ortaya çıkarmak için Nei's Genetik Uzaklık değerleri kullanarak iki farklı dendrogram (UPGMA ve Neighbor Joining) oluşturulmuştur. Bu verilere göre *Synechococcus elongatus* ve *Pseudoanabaena moniliformis* en uzak türler, *Anabaena affinis* ve *Arthrospira sp.* ise birbirine en yakın türler olarak tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, çalışmalarımızda kullandığımız RAPD-PCR yönteminin ve kullanılan random primerlerin farklı Siyanobakteri izolatlarının genetik karakterizasyonunda ve moleküler sistematiginde başarılı bir şekilde kullanılabileceğı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Mavi-yeşil bakteri, genetik karakterizasyon, RAPD-PCR tekniğı

ABSTRACT

Cyanobacteria are the ecologically important organisms with their spacious living areas and highly diverse properties. Identification and classification of these organisms is quite difficult and complex. DNA fingerprint and many other PCR-based molecular approaches have been adopted and well used in the molecular systematics and genetic characterization of Cyanobacteria. In this study 7 bacterial isolates were analyzed through the RAPD-PCR method using 15 different randomly selected primers. All the bacterial isolates were produced completely polymorphic 306 RAPD-PCR products. Selected primers have generated 100% polymorphic fragments and have been found to provide high efficiency in the characterization of bacterial species. A minimum 12 and maximum 35 different PCR fragments were produced by the OPA-14 and HIP-GC primers respectively. The fragment size of RAPD-PCR products were varied between 175-3000 bp. Using Nei's Genetic Distance values; two different dendrograms (UPGMA and Neighbor Joining) were created to identify genetic relationships among analyzed bacterial isolates. According to the results, the *Synechococcus elongatus* and *Pseudoanabaena moniliformis* are the most distant species, while the *Anabaena affinis* and *Arthrospira sp.* are the closest species. Consequently, the RAPD-PCR method and randomly selected RAPD primers used in this study can successfully be utilized for genetic characterizations and molecular systematics of different Cyanobacteria isolates.

Key Words: Cyanobacteria, genetic characterization, RAPD-PCR technique

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1: Vejetatif hücreleri, akinetler ve heterosistleri gösteren <i>Anabaena crassa</i> 'nın ışık mikrografı.	5
Şekil 2.2: Glutamin ve glutamat içine azot fiksasyonunun sıralı birleşimi ve azot fiksasyonunun kimyası.....	5
Şekil 2.3: RAPD markırlarının oluşumu mekanizması.	11
Şekil 4.1: Neighbor-Joining ile çizilen dendrogram sonuçları.	23
Şekil 4.2: UPGMA ile çizilen dendrogram sonuçları.	24
Şekil 4.3: CRA-22 primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.	24
Şekil 4.4: CRA-23 primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.	25
Şekil 4.5: CRA-25 primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.	25
Şekil 4.6: CRA-26 primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.	26
Şekil 4.7: HİP-CA primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.	26
Şekil 4.8: HİP-GC primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.	27
Şekil 4.9: HİP-TG primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.	27
Şekil 4.10: MM primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.	28
Şekil 4.11: OPA-08 primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.	28
Şekil 4.12: OPA-11 primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.	29
Şekil 4.13: OPA-12 primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.	29
Şekil 4.14: OPA-13 primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.	30
Şekil 4.15: OPA-14 primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.	30
Şekil 4.16: OPA-15 primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.	31
Şekil 4.17: OPA-18 primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.	31

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1: Siyanobakteri toksinleri.	6
Çizelge 3.1: Bakteri türleri ve toplama alanları.	14
Çizelge 3.2: Bakteri türlerine ait genomik DNA örneklerinin nanodrop ölçümleri. .15	15
Çizelge 3.3: RAPD-PCR reaksiyonlarında kullanılan primerlerin dizileri, Tm dereceleri ve % GC oranları.	16
Çizelge 4.1: Siyanobakteri türlerinden elde edilen RAPD bilgisinin genel değerlendirilmesi.	19
Çizelge 4.2: RAPD-PCR reaksiyonlarından elde edilen bant karakteristikleri ve polimorfizm yüzdeleri.	20
Çizelge 4.3: Nei's Genetik Uzaklık matrisi değerleri.	22
Çizelge 4.4: Nei's Genetik Benzerlik matrisi değerleri.	22

SİMGELER DİZİNİ

mA	Miliamper
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
U	Enzim ünitesi
μ l	Mikrolitre
μ M	Mikromolar
%GC	DNA/RNA üzerindeki guanin-sitozin oranı

KISALTMALAR DİZİNİ

bç	Baz çifti
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
dk	Dakika
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
g	Gram
PCR	Polymerase chain reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
Pmol	Pikomol
RAPD	Random amplified polymorphich DNA (Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA)
RNA	Ribonükleik asit
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tm	Erime sıcaklığı (melting temparature)
UPGMA	Unweighted pair group method using arithmetic averages (Aritmetik ortalamayı kullanan ağırlıksız çift grup metodu)
UV	Ultraviyole ışığı

1. GİRİŞ

Bu tezin temel amacı; ülkemizin değişik bazı göllerinden toplanan, biyokimyasal ve morfolojik tanımlamaları daha önce yapılmış olan bazı Siyanobakteri izolatlarının genetik karakterizasyonunu gerçekleştirmektir.

Bilinen en eski organizmalara ait doğrudan kanıtlar, günümüzden yaklaşık 3,5 milyar yıl önce denizlerde yaşayan, fotosentez yapabilen ve prokaryotik hücre yapısına sahip olan fotosentetik Siyanobakteriler yani mavi-yeşil alglerdir (*Cyanobacteria: Cyanophyta*) (Oinam vd., 2011).

Siyanobakteriler; geniş yaşam alanına sahip, yüksek çeşitlilik gösteren, ekolojik açıdan önemli organizmalardır. Bunun için morfolojik ve ekolojik varyantları çok çeşitlilik gösterir. Bu yüzden tanımlanması, sınıflandırılması zor ve karışıktır. PCR temelli DNA fingerprint gibi moleküler yaklaşımlar, taksonomik çalışmalarda benimsenmeye başlamıştır (Neilan vd., 1995).

Siyanobakteriler; dünya üzerinde geniş yer işgal eden, denizlerin temel besin kaynağını oluşturan fotosentetik organizmalardır. Diğer önemli işlevleri, atmosferik azotu asimile ederek diğer organizmaların kullanabileceği mineral azota dönüştürebilmeleridir (Kammennaya vd., 2011).

2. LİTERATÜR BİLGİSİ

2.1. Morfoloji

Siyanobakteriler fotosentetik pigmentler içerirler ve bu pigmentler nedeniyle mavi-yeşil alg olarak da adlandırılırlar. Mavi-yeşil algler, sıcak su kaynaklarından, Antarktika'da geçici olarak donan su habitatlarına kadar geniş bir yayılım gösteren en eski organizma grubudur (Hitzfeld vd., 2000). Hem tatlı sularda hem de deniz sularında bulunurlar. Mevcut taksonomiye göre, 150 cins ve 2000 tür tanımlanmıştır. Bunların 40 kadarının toksik olduğu belirlenmiştir (Skulberg vd., 1993).

Mavi-yeşil algler uzun yıllar Siyanobakteriler olarak adlandırıldıktan sonra Bergey'in "Bakterilerin Belirleyici Klavuzu" çalışmasından sonra ayrı bir bölüm olarak sınıflandırılmış ve prokaryotlar olarak adlandırılmıştır (Buchanan ve Gibbons, 1974).

Siyanobakterilerin büyük çoğunluğu aerobik fototrof organizmalardır. Su, CO₂, inorganik bileşiklere ve ışığa ihtiyaç duyarlar. Buna rağmen bazı Siyanobakteri türleri heterotrofiktir (Fay 1965). Tek ve çok hücreli serbest yaşayabilenleri olduğu gibi müsilağ bir zarla koloni oluşturan Siyanobakteriler de vardır. Bazılarında tek hücrelerin bir araya gelmesiyle trikom yapısı oluşmuştur. Trikom, zarlı yapı ile çevrilmiş ise filament adını alır. Birden fazla trikom bir filament içerisinde dallı yapı oluşturur. Bu yapı tallus adını alır.

Siyanobakterilerin hücre duvarı gram (-) bakterilerinkine benzer. Hücre zarı üzerinde peptidoglikan tabaka vardır. Bu tabaka şeker türevi olan N-asetilgukozamin ve N-asetilmüramik asitten oluşmuştur ve yapıda pek çok amino asit mevcuttur. Peptidoglikan tabakasının dışında periplazmik boşluk vardır ve bu boşlukta peptidoglikan fibrillerinden oluşturulmuş gevşek bir ağ yapısı vardır. Bazı Siyanobakteriler bir kayma ile (*spiralsi ya da dönerek*) hareket etme yeteneğine sahiptir. Bu yeteneğe sahip olan bakterilerde iki ilave dış tabaka daha mevcuttur. Hücre duvarının dışında zarsı yapı (kapsül veya müsilağ oluşturan ekstrasellüler polimerik yapı (EPS) ve bir miktar sellüloz vardır. Bu yapı hücreyi kurumaktan korur

ve aktif gelişim içinde bu yapı gerekir. Bazen, spor ve akinetlerin oluşmasında da zarsı yapı gereklidir.

Siyanobakter hücresinin protoplazmik yapısı bakterilerinkine benzer. DNA hücrenin ortasında yer alır ve bu DNA histonları içermez. Tek hücreli Siyanobakterilerde DNA miktarı farklılık gösterir ve $1.6-8.6 \times 10^9$ dalton arasındadır. Bu yönü ile bakterilerdeki DNA miktarına benzerlik gösterir. Periferel protoplazma; tilakoidler, onlara eşlik eden fikobilizomlar ve glikojen granülleri içerir. Ribozomlar hücre içerisine dağılmış şekilde bulunur ancak merkezde en yüksek yoğunluğa ulaşırlar. Sitoplazma içerisinde ribozomal olmayan protein siyanofisin bulunur ve granüllü yapıya sahiptir. Siyanofisin polimeri poliaspartat iskelet üzerine eşit miktarda arjinin ve aspartik asitin bir araya gelmesinden oluşmuştur. Siyanofisinler azot fikse eden Siyanobakterilerde geçici azot deposu olarak görev yaparlar. Nitrojeni tutamayan Siyanobakterilerde de fikobilizomlar azotun tutulduğu yerlerdir. Bunun dışında protoplazmada karboksizomlar bakterilerdekine benzer ve karbondioksiti fikse eden enzim ribuloz-1,5-bifosfat karboksilaz/oksijenaz (Rubisco) içerir. İki tip karboksizom vardır. Fosfat depolamada görev yapan polifosfat yapılar (metakromatik veya volitin granülleri) daha çok genç gelişen hücrelerde görülür veya fosfatça yoksun ortamlarda gelişen hücrelerde görülür. Poliglukan granüller, tilakoid membran arası boşluklarda görevli hücrelerde mevcuttur. Bu granüller 14-16 glikoz molekülünün bir araya gelmesinden meydana gelen karbonhidrat bir yapıdır. Bu yapı amilopektine benzer bir yapıdır.

Çoğu Siyanobakteri gaz keselerine sahiptir. Gaz keseleri gaz ile dolu silindirik yapılardır. Gaz keseleri oldukça kırılğan ve zarsı bir yapıya sahiptirler. Bu zarsı yapı gazların geçişine izin verir. Ancak suyu dışarda tutan bir yapıya sahiptirler. Dolayısıyla içyapının hidrofobik dış yapının da hidrofilik karakterde olduğu tespit edilmiştir. Böylece yüzeyde oluşan bu yapı basınç şiddetini azaltır ve gaz keselerinin çökmesini önler. Bu yapılar Siyanobakterilerin su içinde dikey olarak yer değiştirmesine olanak sağlarlar. Ekolojik olarak Siyanobakteriler gaz keselerinin oluşuna göre ikiye ayrılır. Buna göre yaşam döngülerinin belli dönemlerinde vakuole sahip olanlar (*Tolypothrix* ve *Calothrix*'in bazı türlerinde ve *Gloeotrichia ghosei*'de) veya belli tip hücrelerde olanlar. Gaz keseleri, ışık yoğunluğu azaldığında ve gelişme hızı yavaşladığında daha belirgin duruma gelmektedir (Walsby, 1987; 2003). Bazı Siyanobakterilerde *Oscillatoria agardhii* türlerinde ve *Harmonia* türlerinde gaz

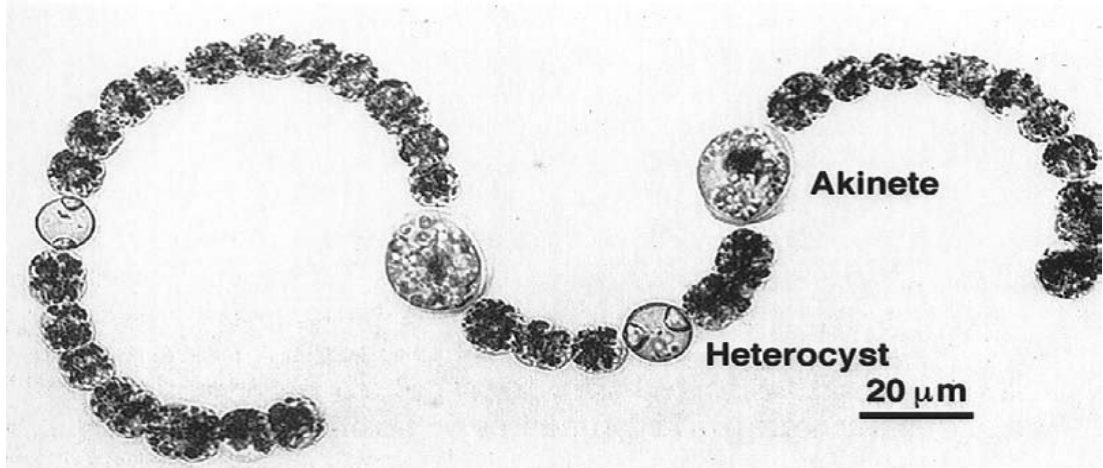
vakuolleri vardır. 2. grup ise; *Anabaena*, *Gloeotrichia*, *Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Trichodesmium*, ve *Phormidium* türlerinde gaz vakuolü vardır. Gaz vakuolleri Siyanobakterilere su yüzeyine yakın pozitif bir yüzerlik kazandırmıştır. Bu kitlelerin yüzerliğin kaybolması farklı nedenlerle olabilir. Yüzerliğin kaybolması büyük bir ihtimalle gaz keselerindeki artan turgor basıncı nedeniyle gaz vakuollerinin kaybına bağlı olabilir. Bazılarında da gaz keselerinin üretiminin durması ve hücre kitlesindeki artıştan dolayı olur (*Oscillatoria agardhii*).

Fotosentetik sistemde ışığı tutan pigmentler tilakoid zar üzerinde yer alan klorofil-a ve fikobilin proteinlerdir (Miller, 2005). Karotenoid ve fikobilinler, UV ışığı ve diğer yüksek ışık kaynaklı hücre hasarından koruma sağlamak için aksesuar fotosentez pigmentlerdir (Bartley ve Scolnick, 1995). Bazı Siyanobakteriler klorofil-a yerine klorofil-b ve klorofil-d içerebilir. Fikobilin proteinlerde kendi içerisinde 4'e ayrılır. C-fikosiyenin (max absorbans 620 nm), allofikosiyenin (max absorbans 650 nm), c-fikoeritin (max absorbans 565 nm) ve fikoeritrosiyenin (max absorbans 568 nm). Siyanobakterilerdeki karotenoidler ökaryotlardakinden farklıdır. Bunlarda ekinon ve mixoksantofil mevcuttur. Hücre renkleri mavi yeşilden, menekşe-kırmızıya kadar değişiklik gösterir. Menekşe-kırmızı renklilerde karotenoidler yeşil rengi maskeleymektedir. Aksesuar pigmentleri (fikobiliproteinler), fikosiyenin, allofikosiyenin ve fikoeritrinden oluşmaktadır (Cohen-Bazire ve Bryant, 1982; Douglas, 1994). Fikobiliprotein içermeyen takson ürünleri üç tiptir (Graham ve Wilcox, 2000).

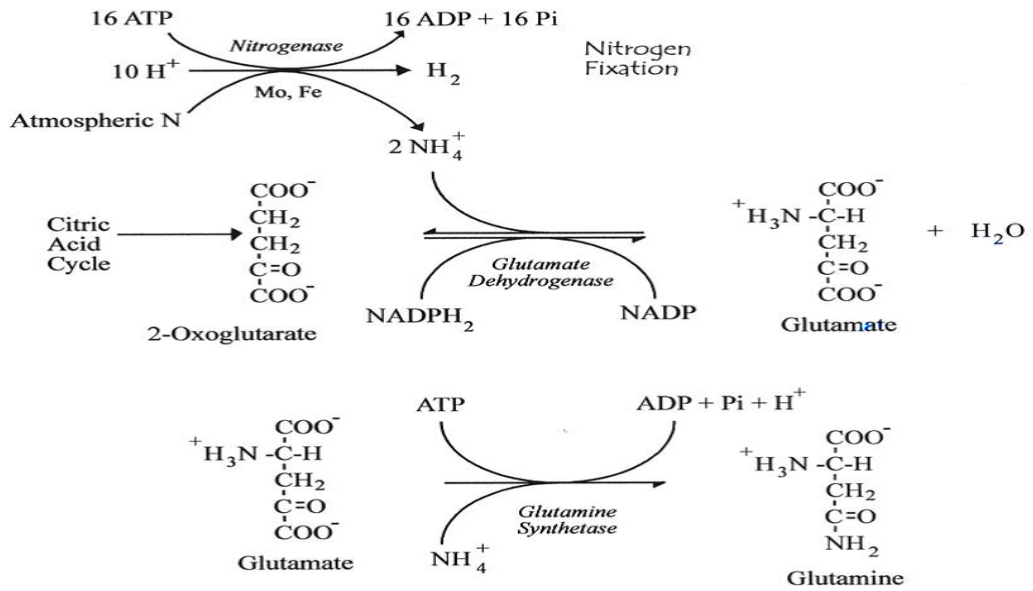
Pek çok Siyanobakteri suda olduğu gibi toprakta ve karasal habitatlarda yaşayarak, azot döngüsüne yardımcı olur ve azotu tespit ederek toprakta verimliliği artırır (Whitton, 1992). Havanın serbest azotunu tutma, büyük bir çoğunlukla filamentli heterosist içeren alglerde görüldüğü gibi heterosist içermeyen cinslerde de tespit edilmiştir (Carpenter vd., 1992).

Akinetler, vejetatif hüclerden daha geniş ve granüllü yapıya sahiptir. Granüllü yapı yüksek konsantrasyonda ve siyanofisinden kaynaklanmaktadır. Akinetler genellikle gram (+) bakterilerdeki endosporlarla benzetilir, ancak ne metabolik yapı olarak ne de ekstrem çevre şartlarına dayanıklılık içindir. Akinetler sadece heterosist oluşturan Siyanobakterilerde mevcuttur. Heterosistler de vejetatif hüclerlerden daha geniştirler ve ışık mikroskobu altında içleri şeffaf görünür. Heterosistler inaktiftirler. CO₂

tutmazlar ve O₂ üretirler. Ayrıca yüksek miktarda O₂ tükettikleri bilinmektedir ve atmosferik gazların geçişine engel olacak şekilde lamelli kalın hücre duvarı ile çevrelenmiştir. Dolayısıyla içyapısı anoksiktir bu da nitrogenaz enzimi için ideal ortam oluşturur. Herosistler vejetatif hücrelerden substrat sağlarlar. Dolayısıyla bunların vejetatif hücrelere bağlantısı mevcuttur (mikroplazmodesmata). Bu bağlantı muhtemelen glutanin formunda tutulmuş azotun diğer hücrelere iletilmesini sağlar.



Şekil 2.1: Vejetatif hücreleri, akinetler ve heterosistleri gösteren *Anabaena crassa*'nın ışık mikrofrafı.



Şekil 2.2: Glutamin ve glutamat içine azot fiksasyonunun sıralı birleşimi ve azot fiksasyonunun kimyası.

2.2. Siyanobakteri Toksinleri

Siyanobakteriler, siyanotoksin olarak isimlendirilen, etkileri açısından hepatonörotoksin ve sitotoksinler olarak sınıflandırılan, çok geniş çeşitlilikte toksin üretirler. Ayrıca, Siyanobakteriler, lipopolisakkaritlerin (LPS) yanı sıra farmakolojik olarak yararlı ikincil metabolitleri de üretirler. Siyanotoksinler kimyasal olarak tanımlandığında, üç grupta yer alır: a) siklik peptitler (hepatotoksik, mikrosistinler ve nodularin), b) alkaloidler (nörotoksik, anatoksin ve saksitoksin) ve c) lipopolisakkaritler (LPS), (NRA, 1990; Carmichael ve Falconer, 1993; Sivonen, 1996; Carmichael ve Evans, 1997; Codd, 2000). Toksinler ve etkilediği hedef organlar çizelge 2.1.'de verilmiştir.

Çizelge 2.1: Siyanobakteri toksinleri.

Toksin grubu	Memelilerde ilk hedef organ	Siyanobakteri
Siklik peptitler		
Mikrosistin	Karaciğer	<i>Microcystis, Anabaena, Planktothrix Nostoc, Hapalosiphon, Anabaenopsis</i>
Nodularin	Karaciğer	<i>Nodularia</i>
Alkaloidler		
Anatoksin-a	Sinir sinapsları	<i>Anabaena, Planktothrix (Oscillatoria), Aphanizomenon</i>
Anatoksin-a	Sinir sinapsları	<i>Anabaena</i>
Aplysiatoksin	Deri	<i>Lyngbya, Schizothrix, Planktothrix (Oscillatoria)</i>
Silindrospermopsin	Karaciğer	<i>Cylindrospermopsis, Aphanizomenon, Umezakia</i>
Lyngbiyatoksin-a	Deri, bağırsak sistemi	<i>Lyngbya</i>
Saksitoksin	Sinir akzonları	<i>Anabaena, Aphanizomenon, Lyngbya, Cylindrospermopsis</i>
Lipopolisakkaritler (LPS)	Deride kızarıklık ve kaşıntı	Tamamı

Genellikle toksisiteye neden olan türler *Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix (Oscillatoria) rubescens*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena flos-aquae*, *Planktothrix agardhii* ve *Lyngbya spp.*'dir (Chorus ve Bartram, 1999). Serbest yaşayan veya simbiyont olan tüm Siyanobakteriler tarafından üretilen, nörotoksik bir diğer toksin, β -N-metilamino-L-alanindir (BMMA) (Cox vd., 2004). Mikrosistinlerin yapısı, amino asitlerinin farklılığı bu peptitlerin ribozomlar üzerinde sentezlenmediğini göstermiştir. Toksik ve toksik olmayan *Microcystis. aeruginosa* ile yapılan bir çalışmada homolog diziler aranmış sadece toksik olanlarda benzer peptit sentezi yapabilen gen dizileri bulunmuştur (Meissner vd., 1996). Siyanobakterilerde suda çözülebilen, depo proteini olan Siyanofisinin, ribozomal olmayan, siyanofisin sentetaz enzimi ile sentezlendiği gösterilmiştir (Ziegler vd., 1998). Peptitlerin oluşmasında diğer bir mekanizma da ribozomal olmayan peptit sentetaz (NRPSs) üzerinde birleşerek yapılandırılmalarıdır. Bu peptitlerin, kükürt-uçlarına bağlanma mekanizması ile oluşturulduğu gösterilmiştir (Nishizawa vd., 1999; Mootz vd., 2002).

2.3. Siyanobakterilerin Tanımlanması

2.3.1. Morfolojik tanımlama

Siyanobakteriler geleneksel olarak morfolojik özellikleri (trikom genişliği, hücre büyüklüğü, bölünme düzlemi, şekilleri, pigmentasyonu, heterosist içerip-içermediği ve değişik hücre içi yapıların varlığı gibi) dikkate alınarak sınıflandırılmaktadır (John vd., 2002).

2.3.2. Moleküler tanımlama

Mikrobiyal biyoçeşitliliğin belirlenmesinde kullanılan birçok çalışma günümüzde moleküler araçları ve kaynakları kullanarak moleküler filogeniye odaklanmıştır. Kültür siyanobakterilerin belirlenmesi problemlidir, çünkü laboratuvar kültür ortamında çoğaltılan siyanobakterilerin morfolojisi, her zaman bakteri doğal biçimini temsil edemez (Ward vd. 1997). Konvansiyonel kültür bağımlı yöntemler; birçok organizma kültüre alınamadığı, küçük boyutlu olduğu, dengesiz büyüme, açıklık, oksidatif stres ve birbirlerinden ayırt edilmelerinde kullanılacak yeterli fenotipik karaktere sahip olmadıkları için mikrobiyal çeşitliliğin ve doğal çevrenin analizlerinde yetersiz kalabilmektedir. Siyanobakterileri *in vitro* ortamda saptayabilmek bazen zordur ve bu organizmalar, katı ya da sıvı ortam seçimine bağlı

olarak kültüre direnç gösterebilirler (Evans vd., 1976; Sivonen vd., 1989; Ward vd., 1997). Şu ana kadar tüm prokaryotik biyoçeşitliliğin sadece % 0.5-10'luk bir kısmının tanımlanabildiği bildirilmiştir. İzolasyon ve biyokimyasal tanımlama gibi bazı kültür temelli mikrobiyolojik metotlar ve optikal, epifluoresans veya elektron mikroskopisi gibi morfolojik kriterler bu organizmaları oldukça zor ayırt etmekte ve çoğunluğu sınıf düzeyinde kalmaktadır. Son 20 yıllık bir süreçte özellikle mikrobiyal biyoçeşitlilikteki yetersizlikleri aşmak ve eksiklikleri giderebilmek için moleküler klonlama, PCR, 16S rRNA, ITS bölgesi, mikrosistin genleri ve değişik DNA bölgelerinin dizi varyasyonlarını temel alan, kültür bağımsız moleküler analiz yöntemleri geliştirilmiş ve bu yöntemler kullanılarak doğal mikrobiyal komünitelerin genetik ve biyoçeşitlilik analizleri, komünite yapısının izlenmesi yapılmıştır. Siyanobakteriyel toplulukları incelemek için moleküler yaklaşımların yararlı olduğu gösterilmiştir (Garcia-Pichel 2001; Redfield vd., 2002). Modern tekniklerle, özellikle polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) geliştirilmesi ile siyanobakteriler arasındaki farklılıkları karşılaştırmak daha olanaklı olmaya başlamıştır (Nierzwicki-Bauer ve Bushnell, 1998).

Canlılığın devamı için protein sentezi esas olduğundan ribozomların yapısına katılan rRNA genleri evrimsel süreç içinde korunmuştur. Bu genlerdeki genetik varyasyonların kullanılması yakın ve uzak akraba organizmaların belirlenmesine imkân sağlamaktadır. Bakterilerin 16S rRNA geni yaklaşık 1500 nükleotitten oluşan uzun bir molekül olması sebebiyle çok sayıda varyasyon içerebilir ve elde edilecek bu verinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi de filogenetik açıdan önemli olabilir.

Filogenetik bağlantıların aydınlatılmasında DNA-temelli metotlar son yıllarda büyük ilerleme göstermiştir. Bu metotlar deneysel farklılıkların dışında genellikle PCR temellidir. mtDNA (mitokondri), cpDNA (kloroplast) ve nDNA (nükleer) DNA, bu markır sistemlerinde kullanılan genomlardır. Genel olarak DNA'yı temel alan markır sistemleri, diğer markır sistemlerinden (özellikle morfolojik markırlardan) daha etkilidirler. Bunun nedenleri şu şekilde özetlenebilmektedir: 1) birçok morfolojik markır canlının bütününde fenotipik olarak gözlenirken; moleküler markırlar tüm canlıda, doku ve hücresel düzeyde saptanabilmektedir, 2) morfolojik markırlar ile karşılaştırıldığında moleküler lokusların allel frekansları daha yüksektir, 3) morfolojik mutantlar fenotipik olarak istenmeyen sonuçlar oluşturabilmektedir, 4) morfolojik markırların, heterozigot genotiplerin tanımlanmasında yetersiz olup,

dominant-resesif durum sergilemelerine karşın, moleküler markırlar çoğunlukla kodominant kalıtım gösterirler. Moleküler DNA markırları iki kategoride sınıflandırılmaktadır (Liu ve Cordes 2004). Tip I kategorisinde fonksiyonu bilinen genlerle ilişkili RFLP (Restriksiyon Fragment Lenght Polymorphism/kesilmiş parça uzunluk polimorfizmi), ETS (Expressed Tagged Site/etiketlenmiş bölge), gibi markırlar, tip II'de ise anonim genom bölgeleri ile ilgili RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA/rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA), ISSR (Inter-Simple Sequences Repeats/basit dizi tekrarları arası), AFLP (Amplified Fragment Lenght Polymorphism/çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi) gibi markırlar yer almaktadır. Özellikle RAPD, AFLP ve ISSR gibi PCR temelli rasgele çoğaltılmış dominant markırların (Arbitrarily Amplified Dominant markers, AAD) son yıllarda kullanılmasıyla biyolojik sorunların çözümünde hız kazanılmış ve taksonomik düzeylerde yeterli bilgiler sağlanmıştır (Wolfe ve Liston, 1998).

Neilan (1995) yapmış olduğu çalışmada; 13 farklı *Microcystis* ve *Anabaena* cinsini RAPD primerleri kullanarak DNA genotipleme, filogenetik analizler açısından araştırmıştır. Çalışılan primerlerin bu bakteri cinslerini genetiksel olarak tanımlamada kullanılabileceğini önermiştir.

Nishihara (1997), 5 *Microcystis* türünde RAPD yöntemi ile genotip analizi yapmıştır. RAPD sonuçları ile allozim sonuçlarının birbirlerini desteklemediğini ortaya koymuştur. Ayrıca *M. novacekii*, *M. viridis* ve *M. wesenbergii* türlerinde genetik homojenitenin yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Fakat *M. aeruginosa* ve *M. ichthoblabe* türleri arasında hem allozim hemde DNA düzeyinde önemli varyasyonların olduğunu ortaya koymuştur.

Shalini vd. (2007), *Anabaena*, *Nostoc* ve *Calothrix* türlerine ait Siyanobakteri izolatları ile yapılan çalışmada toplam 8 primer kullanarak RAPD-PCR genotiplemesi yapmışlardır ve mevcut çalışmada PCR bileşenleri farklı bakteri genotiplerinde en iyi genotiplemeyi verdiği konsantrasyonu tespit edilmeye çalışılmıştır.

Kumar vd. (2009), *Oscillatoria*, *Lyngbia* ve *Phormidium* cinslerinden 12 farklı türe ait 46 suş RAPD-PCR ile çalışılmış ve mevcut genotipler 2 ana grup oluşturacak şekilde ayrılmıştır.

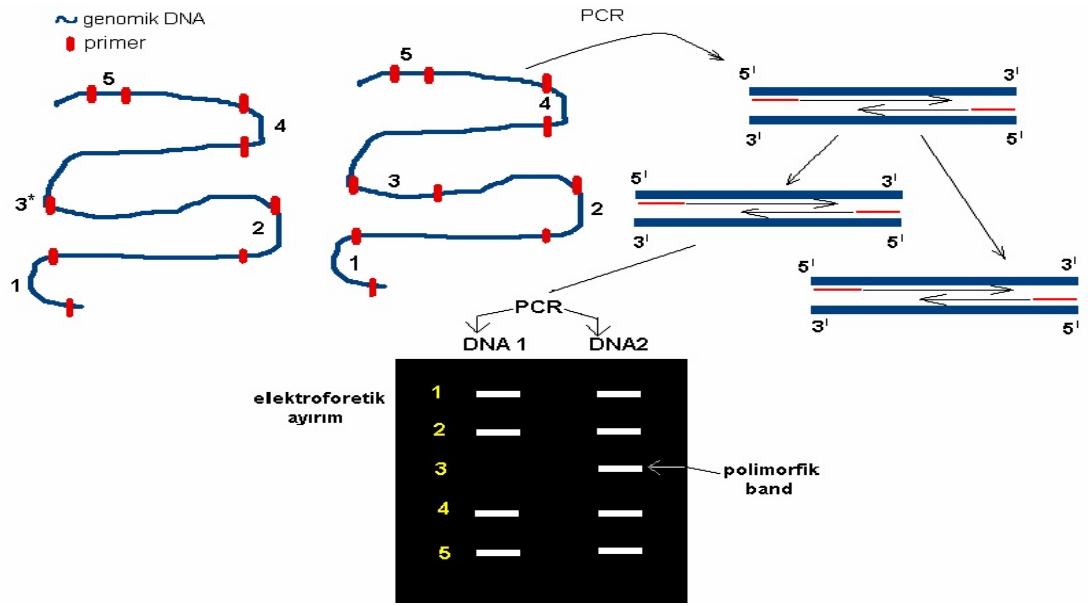
Prabakaran vd. (2011), Siyanobakterilere ait 10 cins üzerinde yapılan RAPD-PCR tekniği ile moleküler karakterizasyonda, cinsler fenogramda 2 kola ayrılmıştır.

Afaf (2012), *Anabaena*, *Nodularia*, *Cylindrospermopsis* ve *Microcystis* cinslerine ait toksijenik Siyanobakterilerle yapmış olduğu çalışmada RAPD-PCR tekniği sonucu elde edilen DNA profillerinin mevcut türlerin ayrımında kullanılabilirliğini ortaya koymuştur.

2.4. RAPD-PCR

2.4.1. RAPD-PCR reaksiyonu

1990’da geliştirilen RAPD-PCR (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-PCR) yöntemi, sekans bilgisine gereksinim duymayan ve DNA’yı temel alan modifiye bir PCR tekniğidir. Tekniğin popularitesi bulunuşundan itibaren hızlı bir şekilde artmıştır. Bakterilerden bitkilere ve insanlara kadar birçok organizmanın genomu RAPD markırlarını oluşturabilecek komplementer DNA dizilerine sahiptir. RAPD, genomda herhangi bir nükleotit dizisinin karşılıklı zincirlerde ters (inverse) yönde bulunabilme ihtimalini temel almaktadır. Diğer PCR uygulamalarının aksine, bu yöntemde genomik bölgelerin amplifikasyonu için tek bir primer kullanılır. RAPD amaçlı kullanılan primerler ters yönlerde yerleşen nükleotit dizileri arasında bulunan ve PCR’a olanak verecek uzaklıktaki bölgelerin amplifikasyonunu sağlar. Yöntemde, spesifik bir DNA bölgesi değil, genom üzerinde birçok DNA lokusu aynı anda çoğaltılabilir ve çalışılan organizmalar oluşturdukları bant modellerine göre ayırt edilirler. RAPD, özellikle akraba organizmalar arasındaki DNA dizi farklılığının ortaya çıkarılmasında yaygın şekilde kullanılmakta ve elde edilen nükleotit farklılıkları RAPD markırları olarak isimlendirilmektedir. Genomlar arasında RAPD markır farklılığının nedenleri, primer bağlanma bölgesini değiştiren (veya ortadan kaldıran) tek baz değişiklikleri ya da insersiyonlar/delesyonlar olabileceği gibi, amplifikasyona imkan vermeyecek şekilde primer bağlanma bölgelerini ayıran genomik dizilerde meydana gelen insersiyonlar da olabilir.



Şekil 2.3: RAPD markırlarının oluşum mekanizması.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Siyanobakterilerin Üretilmesi

Süleyman Demirel Üniversitesi Mühendislik Fakültesinde üretimleri yapılan Siyanobakteri türleri 20–25°C’de, 24 saat sürekli olarak floresan ışıkla (25 µEm-2/s) aydınlatılmıştır. Sürekli santrifüj kullanılarak, hücreler besiyerinden ayrılmış, liyofilize edilerek -20°C’de kullanımlarına kadar saklanmışlardır (Meriluota ve Codd, 2005).

Bu çalışmada izole edilen türlerin çoğaltılmasında BG–11, BG–11° (Rippka, 1988; Rippka ve Herdman, 1992), Z, Z45/4 besiyerleri (Zehnder ve Gorham, 1960) kullanılmıştır.

BG11

NaNO ₃	1.5 g
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0.040 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.036 g
Sitrik asid	0.006 g
Ferrik ammoyum sitrate	0.006 g
EDTA	0001 g
Na ₂ CO ₃	0.020 g
İz element karışımı	1 mL
Saf su	1000 mL

İz element karışımı

H ₃ BO ₃	61 mg
MnSO ₄ .H ₂ O	169 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	28.70 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	2.5 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	12.5 mg

BG11⁰

BG11’da kullanılan NaNO₃’ın çıkarılması ile hazırlanmıştır. Azot tespit eden türlerin izolasyonu için kullanılmıştır.

Z Besi Ortamı

NaNO ₃	0.467 g
Ca(NO ₃). 4H ₂ O	0.060 g
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0.031 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.025 g
Na ₂ CO ₃	0.021 g
Fe- EDTA karışımı	10 mL
Mikrobesi elementleri çözeltisi	0.08 mL
Saf su	1000 mL

Z45/4 (Azot tespit eden Siyanobakteriler için)

KH ₂ PO ₄	41 g
K ₂ HPO ₄	17 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	37 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	25 g
Fe-EDTA kompleksi	10 mL
Mikrobesi solusyonu	0.06 mL
Saf su	1000 mL

Mikrobesi elementleri çözeltisi

H ₃ BO ₃	31 mg
MnSO ₄ .H ₂ O	223 mg
Na ₂ WO ₄ .2H ₂ O	3.3 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	8.8 mg
KBr	11.9 mg
KJ	8.3 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	28.70 mg
Cd(NO ₃).4 H ₂ O	15.4 mg
CoSO ₄ .5H ₂ O	12.5 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	12.5 mg
NiSO ₄ (NH ₄) ₂ . SO ₄ .6H ₂ O	19.8 mg
Cr(NO ₃) ₃ . 7H ₂ O	3.7 mg
VOSO ₄ .2H ₂ O	2 mg
Al ₂ (SO ₄) ₃ K ₂ SO ₄ .24 H ₂ O	47.4 mg
Saf su	1000 mL

3.2. Siyanobakteri Türleri ve Toplama Alanları

Çalışmamızda kullanılan Siyanobakteri türleri daha önceden yapılan bir TÜBİTAK çalışmasında (Proje No: 105 O 053) morfolojik olarak tanımlanmıştır (Gürbüz vd. 2009). Bu çalışma kapsamında elimizde daha önceden mevcut olan ve Pasteur Kültür koleksiyonundan elde ettiğimiz *Microcystis aeruginosa* (PCC 7806) ve dış pozitif kontrol türü olarak ise Eskişehir Osmangazi Üniversitesi'nden (Prof. Dr. Ahmet Çabuk) elde ettiğimiz *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) kullanılmıştır.

Çizelge 3.1: Bakteri türleri ve toplama alanları.

Sıra No	Bakteri adı	Toplama/Elde
1	<i>Microcystis aeruginosa</i> (PCC 7806)	Pasteur Kültür Koleksiyonu (Paris)
2	<i>Synechococcus elongatus</i>	Kovada Gölü (Isparta)
3	<i>Anabaena affinis</i>	Kovada Gölü (Isparta)
4	<i>Phormidium formosum</i>	Kovada Gölü (Isparta)
5	<i>Plankthorix limnetica</i>	Kovada Gölü (Isparta)
6	<i>Pseudoanabaena moniliformis</i>	Kovada Gölü (Isparta)
7	<i>Arthrospira</i> sp.	Titreyen Göl (Alanya)
Pozitif kontrol	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	Eskişehir

3.3. Siyanobakteri Genomik DNA İzolasyonu

Siyanobakteri genomik DNA izolasyonu, Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kiti kitapçığındaki bilgiler temel alınarak ve minör modifikasyonlar yapılarak aşağıdaki şekilde yapılmıştır:

- 1- Bakteri örnekleri steril, 1.5 ml ependorf tüplere alınır.
- 2- Örneklerinin üzerine 180 µl (mikrolitre) “Digestion Buffer” eklenir ve örnekler bu buffer içinde çözündürülür. Daha sonra 20 µl “Proteinaz K” eklenir. Homojen bir görüntü olana kadar örnekler pipet yardımıyla çekip-bırakılır ya da vortekslenir.
- 3- 56 °C’ye ayarlı su banyosundaki ya da ısıtıcılı blokdaki örnekler ara-sıra karıştırılır ve yaklaşık 1 saat boyunca lizize uğraması sağlanır.

- 4- Lizize olmuş örneklerin üzerine 20 µl “RNaz A” eklenir. Bakteri lizatı ile enzimin iyice karışması için çözelti hafif bir şekilde karıştırılır. Oda sıcaklığında 20 dk inkübasyon yapılır.
- 5- Bakteri lizatının üzerine 200 µl “Liziz Solution” eklenir ve 20 saniye kadar vortekslenerek lizat ile iyice karışması sağlanır.
- 6- Örnek lizatının üzerine 400 µl, soğuk % 50 etanol eklenir ve karıştırılır.
- 7- Bakteri lizatı “DNA Pürifikasyon Kiti” ile gönderilen ve alt kısmına toplayıcı tüp geçirilmiş olan kolon tüplerine aktarılır. Kolon tüpler 1 dk (dakika), 6000xg’de santrifüj edilir. İçinde sıvı birikmiş olan toplama tüpü atılır. Kolon tüpü yeni bir 2 ml toplama tüpü içine konur.
- 8- Kolon tüpünün üzerine 500 µl “Wash Buffer I” eklenir ve 1 dk, 8000xg’de santrifüj edilir. Kolon tüpleri yeni toplama tüplerinin içine akatarılır.
- 9- Kolon tüplerinin üzerine 500 µl “Wash Buffer II” eklenir ve 3 dk, maksimum hızda ($\geq 12000xg$) santrifüj edilir. Toplama tüpleri atılır ve kolon tüpleri steril 1.5 ml ependorf tüplerinin içine aktarılır.
- 10- Kolon tüplerinin üzerine ve tam orta noktaya gelecek şekilde 200 µl “Elution Buffer” eklenir. Oda sıcaklığında en az 5 dk. beklenir. Süre sonunda 1 dk 8000xg’de santrifügasyon yapılarak DNA örneklerinin 1.5 ml steril ependorflarda toplanması sağlanır (Maksimum DNA eldesi için; Elution Buffer ekleme aşaması tekrar edilebilir).
- 11- Pürifiye edilmiş DNA örnekleri uygulama yapılana kadar -20 °C’de saklanır. Ya da Nanodropta 260/280 ve 260/230 değerleri ölçülerek konsantrasyon ve saflıkları anlaşılmaya çalışılır.

3.4. Genomik DNA Konsantrasyon Ölçümü

Çizelge 3.2: Bakteri türlerine ait genomik DNA örneklerinin nanodrop ölçümleri.

Bakteri	DNA konsantrasyonu (ng/µl)	260/280	260/230
<i>Microcystis aeruginosa</i> (PCC 7806)	12	1,89	1,79
<i>Synechococcus elongatus</i>	17	1,88	1,58
<i>Anabaena affinis</i>	82,5	1,75	1,01

Çizelge 3.2 (devam): Bakteri türlerine ait genomik DNA örneklerinin nanodrop ölçümleri.

<i>Phormidium formosum</i>	12	2,03	1,12
<i>Plankthorix limnetica</i>	13,5	1,85	1,17
<i>Pseudoanabaena moniliformis</i>	102	1,88	1,76
<i>Arthrospira sp.</i>	21,5	1,93	1,44
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	4	2,40	2,25

3.5. RAPD Primerleri

Thermo Fisher Scientific firması (Offenbach/Almanya) tarafından sentez edilen primerler son konsantrasyonu 100 pmol/μl olacak şekilde, steril su kullanılarak sulandırılmışlardır. Kontaminasyonu engellemek için ana stok primerlerden alikuatlama yapılarak küçük 200 μl ependorf tüplerine aktarım yapılmış ve RAPD-PCR reaksiyonlarda bu tüplerden kullanılmıştır.

Çizelge 3.3: RAPD-PCR reaksiyonlarında kullanılan primerlerin dizileri, T_m dereceleri ve % GC oranları.

Primer	Dizi (5' → 3')	% GC	T _m (°C)
1- CRA-22	CCGCAGCCAA	70	34
2- CRA-25	AACGCGCAAC	60	32
3- HiP-CA	GCGATCGCCA	70	34
4- OPA-11	CAATCGCCGT	60	32
5- OPA-13	CAGCACCCAC	70	34
6- HiP-GC	GCGATCGCGC	80	36
7- HiP-TG	GCGATCGCTG	70	34
8- MM	TCACGGTGCA	60	32

Çizelge 3.3 (devam): RAPD-PCR reaksiyonlarında kullanılan primerlerin dizileri, Tm dereceleri ve % GC oranları.

9- CRA-23	GCGATCCCCA	70	34
10- CRA-26	GTGGATGCGA	60	32
11- OPA-08	GTGACGTAGG	60	32
12- OPA-18	AGGTGACCGT	60	32
13- OPA-12	TGTCATCCCC	60	32
14- OPA-14	TGCGTGCTTG	60	32
15- OPA-15	GACGGATCAG	60	32

3.6. RAPD-PCR Döngü Şartları

3.6.1. RAPD-PCR reaksiyon karışımı

10XPCR Buffer	2.5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2.5 mM (2.5 µl)
dNTP (2.5 mM)	300 µM (3 µl)
Taq DNA Pol (5U/ul).	1 ünit (0.2 µl)
Primer	30 pmol (0.3 µl)
Genomik DNA	25 ng (1 µl)
Steril su	15.5 µl

PCR Reaksiyon son hacmi 25 µl

3.6.2. RAPD-PCR döngüsü

Ön denatürasyon	95°C	3 dk	
Denatürasyon	95°C	45 sn	} 45 döngü
Bağlanma	32-36°C	45 sn	
Uzama	72°C	45 sn	
Son uzama	72°C	5 dk	

Not: Her bir primere ait bağlanma sıcaklığı tablo 4'te gösterilmiştir.

3.7. Agaroz Jel Elektroforezi

Yürütme tamponu ve agaroz jelin hazırlanması için 10 X TBE (Tris 54 gr-Borat 27.5 gr-EDTA 3.7 gr) tamponu kullanılmıştır. PCR örnekleri, PCR reaksiyonunun kontrolü için %1'lik, yorumlama ve fotoğraflama için %2'lik agaroz jelde, 90 mA (miliamper) sabit akım uygulanarak, 90 dk. yürütülmüştür. RAPD-PCR ürünleri 20 µl PCR ürünü ve 2 µl bromfenol mavisi eklenerek jele yüklenmiştir. DNA ürünlerini floresan görüntüleme amacıyla jel etidyum bromür ile 3-5 dk. boyanmıştır. En son aşamada ise jel görüntüleme sistemi kullanılarak (UVITEC Cambridge) görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır.

3.8. Dendrogram Çizimi

Dendrogram elde edilmesi için jellerdeki bantlar monomorfik (tüm çeşitlerde bulunan) ve polimorfik (bazı çeşitlerde bulunup bazılarında bulunmayan) özellikleri açısından değerlendirilmiştir. Bantların bant büyüklükleri (moleküler ağırlıkları) DNA büyüklük markırı (Fermentas GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder 3000-2000-1500-1200-1000-900-800-700-600-500-400-300-200-100 bç (baz çifti)) kullanılarak hesaplanmıştır. Elde edilen bantlar monomorfik ise 0, polimorfik ise 1 olarak işaretlenmiştir. Bu sayısal matris bilgisi Genetic Analysis in Excel 6.501 (GenAlEx) programında kullanılarak (Peakall R. ve Smouse PE, 2012) Nei's Genetik Uzaklık değerleri elde edilmiştir. Bir sonraki aşamada ise iki farklı dendrogram (UPGMA ve Neighbor Joining) Genetik Uzaklık değerleri baz alınarak MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 6.06 programı ile çizilmiştir.

4. BULGULAR

Kullanılan 15 primerin tamamı ile (%100) seçilen Siyanobakterilerin analizinde tekrarlanabilir ve güvenilir polimorfik RAPD-PCR bantları elde edilmiştir. Polimorfik RAPD primerleri ile toplam 306 adet amplifikasyon ürünü elde edilmiş olup bu ürünlerin tamamının (% 100) polimorfik olduğu görülmüştür. En düşük bant ağırlığına sahip polimorfik PCR ürünü 175 bç ile CRA-26 primerinden, en büyük bant ağırlığına sahip polimorfik PCR ürünü ise, 3.000 bç ile CRA-25 ile OPA-13 primerinden alınmıştır. Polimorfik primer başına elde edilen ortalama bant sayısı 20.4 (306/15) ve polimorfik primer başına elde edilen ortalama polimorfik bant sayısı 20.4 (306/15) olarak tespit edilmiştir. En fazla polimorfik RAPD ürünü oluşturan primer ise 35 farklı PCR ürünü ile HİP-GC olarak bulunmuştur. Bakteri örneklerinin genetik akrabalık ilişkisini ortaya çıkarmak için Nei's Genetik Uzaklık değerleri kullanılarak iki farklı dendrogram (UPGMA ve Neighbor Joining) çizilmiştir. Genetik Uzaklık değerleri temel alındığında, 0.451 değeri ile *S. elongatus* ve *P. moniliformis* en uzak türler, 0.268 değeri ile *A. affinis* ve *Arthrospira sp.* (Titreyen Göl) ise birbirine en yakın türler olarak tespit edilmiştir. Genetik Benzerlik değerleri baz alındığında da yine aynı türler 0.765 değeri ile en yakın ve 0.637 değeri ile en uzak türler olarak tespit edilmişlerdir.

Çizelge 4.1: Siyanobakteri türlerinden elde edilen RAPD bilgisinin genel değerlendirilmesi.

Çalışılan primer sayısı	15
Polimorfik primer sayısı	15
Polimorfik primerlerden elde edilen toplam bant sayısı	306
Elde edilen polimorfik fragmentlerin bant büyüklükleri (bç)	175-3000
Polimorfik primer başına elde edilen ortalama bant sayısı	20.4
Polimorfik bant sayısı	306
Polimorfik primer başına elde edilen ortalama polimorfik bant sayısı	20.4
Polimorfik primerlerden elde edilen polimorfizm yüzdesi	%100

Çizelge 4.2: RAPD-PCR reaksiyonlarından elde edilen bant karakteristikleri ve polimorfizm yüzdeleri.

Sıra	Primer	Bant Büyüklüğü	Toplam Bant Sayısı	Monomorfik Bant Sayısı	Polimorfik Bant Sayısı	% Polimorfizm
1	CRA-22	2000,1925,1400,1340,1250,1200,1130,1030,1000,975,950,825,675,650,625,580,575,550,530,480,425,400,350,340,330,325,320,260,250	29	-	29	%100
2	CRA-23	2750,2500,1750,1500,1400,1000,900,850,800,625,600,575,475,450,425,400,375,350,325,300,225	21	-	21	%100
3	CRA-25	3000,2800,2250,2000,1800,1750,1500,1350,1100,1000,900,850,800,775,700,600,500,480,375	19	-	19	%100
4	CRA-26	1500,1350,1200,1150,1000,850,700,600,550,525,500,475,450,425,400,375,350,325,300,275,200,175	22	-	22	%100
5	HİP-CA	2600,2000,1850,1750,1700,1600,1500,1300,1200,1100,1000,800,750,700,625,600,550,500,450,400,375,350,325,320,275	25	-	25	%100
6	HİP-GC	1800,1700,1600,1400,1300,1150,1100,1050,1000,975,950,900,875,875,850,800,775,750,700,675,650,625,600,575,560,550,525,475,450,400,390,375,325,300,280,225	35	-	35	%100

Çizelge 4.2(devam): RAPD-PCR reaksiyonlarından elde edilen bant karakteristikleri ve polimorfizm yüzdeleri.

7	HİP-TG	1800,1750,1500,1350,1200,1150,1100, 1000,975,950,850,825,800,775,725,700, 660,650,625,550,525,500,475,450,425, 325,300,250	28	-	28	%100
8	MM	2400,2150,1475,1275,1025,1000,975, 875,825,740,500,450,375,300,175	15	-	15	%100
9	OPA-08	1900,1700,1400,1150,1100,1000,900,725, 675,650,625,580,550,475,390,375,200	17	-	17	%100
10	OPA-11	2500,175,1600,1400,1300,1200,1150,975, 950,850,800,750,700,675,650,625,500, 475,250	19	-	19	%100
11	OPA-12	1600,1500,1025,900,850,775,700,600,450, 400,380,300,250	13	-	13	%100
12	OPA-13	3000,1750,1600,1200,900,750,725,700, 625,600,550,525,500,475,400,375,350,330	18	-	18	%100
13	OPA-14	2800,2100,1800,1500,1300,1100,975,500, 375,350,325,275	12	-	12	%100
14	OPA-15	1800,1700,1500,1400,1200,1175,1100, 1050,1000,875,675,650,625,550,500, 475,375,275	18	-	18	%100
15	OPA-18	2200,1750,1600,1400,1100,975,850,700, 650,625,600,575,525,375,200	15	-	15	%100
Toplam			306	-	306	%100

Çizelge 4.3: Nei's Genetik Uzaklık matrisi değerleri.

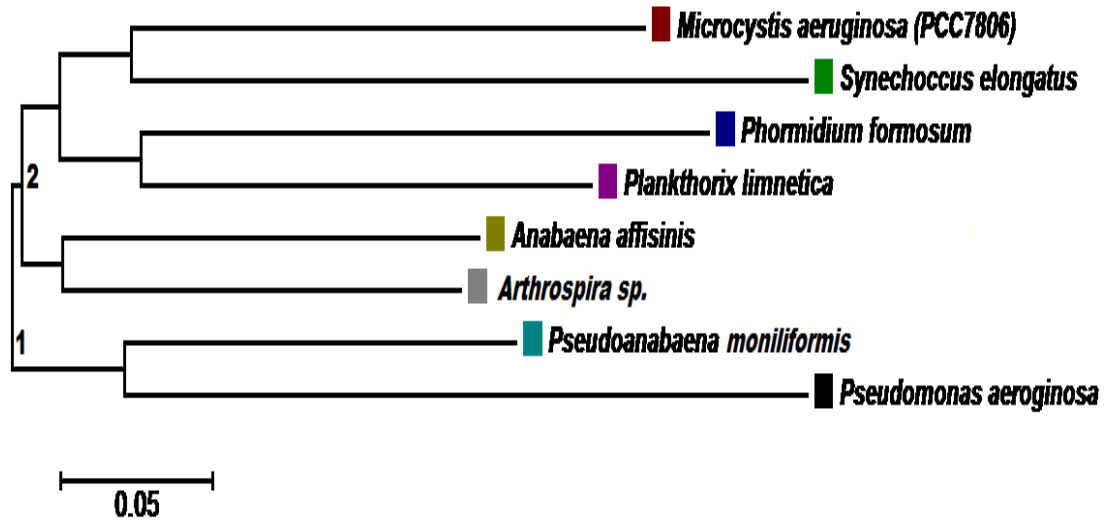
Örnek	<i>Microcystis aeruginosa</i> (PCC 7806)	<i>Synechoccus elongatus</i>	<i>Anabaena affinis</i>	<i>Phormidium formosum</i>	<i>Plankthorix limnetica</i>	<i>Pseudoanabaena moniliformis</i>	<i>Arthrospira sp.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)
<i>Microcystis aeruginosa</i> (PCC 7806)	0,000							
<i>Synechoccus elongatus</i>	0,391	0,000						
<i>Anabaena affinis</i>	0,339	0,372	0,000					
<i>Phormidium formosum</i>	0,396	0,440	0,396	0,000				
<i>Plankthorix limnetica</i>	0,372	0,445	0,335	0,335	0,000			
<i>Pseudoanabaena moniliformis</i>	0,396	0,451	0,339	0,386	0,335	0,000		
<i>Arthrospira sp.</i>	0,339	0,420	0,268	0,405	0,325	0,277	0,000	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	0,482	0,509	0,430	0,471	0,456	0,353	0,410	0,000

Çizelge 4.4: Nei's Genetik Benzerlik matrisi değerleri.

Örnek	<i>Microcystis aeruginosa</i> (PCC 7806)	<i>Synechoccus elongatus</i>	<i>Anabaena affinis</i>	<i>Phormidium formosum</i>	<i>Plankthorix limnetica</i>	<i>Pseudoanabaena moniliformis</i>	<i>Arthrospira sp.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)
<i>Microcystis aeruginosa</i> (PCC 7806)	1,000							
<i>Synechoccus elongatus</i>	0,676	1,000						

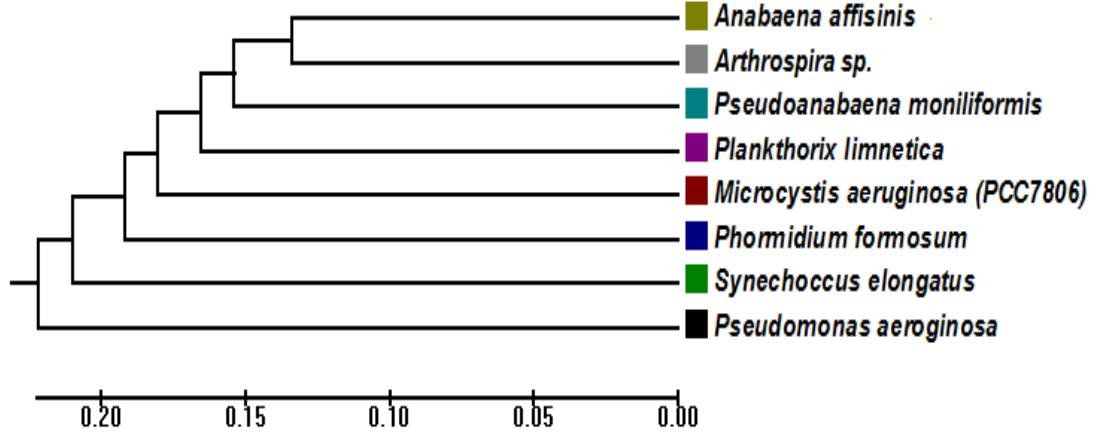
Çizelge 4.4(devam): Nei's Genetik Benzerlik matrisi değerleri.

<i>Anabaena affinis</i>	0,712	0,690	1,000					
<i>Phormidium formosum</i>	0,673	0,644	0,673	1,000				
<i>Plankthorix limnetica</i>	0,690	0,641	0,716	0,716	1,000			
<i>Pseudoanabaena moniliformis</i>	0,673	0,637	0,712	0,680	0,716	1,000		
<i>Arthrospira sp.</i>	0,712	0,657	0,765	0,667	0,722	0,758	1,000	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	0,618	0,601	0,650	0,624	0,634	0,703	0,663	1,000



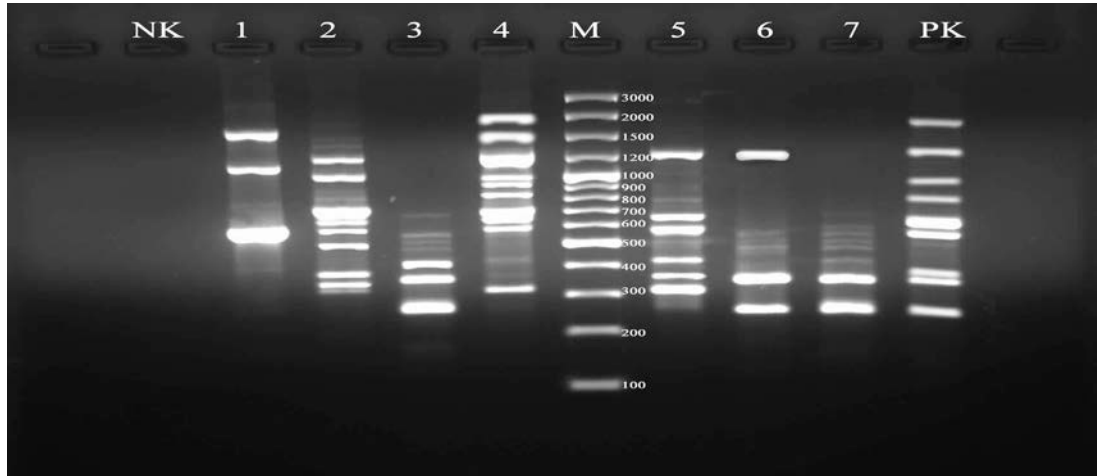
Şekil 4.1: Neighbor-Joining ile çizilen dendrogram sonuçları.

Neighbor-Joining ile çizilen dendrogramda temelde 2 farklı gruplaşma meydana gelmiştir. 1. grubu dış pozitif kontrol örneği *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ve *Pseudoanabaena moniliformis* oluşturmaktadır. Geri kalan örnekler ise 2. gruba dahildir. Bu grup ise kendi içinde 2 alt gruba ayrılmaktadır. 2. grubun 1. alt grubu *Arthrospira sp.* ve *Anabaena affinis*' den oluşmaktadır. 2. grubun 2. alt grubunu ise *Microcystis aeruginosa* (PCC 7806), *Synechococcus elongatus*, *Phormidium formosum*, *Plankthorix limnetica* oluşturmaktadır.



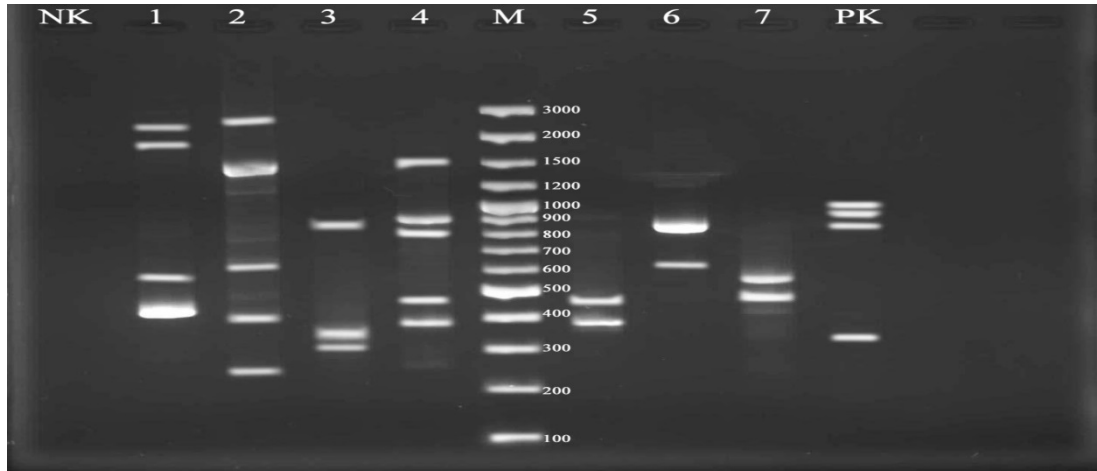
Şekil 4.2: UPGMA ile çizilen dendrogram sonuçları.

UPGMA (Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Çift Grup Metodu -Unweighted Pair-Group Method of Arithmetic Average) ile çizilen dendrogramda ise dış tür olarak kullandığımız pozitif kontrol örneği *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) genetik olarak ilk ayrılan türdür. Daha sonra ise sırasıyla *Synechoccus elongatus*, *Phormidium formosum*, *Microcystis aeruginosa* (PCC 7806), *Plankthorix limnetica*, *Pseudoanabaena moniliformis*, *Arthrospira sp.* ve *Anabaena affinis* ayrılmaktadır.



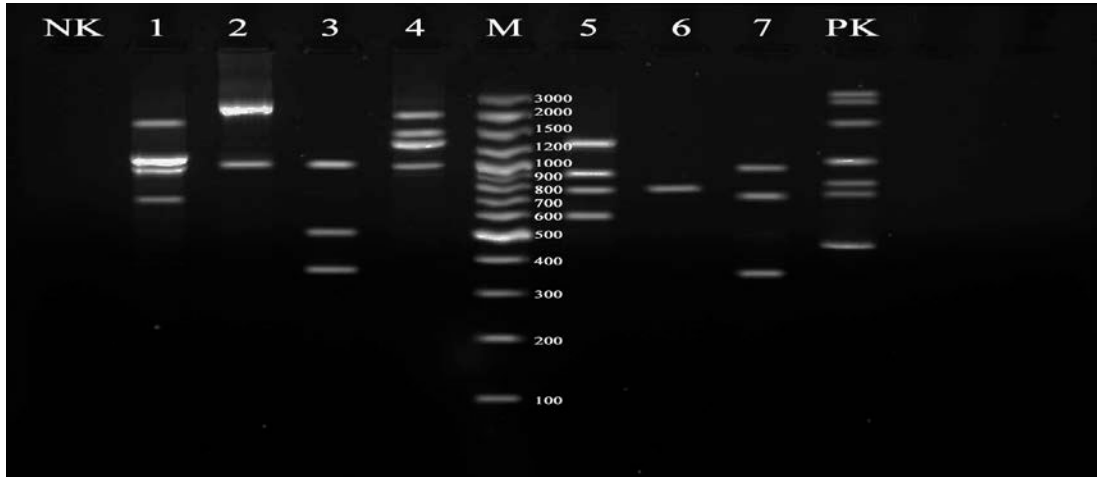
Şekil 4.3: CRA-22 primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

1; *Microcystis aeruginosa* (PCC 7806), 2; *Synechoccus elongatus*, 3; *Anabaena affinis*, 4; *Phormidium formosum*, 5; *Plankthorix limnetica*, 6; *Pseudoanabaena moniliformis*, 7; *Arthrospira sp.*, PK; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), NK; Negatif kontrol, M; DNA molekül büyüklük markırı.



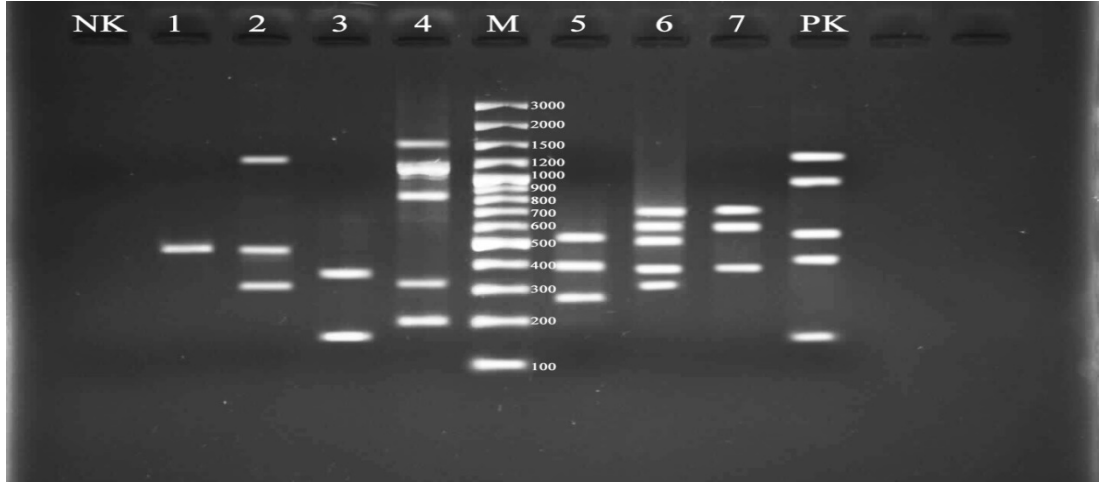
Şekil 4.4: CRA-23 primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

1; *Microcystis aeruginosa* (PCC 7806), 2; *Synechoccus elongatus*, 3; *Anabaena affinis*, 4; *Phormidium formosum*, 5; *Plankthorix limnetica*, 6; *Pseudoanabaena moniliformis*, 7; *Arthrospira* sp., PK; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), NK; Negatif kontrol, M; DNA molekül büyüklük markırı.



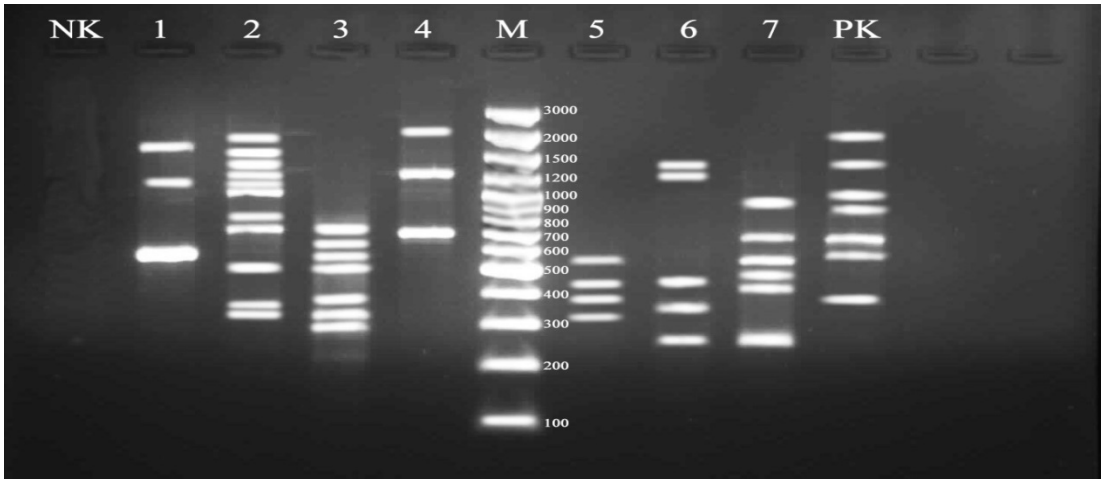
Şekil 4.5: CRA-25 primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

1; *Microcystis aeruginosa* (PCC 7806), 2; *Synechoccus elongatus*, 3; *Anabaena affinis*, 4; *Phormidium formosum*, 5; *Plankthorix limnetica*, 6; *Pseudoanabaena moniliformis*, 7; *Arthrospira* sp., PK; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), NK; Negatif kontrol, M; DNA molekül büyüklük markırı.



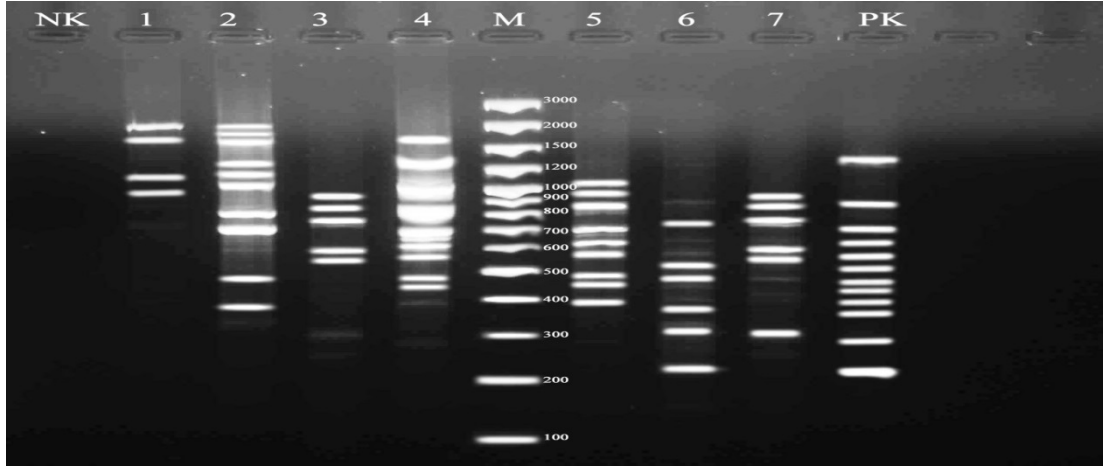
Şekil 4.6: CRA-26 primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

1; *Microcystis aeruginosa* (PCC 7806), 2; *Synechoccus elongatus*, 3; *Anabaena affinis*, 4; *Phormidium formosum*, 5; *Plankthorix limnetica*, 6; *Pseudoanabaena moniliformis*, 7; *Arthrospira* sp., PK; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), NK; Negatif kontrol, M; DNA molekül büyüklük markırı.



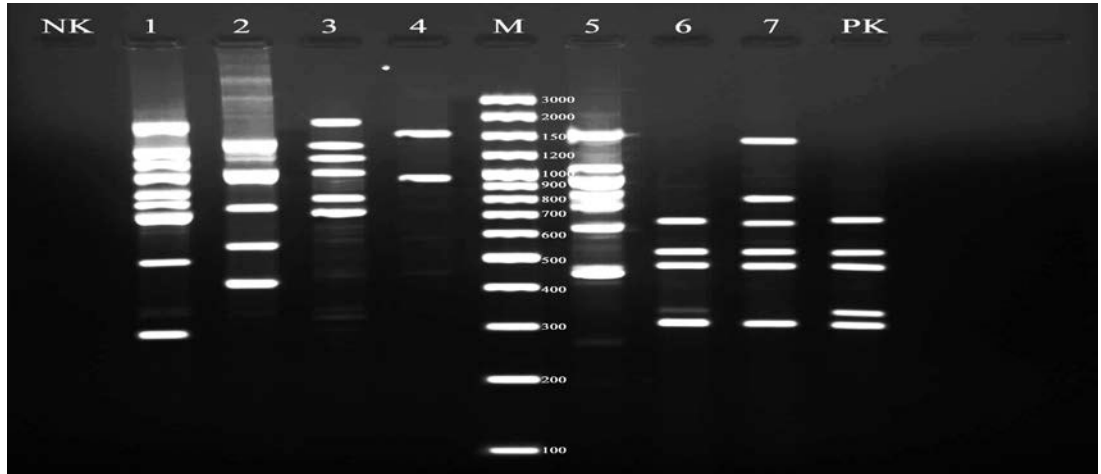
Şekil 4.7: HİP-CA primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

1; *Microcystis aeruginosa* (PCC 7806), 2; *Synechoccus elongatus*, 3; *Anabaena affinis*, 4; *Phormidium formosum*, 5; *Plankthorix limnetica*, 6; *Pseudoanabaena moniliformis*, 7; *Arthrospira* sp., PK; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), NK; Negatif kontrol, M; DNA molekül büyüklük markırı.



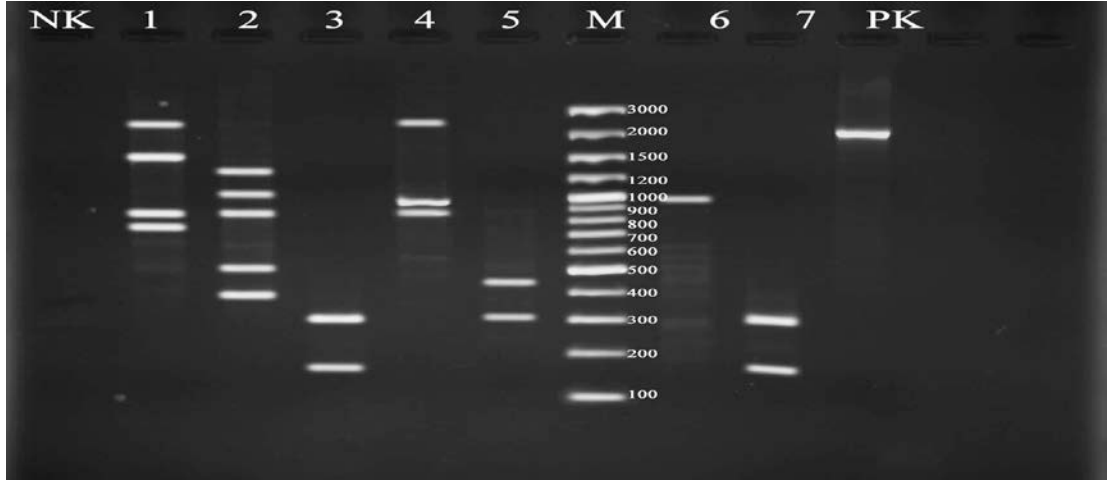
Şekil 4.8: HİP-GC primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

1; *Microcystis aeruginosa* (PCC 7806), 2; *Synechoccus elongatus*, 3; *Anabaena affinis*, 4; *Phormidium formosum*, 5; *Plankthorix limnetica*, 6; *Pseudoanabaena moniliformis*, 7; *Arthrospira* sp., PK; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), NK; Negatif kontrol, M; DNA molekül büyüklük markırı.



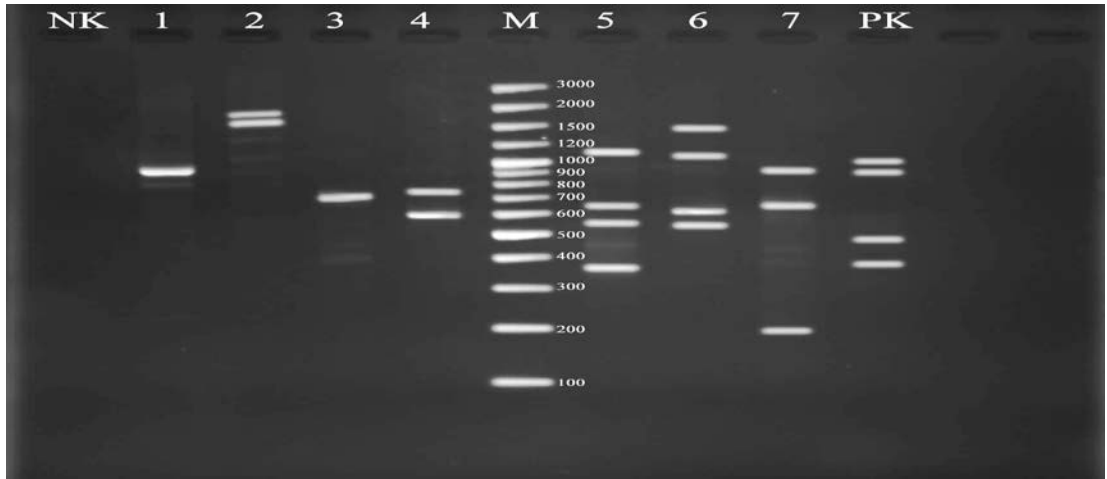
Şekil 4.9: HİP-TG primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

1; *Microcystis aeruginosa* (PCC 7806), 2; *Synechoccus elongatus*, 3; *Anabaena affinis*, 4; *Phormidium formosum*, 5; *Plankthorix limnetica*, 6; *Pseudoanabaena moniliformis*, 7; *Arthrospira* sp., PK; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), NK; Negatif kontrol, M; DNA molekül büyüklük markırı.



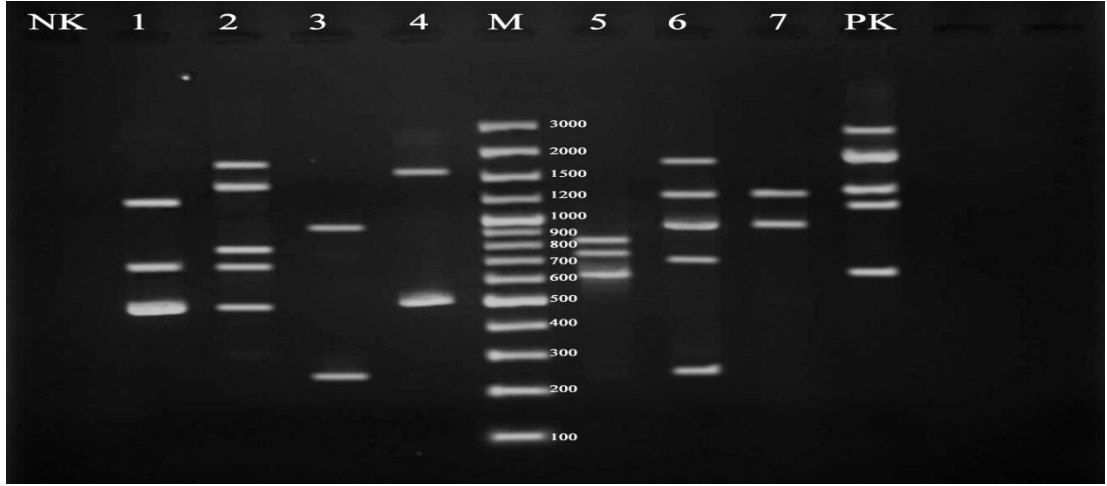
Şekil 4.10: MM primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

1; *Microcystis aeruginosa* (PCC 7806), 2; *Synechoccus elongatus*, 3; *Anabaena affinis*, 4; *Phormidium formosum*, 5; *Plankthorix limnetica*, 6; *Pseudoanabaena moniliformis*, 7; *Arthrospira* sp., PK; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), NK; Negatif kontrol, M; DNA molekül büyüklük markırı.



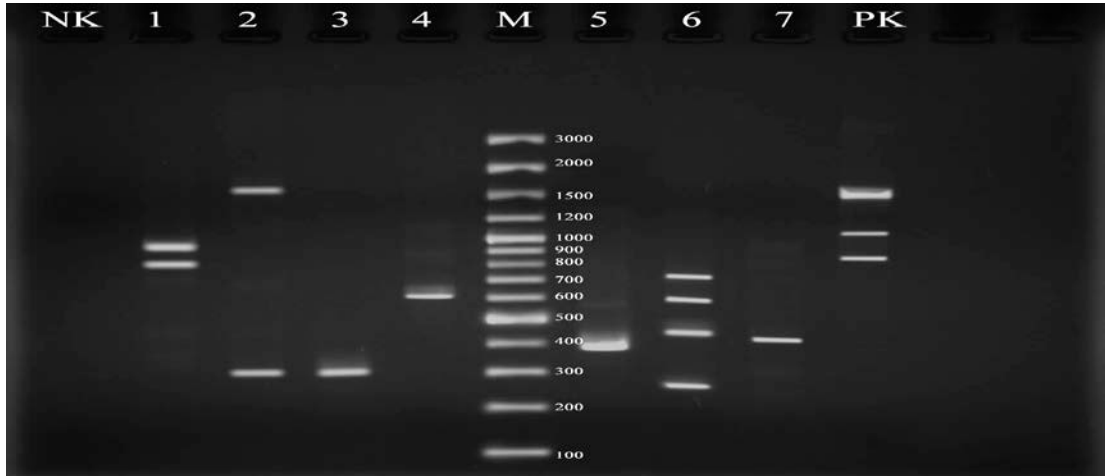
Şekil 4.11: OPA-08 primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

1; *Microcystis aeruginosa* (PCC 7806), 2; *Synechoccus elongatus*, 3; *Anabaena affinis*, 4; *Phormidium formosum*, 5; *Plankthorix limnetica*, 6; *Pseudoanabaena moniliformis*, 7; *Arthrospira* sp., PK; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), NK; Negatif kontrol, M; DNA molekül büyüklük markırı.



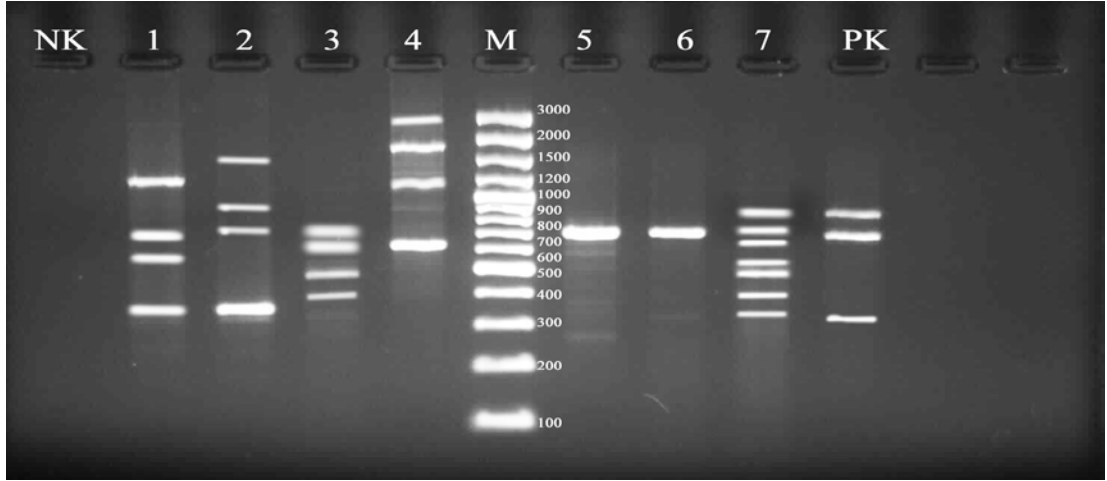
Şekil 4.12: OPA-11 primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

1; *Microcystis aeruginosa* (PCC 7806), 2; *Synechoccus elongatus*, 3; *Anabaena affinis*, 4; *Phormidium formosum*, 5; *Plankthorix limnetica*, 6; *Pseudoanabaena moniliformis*, 7; *Arthrospira* sp., PK; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), NK; Negatif kontrol, M; DNA molekül büyüklük markırı.



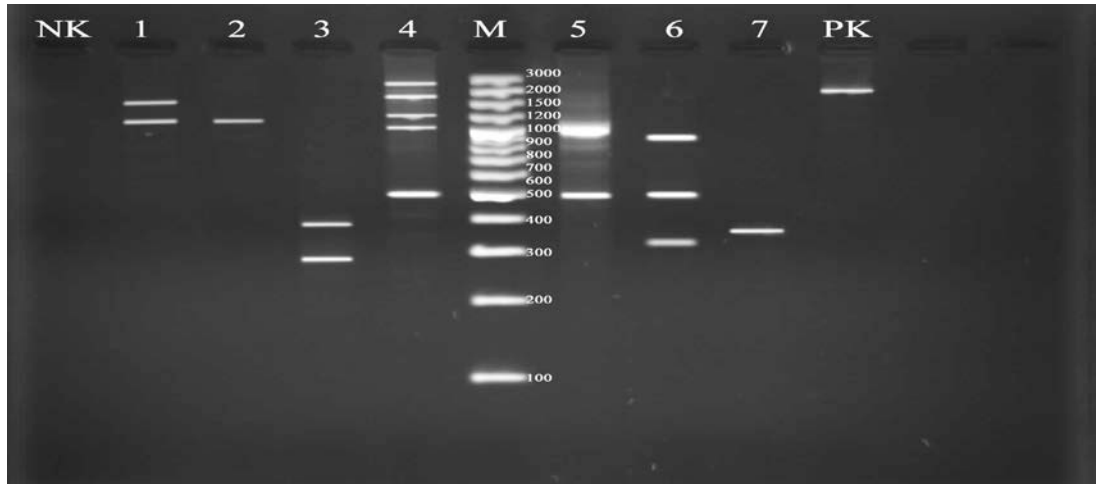
Şekil 4.13: OPA-12 primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

1; *Microcystis aeruginosa* (PCC 7806), 2; *Synechoccus elongatus*, 3; *Anabaena affinis*, 4; *Phormidium formosum*, 5; *Plankthorix limnetica*, 6; *Pseudoanabaena moniliformis*, 7; *Arthrospira* sp., PK; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), NK; Negatif kontrol, M; DNA molekül büyüklük markırı.



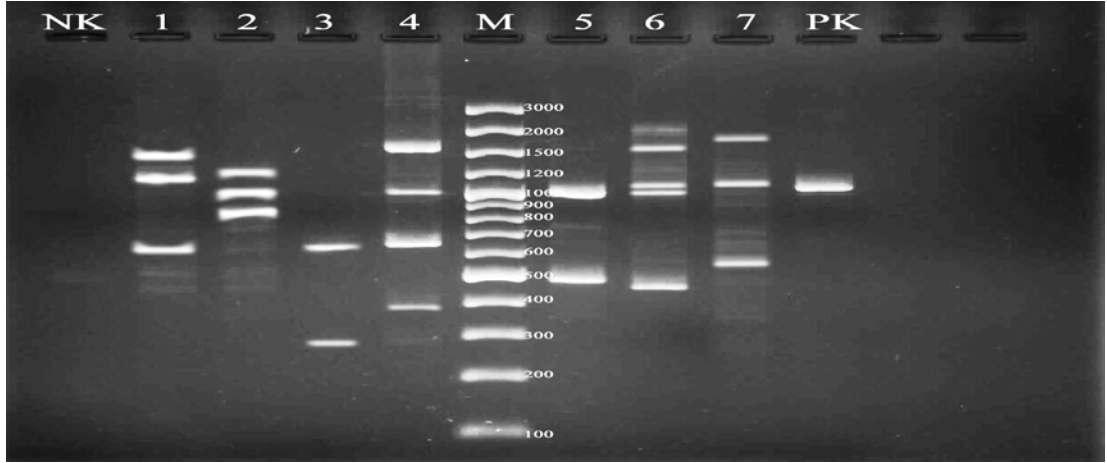
Şekil 4.14: OPA-13 primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

1; *Microcystis aeruginosa* (PCC 7806), 2; *Synechoccus elongatus*, 3; *Anabaena affinis*, 4; *Phormidium formosum*, 5; *Plankthorix limnetica*, 6; *Pseudoanabaena moniliformis*, 7; *Arthrospira* sp., PK; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), NK; Negatif kontrol, M; DNA molekül büyüklük markırı.



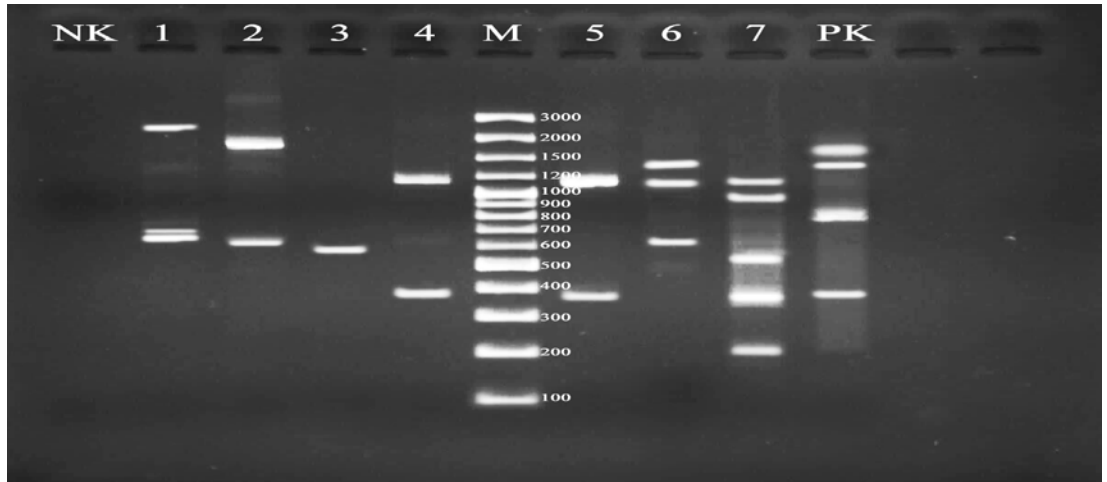
Şekil 4.15: OPA-14 primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

1; *Microcystis aeruginosa* (PCC 7806), 2; *Synechoccus elongatus*, 3; *Anabaena affinis*, 4; *Phormidium formosum*, 5; *Plankthorix limnetica*, 6; *Pseudoanabaena moniliformis*, 7; *Arthrospira* sp., PK; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), NK; Negatif kontrol, M; DNA molekül büyüklük markırı.



Şekil 4.16: OPA-15 primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

1; *Microcystis aeruginosa* (PCC 7806), 2; *Synechococcus elongatus*, 3; *Anabaena affinis*, 4; *Phormidium formosum*, 5; *Plankthorix limnetica*, 6; *Pseudoanabaena moniliformis*, 7; *Arthrospira* sp., PK; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), NK; Negatif kontrol, M; DNA molekül büyüklük markırı.



Şekil 4.17: OPA-18 primeri kullanılarak elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

1; *Microcystis aeruginosa* (PCC 7806), 2; *Synechococcus elongatus*, 3; *Anabaena affinis*, 4; *Phormidium formosum*, 5; *Plankthorix limnetica*, 6; *Pseudoanabaena moniliformis*, 7; *Arthrospira* sp., PK; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), NK; Negatif kontrol, M; DNA molekül büyüklük markırı.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında ülkemizin değişik göllerinden toplanan ve morfolojik olarak sınıflandırılan bazı Siyanobakteri izolatlarının genetik karakterizasyonu RAPD-PCR yöntemiyle araştırılmıştır. Siyanobakteriler sucul ortamlarda fitoplanktonların önemli bir üyesidir ve fotosentetik özelliklerinden ve azot fikse etme yeteneklerinden dolayı da oldukça değerlidirler. Ayrıca tatlısularda bazı suşların siyanotoksinler olarak isimlendirilen toksik bileşikler sentezleyerek ortama vermeleri hayvanların ve insanların içme su kaynakları için önemli bir tehdit oluşturabilmektedir. Siyanobakteriler taksonomik olarak oldukça çeşitlilik gösteren büyük bir gruptur. Sınıflandırmalarında morfolojik ve diğer fenotipik özellikler yaygın olarak kullanılmıştır ve kullanılmaya devam edilmektedir. Son yıllarda uygulanan moleküler filogenetik sınıflandırma teknikleri özellikle problemli grupların sınıflandırılmasında, toksin üreten türlerin teşhisinde ve tespitinde, değerli veriler ortaya koyabilmekte ve moleküler genetik analiz sonuçları temel alınarak taksonların sistematikteki yeri değişebilmektedir.

Deneysel verilerin sonucunda; çalışmalarımızda kullandığımız RAPD-PCR yönteminin ve kullanılan RAPD primerlerin ülkemizin değişik göllerinden toplanan Siyanobakteri izolatlarının genetik karakterizasyonunda, teşhisi ve tanımlanmasında, moleküler sistematğinde başarılı bir şekilde kullanılabileceği görülmüştür. Kullanılan primerlerle elde edilen amplifikasyon ürünlerinin sayısı ve polimorfizm yüzdesi, RAPD-PCR ürünlerinin değişik programlarla analizi ve dendrogramlar sonucu ortaya çıkan genetik yapı morfolojik olarak karakterizasyon ile uyumlu bir tablo ortaya koymaktadır. Tez çalışmasında kullanılan izolatlar biri dışında tür düzeyinde tanımlanmıştır. Fakat, cins düzeyinde tanımlanan *Arthrospira sp.*'nin tür düzeyinde teşhisi için farklı genetik analizlere ve yöntemlere gereksinim vardır.

Neilan (1995), *Microcystis* ve *Anabaena* cinslerindeki mevcut genetik çeçitliliği; tez çalışması kapsamında da kullanılan 8 farklı RAPD primeri ile analiz etmiş ve mevcut cinslerin genetik karakterizasyonunda başta CRA-22 ve CRA-23 primerleri olmak üzere uygunluğunu ortaya koymuştur. İlgili tez çalışmasında da yukarıdaki türlere

ilaveten farklı türleri kullanarak elde edilen sonuçlar ile Neilan (1995) sonuçları uyum göstermekte ve bakteri türleri net bir şekilde dendrogramda birbirinden ayrılmaktadır.

Özellikle *Microcystis* türlerinin tanımlanmasında RAPD analizlerinin çok uygun bir metot olduğu ifade edilmektedir (Nishihara vd.,1997). Bu tez çalışmasında da *Microcystis* genotipide dahil farklı kaynaklardan elde edilen genotipler net bir şekilde birbirinden ayrılmaktadır.

CRA-22 ile yapılan bir çalışmada (Prabakaran vd., 2011), %100 polimorfizm oranı tespit edilmiştir. Bu tez çalışması kapsamındada ilgili primer ile elde etmiş olduğumuz polimorfizm oranı %100 olup, yukarıdaki çalışma ile uyumluluk göstermektedir Buna ilaveten mevcut tezde istatistiksel analizlerin güvenilirliği açısından bu primerinde içinde olduğu toplam 15 primer çalışılmıştır.

Tez çalışmasında kullanılan primerleri de içeren farklı bir çalışmada (Shalini vd., 2007); toplamda 8 primeri mevcut genetik çeşitliliği ortaya çıkarmak ve tanımlama amaçlı kullanmıştır. Üç primer ile (CRA-22, OPA-11 ve OPA-13) en iyi bantlaşma modelleri elde edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise mevcut olan bütün primerler ile çok iyi bant profilleri ve %100 polimorfizm oranı elde edilmiştir.

Bu araştırma sınırlı bir süre içinde ve sınırlı maddi olanaklarla yürütülmüş olmasına rağmen; Siyanobakteri izolatlarının biyolojik çeşitliliği ve karakterizasyonu ile ilgili ülkemizde yapılması planlanan diğer çalışmalar için de temel oluşturabilecek bir çalışma niteliğindedir.

KAYNAKLAR

- Afaf S.I., Al-Hazzani A., Arif A.I., and Brian.M., 2012. Molecular characterization of some toxigenic cyanobacteria by PCR-based techniques, Science Journal of Microbiology, doi: 10,7237/sjmb/224.
- Bartley G.E. and Scolnick P.A., 1995. Plant Cell, 7,1027–1038.
- Buchanan R.E. and Gibbons N.E., 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology 8th edition, The Williams and Wilkins, Baltimore.
- Carmichael W.W., Evans W.R. and Yin Q., 1997. Factors influencing growth and toxin production by cultures of the freshwater cyanobacterium *Lyngbia wollei* (Farlow ex Gomont), J. Appl. Phycol., 9,55-63.
- Carmichael W.W. and Falconer I.R., 1993. Diseases related to freshwater blue green algal toxins ve control measures. In algal toxins in seafood ve drinking water Falconer, I.R. (ed) London Academic Press.
- Carpenter E.J., Capone D.G. and Reuter J.G., 1992. Marine pelagic cyanobacteria: trichodesmium and other diazotrophs. NATO ASI Series C, Mathematical and Physical Sciences, 362, Kluwer Academic Publishers,
- Chorus I. and Bartram J., 1999. Toxic cyanobacteria In: Water a guide to their public health consequences, monitoring and management. World Health Organization.
- Codd G.A., 2000. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality and the prioritisation of eutrophication control. Ecological Engineering, 169, 56-60.
- Cohen-Bazire G. and Bryant D.A., 1982. Phycobilisomes: composition and structure. The biology of cyanobacteria, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Cox P.A., Banack S.A., Murch S.J., Rasmussen U., Tien G., Bidigare R.R., Metcalf J.S., Morrison L.F., Codd G.A. and Bergman B., 2004. Diverse taxa of cyanobacteria produce N-methylamino L-alanine, A neurotoxic amino acid., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102, 1, 5074–5078.
- Douglas S.E., 1994. Chloroplast origins and evolution. In: D.A. Bryant (ed.) The molecular biology of cyanobacteria, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 91-118.
- Evans E.H., Foulds I., and Carr N.G. 1976. Environmental conditions and morphological variation in the blue-green alga *Chlorogloea fritschii*, J. Gen Microbiol., 92,147–155.
- Fay P., 1965. Heterophy and nitrogen fixation in *Chlorogloe fritschii*. J.G. Microbiology, 39, 11-20.
- Garcia-Pichel F., Cortes A.L., and Nübel U., 2001. Phylogenetic and morphological diversity of Cyanobacteria in soil desert crusts from the colorado plateau, Appl. Environ. Microbiol., 67,1902-1910.
- Graham L.E. and Wilcox L.W., 2000. Algae. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Gurbuz F., James S.M., Aynur G.K., and Geoffrey A.C., 2009. Analysis of dissolved microcystins in surface water samples from Kovada Lake, Turkey, Science of the Total Environment, 407, 13, 4038-4046.

- Hitzfeld B.C., Hoeger S.J., and Dietrich DR., 2000. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment, *Environmental Health Perspect*, 108, 113–22.
- John D.M., Whitton B.A., Brook A.J. 2002. The freshwater algal flora of the British Isles, An identification guide to freshwater and terrestrial algae, Cambridge University Press.
- Kammennaya N.A. and Anton F.P., 2011. Characterization of cyanate metabolism in marine *Synechococcus* and *Prochlorococcus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 1, 291–301.
- Kumar Praveen R., Vijayan D., M. Leo Antony and N. Thajuddin, 2009. Phylogenetic diversity of cultivable bacteria associated with filamentous non-heterocystous marine cyanobacteria. *J. Algal Biomass Utln*, 1,1,86–101.
- Liu Z.J., and Cordes J.F., 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Science Direct, Aquaculture*, 238,1-37
- Meissner K., Dittmann E., Börner T., 1996. Toxic and non-toxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* contain sequences homologous to peptide synthetase genes. *FEMS Microbiology Letters*, 135, 295-303.
- Meriluota J., Codd G.A., 2005. Toxic cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis. Finland Abo Akademi University Press, pp.150.
- Miller S.R., Augustine S., Olson T.L., Blankenship R.E., Selker J. and Wood A.M., 2005. Discovery of a freeliving chlorophyll d-producing cyanobacterium with a hybrid proteobacterial/cyanobacterial small-subunit rRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102, 850–5.???
- Mootz H.D., Schwarzer D., Marahiel M.A., 2002. Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *Chembiochem*, 3,491-504.
- Neilan B.A, 1995. Identification and phylogenetic analysis of toxigenic cyanobacteria by multiplex randomly amplified polymorphic DNA PCR. *Applied And environmental Microbiology*, 61,6, 2286–2291.
- Neilan B.A, Jacobs D., and Goodman A.E., 1995. Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by dna polymorphisms within the phycocyanin locus. *Applied And Environmental Microbiology*, 61,11, 3875–3883.
- Nierzwicki-Bauer S.A., Bushnell T.P. Jr., 1998. Molecular characterization of the *Azolla-Anabaena* symbiosis. In: Subramanian G, Kaushik BD, Venkatraman GS, eds. *Cyanobacterial Biotechnology*. New Delhi, India: Oxford and IBH Publishers, 169-174.
- Nishihara H., Miwa H., Watanabe M., Nagashima M., Yagi O. and Takamura Y., 1997. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses for discriminating genotypes of *Microcystis* Cyanobacteria. *biosci. Biotech. Biochem.*, 61,7,1067-1072.
- Nishizawa T., Asayama M., Fujii K., Harada K., Shirai M., 1999. Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* spp. *J. Biochem.*, 126, 520-529.
- NRA, 1990. Toxic blue green algae. *Water Quality Series 2: National Rivers Authority*, pp. 125.
- Oinam G., Tiwari O.N., and Sharma G.D., 2011. PCR based molecular characterization of Cyanobacteria with special emphasis on non-heterocystous filamentous Cyanobacteria. *Journal of Science & Technology*, 7,I,101-113.

- Peakall, R. and Smouse P.E). GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28,2537-2539.
- Prabakaran M., Merinal S. Thennarasu V.and Panneerselvam A., 2011. Diversity and RAPD finger printing of cyanobacteria from fresh water habitat of Pudukkottai, Tamil Nadu. *Advances in Applied Science Research*, 2,6,101-107
- Redfield E., Barns S.M., Belnap J., Daane L.L., and Kuske C.R., 2002. Comparative Diversity of Composition of Cyanobacteria in Three Predominant Soil Crusts of the Colorado Plateau. *FEMS Microbiol Ecol*, 40,55–63
- Rippka R., 1988. Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods Enzymol.*, 167,3–27.
- Rippka R., Herdman M., 1992. Pasteur culture collection of cyanobacterial strains in axenic culture: Catalogue & taxonomic handbook, I: Catalogue of trains. Paris: Institut Pasteur.
- Shalini, Saurabh Tiwari, Rajinder K Gupta, Sunil Pabbi and Dolly Wattal Dhar., 2007. Protocol optimization for RAPD in cyanobacteria. *Indian Journal of Biotechnology.*, 6,549-552
- Sivonen K., 1996. Cyanobacterial Toxins and Toxin Production. *Phycologia*, 35, 12-24.
- Sivonen K., Kononen K., Esala A.L., and Niemala S.I., 1989. Toxicity and Isolation of the Cyanobacterium *Nodularia spumigena* From the Southern Baltic Sea. *Hydrobiologia*, 185,3–8
- Skulberg O.M., Carmichael W.W., Codd G.A, Skulberg R., 1993. Taxonomy of toxic cyanophyceae (Cyanobacteria). *Norwegian Institute for Water Research*, 4, 145-163.
- Walsby A.E., 1987. Mechanisms of buoyancy regulation by planktonic cyanobacteria with gas vesicles. In: P. Fay and C. Van Baalen (eds) *The Cyanobacteria*, Elsevier, 377-414.
- Walsby A.E., Yacobi Y.Z., Zohary T., 2003. Annual changes in the mixed depth ve critical depth for photosynthesis by aphanizomenon ovalisporum that allow growth of the cyanobacterium in lake kinneret, *Israel Journal of Plankton*, 25,6, 608-613.
- Ward D.M., Sategoeds C.M., Nold S.C., Ramsing N.B., Ferris M.J., and Bateson M.M., 1997. Biodiversity within hot spring microbial mat communities, *Molecular Monitoring of Enrichment Cultures*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 71,143–150.
- Whitton B.A., 1992. Diversity, ecology and taxonomy of the cyanobacteria. In: N.H. Mann and N.G. Carr (eds) *Photosynthetic Prokaryotes*, Plenum Press, New York, 1-51.
- Wolfe AD, Liston A., 1998. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: Soltis DE, Soltis PS, Doyle JJ, editors. *Molecular Systematics of Plants II, DNA Sequencing*, pp., 43–86.
- Zehnder A., Gorham P.R., 1960. Factors influencing the growth of *Microcystis aeruginosa* Kütz. Emend. Elenkin, *Canadian Journal of Microbiology*, 6, 645-660.
- Ziegler K., Diener A., Herpin C., Richter R., Deutzmann R., Lockau W., 1998. Molecular characterization of cyanophycin synthetase, the enzyme catalyzing the biosynthesis of the cyanobacterial reserve material multi-L-arginyl-polyL-aspartate (cyanophycin), *Eur. J. Biochem.*, 254, 154-159.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Kadir ARICAK
Doğum Tarihi ve Yeri : 13.08.1981 Doğanşehir-MALATYA
E-posta adresi : aricakkadir@msn.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Lisans : Kafkas Üniversitesi– Biyoloji Bölümü (2005)
Eğitici : İlk Yardım ve Uygulamaları Dersi (2011-2012 Eğitim Öğretim Yılı,
Aksaray Polis Meslek Yüksekokulu)
Eğitici : İlk Yardım ve Uygulamaları Dersi (2012–2013, Aksaray Polis Meslek
Yüksek Okulu İlk Yardım Eğitim Merkezi Mesul Müdürü)