



**T.C.
AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LADİK GÖLÜ SİYANOBAKTERİ ÇEŞİTLİLİĞİNİN YAĞ ASİT
ANALİZİ VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MELİKE KARATAŞ YILDIZ

ŞUBAT

MELİKE KARATAŞ YILDIZ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞUBAT 2022

**LADİK GÖLÜ SİYANOBAKTERİ ÇEŞİTLİLİĞİNİN YAĞ ASİT ANALİZİ
VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ**

Melike KARATAŞ YILDIZ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Önder İDİL

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ŞUBAT 2022

Melike KARATAŞ YILDIZ tarafından hazırlanan ‘Ladik Gölü Siyanobakteri Çeşitliliğinin Yağ Asit Analizi ve Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi’ adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY ÇOKLUĞU/OY BİRLİĞİ ile Amasya Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Önder İDİL

Biyoloji Anabilim Dalı, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Başkan: Doç. Dr. Fadime Özdemir KOÇAK

Hemşirelik Esasları Anabilim Dalı, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Ece Avuloğlu YILMAZ

Biyoloji Anabilim Dalı, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Tez Savunma Tarihi: 04/02/2022

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Doç. Dr. Ümit YILDIRIM

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,
- bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Melike KARATAŞ YILDIZ

04.02.2022

**LADİK GÖLÜ SİYANOBAKTERİ ÇEŞİTLİLİĞİNİN YAĞ ASİT ANALİZİ VE
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ**
(Yüksek Lisans Tezi)

Melike KARATAŞ YILDIZ

AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Şubat 2022

ÖZET

Bu çalışmada Samsun ili Ladik ilçesi sınırlarında bulunan Ladik Gölü'nden örnekleme yapılarak siyanobakteri çeşitliliği belirlenmiştir. İzole edilen izolatların 16S rRNA gen bölgesi spesifik primerler ile çoğaltılmış ve amplifikasyon ürünleri MboI restriksiyon enzimi ile kesilerek ARDRA işlemi uygulanmıştır ve dizi analizi sonucunda *Synechocystis sp.*, *Phormidium autumnale*, *Phormidesmis sp.*cinsine ait izolatlar elde edilmiştir. Elde edilen farklı ARDRA profiline sahip izolatlar hekzan kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Ekstraktlara FAME analizi uygulanmıştır. Ekstraktların antimikrobiyal aktiviteleri, MİK (minimum inhibitör konsantrasyonu) yöntemi ile belirlenmiştir. Ayrıca ekstraktlarının DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali süpürme aktivitelerine ve Bakır (II) iyonu indirgeme esaslı antioksidan kapasite (CUPRAC: Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity) sonuçlarına bakılarak antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Antimikrobiyal etkinlikleri Gram pozitif (+) bakterilerden *Bacillus cereus* ATCC 7064, *Micrococcus luteus* NRLL 1018, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Gram negatif (-) bakterilerden *Salmonella typhimurium* LT2, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70060, *Escherichia coli* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, mayalardan *Candida albicans* ATCC 14053 ve *Candida krusei* ATCC 34135 kullanılmıştır. En yüksek antimikrobiyal aktiviteyi sırası ile *Bacillus subtilis* ATCC 663, *Bacillus cereus* ATCC 7064 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853'ye karşı *Synechocystis sp.* türüne ait L4-11 kodlu izolat göstermiştir. DPPH kullanılarak serbest radikal süpürme yeteneğinde *Synechocystis sp.* türüne ait L3-23 kodlu izolat ve L3-27 kodlu izolata ait ekstrakt, *Phormidesmis sp.* türüne ait L5-2 kodlu izolata ait ekstrakt maksimum antioksidan potansiyelini göstermiştir. CUPRAC değerinin L3-27 kodlu ekstraktın 8,9 µg TE/gr, L5-2 kodlu ekstraktın 2,5 µg TE/gr olarak saptanmıştır.

Sayfa sayısı	: 97
Anahtar kelimeler	: Siyanobakteri, ARDRA, FAME, MİK, DPPH, CUPRAC
Danışman	: Dr. Öğr. Üyesi Önder İDİL

DETERMINATION OF CYANOBACTERIA DIVERSITY IN LADİK LAKE BY FATTY ACID ANALYSIS AND MOLECULAR METHODS

(M. Sc. Thesis)

Melike KARATAŞ YILDIZ

AMASYA UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

Şubat 2022

ABSTRACT

In this study, cyanobacteria diversity was determined by sampling from Lâdik Lake located in the borders of Ladik district of Samsun province. The 16S rRNA gene region of the isolated isolates was amplified with specific primers and the amplification products were cut with MboI restriction enzyme and ARDRA treatment was applied and as a result of the sequence analysis, isolates of *Synechocystis sp.*, *Phormidium autumnale*, *Phormidesmis sp.* genus were obtained. Obtained isolates with different ARDRA profiles were extracted using hexane. FAME analysis was applied to the extracts. The antimicrobial activities of the extracts were determined by the MIC (minimum inhibitory concentration) method. In addition, the antioxidant activities of the extracts were determined by looking at the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) radical scavenging activities and the Copper (II) ion reduction based antioxidant capacity (CUPRAC: Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity) results. Antimicrobial activities of Gram-positive (+) bacteria *Bacillus cereus* ATCC 7064, *Micrococcus luteus* NRLL 1018, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Gram-negative (-) bacteria *Salmonella typhimurium* LT2, *Klebsiella luteus* NRLL 1018, *Espresso* ATCC 7003, *Espresso bacteria* ATCC 27853, yeasts *Candida albicans* ATCC 14053 and *Candida krusei* ATCC 34135 were used. *Bacillus subtilis* ATCC 663, *Bacillus cereus* ATCC 7064 and *Synechocystis sp.* L4-11 coded isolate belonging to the genus showed. In the free radical scavenging ability using DPPH, *Synechocystis sp.* L3-23 coded isolate and extract of L3-27 coded isolate belonging to the genus *Phormidesmis sp.* The extract of the L5-2 coded isolate of the genus L5-2 showed the maximum antioxidant potential. The CUPRAC value was determined as 8.9 µg TE/gr of the L3-27 coded extract and 2.5 µg TE/gr of the L5-2 coded extract.

Number Of Page

: 97

Key Words

: Cyanobacteri, ARDRA, FAME, MIC, DPPH, CUPRAC

Consultant

: Asst. Prof. Dr. Önder İDİL

ÖN SÖZ ve TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam boyunca değerli bigileriyle bana yol gösteren ve çalışmamı sürdürürken maddi ve manevi katkılarını benden esirgemeyen, her zaman yanımda olan kıymetli hocam Dr. Öğrt. Üyesi Önder İDİL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmam süresince desteklerini esirgemeyen, varlıkları ve fikirleri ile tezime ışıltı tutan değerli hocalarım Araştırma Görevlisi Emine ÇELİKOĞLU ve Dr. Umut ÇELİKOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmalarında, yardımlarıyla daima yanımda olan çalışma ortamımı güzelleştiren, çalışma arkadaşlarım Canfide Merve YEMİŞ, Habibe CENİKLİOĞLU, Merve KARAASLAN, Musa Can MANSUROĞLU ve Elif Nur GÖKÇURAK'a teşekkürlerimi sunarım. Arazi çalışmalarında beni yalnız bırakmayan, hayatımın maddi ve manevi destekçisi sevgili eşim Tuncay YILDIZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
RESİMLER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ	1
2. SİYANOBAKTERİLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ	6
2.1. Siyanobakterilerin Evrimi ve Ekolojisi.....	6
2.2. Siyanobakterilerin Hücre Yapısı	6
2.3. Siyanobakterilerdeki Özelleşmiş Hücreler.....	8
2.3.1. Heterosistler	8
2.3.2. Akinete	9
2.3.4. Hormogonyum	10
2.4. Siyanobakterilerin Taksonomisi.....	10
2.4.1 Chroococcales	11
2.4.2. Chroococcidiopsidales.....	11
2.4.3. Gleobacterales	12
2.4.4. Nostocales	12
2.4.5. Oscillatoriales.....	13

	Sayfa
2.4.6. Pseudanabaenales	13
2.4.7. Pleurocapsales	13
2.4.8. Spirulinales.....	14
2.4.9. Synechococcales.....	14
2.5. Siyanobakterilerin Moleküler Taksonomisi	15
2.6. Siyanobakteriler ve Yağ Asitleri.....	16
2.7. Siyanobakterilerin Antimikrobiyal Aktivitesi.....	17
2.8. Siyanobakterilerin Antioksidan Aktivitesi.....	18
2.9. Siyanobakterilerin Toksinleri.....	18
2.10. Siyanobakterilerin Kullanım Alanları	21
3. MATERYAL VE METOD.....	24
3.1. Materyal	24
3.1.1. Çalışma alanı	24
3.1.2. Çalışmada kullanılan su örnekleri	25
3.1.3. Çalışmada kullanılan besiyerler	26
3.1.4 Çalışmada kullanılan çözeltiler	26
3.1.5. Çalışmada kullanılan primerler	28
3.1.6 Çalışmada kullanılan markerlar	29
3.2. Metod	30
3.2.1. Su örneklerinin toplanması.....	30
3.2.2. Su örneklerinin kimyasal özelliklerinin belirlenmesi.....	30
3.2.3. Su örneklerinden siyanobakteri izolasyonu ve kültüre alınması	30
3.2.4. İzolatların İdentifikasyonu	34
3.2.5. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	36

	Sayfa
3.2.6. İzolatlardan elde edilen 16S rRNA + ITS + 5' 23S rRNA'nın amplified ribosomal DNA restriction analizi (ARDRA)	39
3.2.7. İzolatlardan elde edilen PCR ürünlerinin dizi analizi	39
3.2.8. İzolatların DNA dizi analizi	40
3.2.9. Siyanobakterilerin toplam yağ miktarının belirlenmesi	40
3.2.10. FAME analizi	41
3.2.11. Antimikrobiyal Aktivite	41
3.2.12. Antioksidan aktivite	42
4. BULGULAR.....	43
4.1. Su Örneklerinin Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	43
4.2. Su Örneklerinden Siyanobakteri İzolasyonu ve Kültüre Alınması.....	43
4.3. İzolatların İdentifikasyonu	44
4.3.1. İzolatların mikroskopik analizi.....	44
4.3.2. İzolatların moleküler identifikasyonu	47
4.4. İzolatların Yağ Asidi Metil Esterleri (FAME) Analizi	57
4.5. Siyanobakteri Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri.....	63
4.6. Siyanobakteri Ekstraktlarının Antioksidan Aktiviteleri.....	68
4.6.1. Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi.....	68
4.6.2. Siyanobakteri ekstaktlarının DPPH radikali süpürme aktiviteleri .	74
5. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER	79
KAYNAKLAR	88
ÖZGEÇMİŞ	97

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 1.1. Antimikrobiyal bileşenlerin etki mekanizmalarına göre gruplandırılması.	3
Çizelge 1.2. Antioksidan bileşiklerin sınıflandırılması.....	4
Çizelge 2.1. Siyanotoksinlerin etkileri ve semptomları.	20
Çizelge 3.1. Örneklem bölgeleri	25
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan primerler	28
Çizelge 3.3. PCR reaksiyon karışımı	37
Çizelge 3.4. PCR döngüsünde ayarlanan sıcaklık değeri ve süreleri.....	38
Çizelge 4.1. Ladik Gölü su analizi.....	43
Çizelge 4.2. İzolatların ARDRA profil grup numaraları	49
Çizelge 4.3. ARDRA grup numaralarına göre 30R/1494R primerleri ile sekans analiz sonuçları	50
Çizelge 4.4. İzolatların FAME analiz profilleri.....	58
Çizelge 4.5. Siyanobakterilerin ekstraktının, bakteriyal test mikroorganizmaları üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri.....	65
Çizelge 4.6. Tüm siyanobakteri türlerinin ekstraktının bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasitesi	73
Çizelge 4.7. Tüm siyanobakteri türlerinin ekstraktının DPPH süpürme kapasitesi.....	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Siyanobakteri hücrelerinin genel yapısı.....	7
Şekil 2.2. Heterosist yapısı.....	9
Şekil 2.3. Akinete yapısı.	9
Şekil 2.4. Hormogonyum yapısı	10
Şekil 2.5. Bağlanma sırasında primerlerin kısmi yerleri	16
Şekil 4.1. L3-25 kodlu siyanobakteri türünün bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasitesi; 1,2.....	69
Şekil 4.2. L1-15 kodlu siyanobakteri türünün bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasitesi.....	69
Şekil 4.3. L3-23 kodlu siyanobakteri türünün bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasitesi.....	70
Şekil 4.4. L3-27 kodlu siyanobakteri türünün bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasitesi.....	70
Şekil 4.5. L4-10 kodlu siyanobakteri türünün bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasitesi; 1,2.....	71
Şekil 4.6. L5-2 kodlu siyanobakteri türünün bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasitesi.....	71
Şekil 4.7. L1-18 kodlu siyanobakteri türünün bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasitesi.....	71
Şekil 4.8. L4-11 kodlu siyanobakteri türünün bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasitesi.....	73
Şekil 4.9. L3-22 kodlu siyanobakteri türünün DPPH süpürme kapasitesi.....	75
Şekil 4.10. L-1-15 kodlu siyanobakteri türünün DPPH süpürme kapasitesi.....	75
Şekil 4.11. L-3-23 kodlu siyanobakteri türünün DPPH süpürme kapasitesi	75
Şekil 4.12. L-3-27 kodlu siyanobakteri türünün DPPH süpürme kapasitesi.....	76
Şekil 4.13. L-4-10 kodlu siyanobakteri türünün DPPH süpürme kapasitesi.....	76

Şekil	Sayfa
Şekil 4.14. L-5-2 kodlu siyanobakteri türünün DPPH süpürme kapasitesi.....	77
Şekil 4.15. L-1-18 kodlu siyanobakteri türünün DPPH süpürme kapasitesi.....	77
Şekil 4.16. L-4-11 kodlu siyanobakteri türünün DPPH süpürme kapasitesi.....	77



RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Chroococcales.....	7
Resim 2.2. Chroococcidiopsidales	11
Resim 2.3. Gleobacterales.....	12
Resim 2.4. Nostocales.....	12
Resim 2.5. Oscillatoriales	13
Resim 2.6. Pseudanabaenales	13
Resim 2.7. Pleurocapsales.....	14
Resim 2.8. Spirulinales	14
Resim 2.9. Synechococcales	15
Resim 3.1. Ladik göl haritası	24
Resim 3.2. Ladik Gölü örneklem bölgeleri.....	25
Resim 3.3. Lambda DNA/HindIII Markır ın fragment profili.....	29
Resim 3.4. 100 bp DNA Ladder (SOLİS BİODYNE) Markır'ın fragment profili	29
Resim 3.5. Ladik Gölünden su örneği alınması.....	30
Resim 3.6. Siyanobakterilerin izolasyonu ve kültüre alınması; 1,2,3,4.....	32
Resim 3.7. Siyanobakteri izolatlarından ekstrakt eldesi ;1, 2, 3.....	34
Resim 3.8. Elektroforez düzeneği.....	36
Resim 3.9. UV transillüminator cihazı ile jel görüntülenmesi.....	36
Resim 3.10. PCR cihazı.....	39
Resim 3.11. Mikroplaka okuyucu.....	42
Resim 4.1. Katı besiyerine ekilen izolatlar.....	44
Resim 4.2. Seçilen bazı izolatların mikroskopik görüntüleri.....	47

Resim	Sayfa
Resim 4.3. Lambda DNA Hind III marker, beş örneğin 16S rRNA + ITS + 5' 23S rRNA geni amplifikasyon ürünleri; 1,2.....	48
Resim 4.4. Elde edilen izolatların ARDRA jeli (MspI).....	49
Resim 4.5. 16S rRNA filogenetik ağaç.....	56
Resim 4.6 FAME analizi uygulanan bazı izolatlar.....	57
Resim 4.7. Siyanobakteri türlerinin <i>Bacillus cereus</i> ATCC 7064 üzerine antimikrobiyal etkisi.....	63
Resim 4.8. Siyanobakteri türlerinin <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 üzerine antimikrobiyal etkisi	64
Resim 4.9. Siyanobakteri türlerinin <i>Candida albicans</i> ATCC 14053 üzerine antimikrobiyal etkisi	64
Resim 4.10. Siyanobakteri türlerinin <i>Micrococcus luteus</i> NRLL 1018 üzerine antimikrobiyal etkisi	64

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, yanda açıklamaları verilmek üzere aşağıda listelenmiştir.

Simgeler	Açıklama
mg	miligram
g	gram
L	litre
ml	mililitre
µm	mikrometre
µl	mikrolitre
bp	base pairs (baz çiftleri)
ng	nanogram
V	Volt
W	Watt
cm	santim
dk	dakika
s	saniye
M	Molar
nm	nanometre

Kısaltmalar	Açıklama
OD	Optik yoğunluk
UV	Ultraviyole
ET	Elektron transferi

NA	Nutrient agar
NB	Nutrient broth
NLS	N-loril sarkozil
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonları
BLAST	Basic local alignment searchtool
ARDRA	Amplified ribosomal DNA restriction analizi
KoAC	Potasyum asetat
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acid
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
FAME	Fatty Acid Methyl Ester (Yağ asidi metil ester)
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
CUPRAC	Cupric Iron Reducing Antioxidant Capacity (Bakır (II) İyonu indirgeme esaslı antioksidan kapasite)

1. GİRİŞ

Siyanobakteriler kendilerine özgü hücre yapısına sahip, zarla çevrili nükleus ve organelleri olmayan prokaryotik organizmalardır. İçerdikleri Klorofil ve Fikobilin pigmentleri bu organizmalara karakteristik olan mavi-yeşil rengini vermektedir (Rippka ve ark., 1979). Bu görünümlerinden dolayı bir süre “mavi-yeşil algler” olarak adlandırılmışlardır. Klorofil-a içermeleri ve fotosentez yapmaları mavi-yeşil alglerle ortak özellikleri olmasına rağmen nükleus ve mitokondrileri olmadığı için DNA (Deoksiribo Nükleik Asit)’ları bakteriler gibi sitoplâzmalarında serbest halde bulunmaktadır. Bu yüzden prokaryot yapıda olmaları onları alglerden ayıran önemli özelliklerden biridir (Whitton ve Potts 2000; Rai ve ark., 2002).

Sucul ekosistemlerin primer üreticisi olan bu organizmalar, ekstrem habitatlar dahil dünyanın bir çok bölgesinde yaşamaktadırlar. Bu durum değişen çevre koşullarına çok iyi uyum sağladıklarını göstermektedir (Hitzfeld ve diğerleri, 2000, Sompong ve diğerleri, 2005, Taton ve ark., 2006). Yüksek sıcaklık, düşük karbondioksit derişimi ve yoğun ışığa maruz kaldıklarında dahi hayatta kaldıkları bilinmektedir. Bu durum donmaya ve çözünmeye dirençli olmalarıyla ilişkilendirilmektedir. Dolayısıyla denizler ve tuzlu göllerde baskın tür olmalarının nedeni yüksek tuzluluğa karşı geliştirdikleri toleranstan kaynaklanmaktadır (Herrero ve ark, 2001; Stewart, 1987; Warr ve ark., 1984, Mackay ve ark., 1983).

Siyanobakteriler tek hücreli ya da filamentli olabilmelerinin yanında tekli ya da gruplaşmış kolonilerde oluşturabilirler. Bunun yanında ipliksi yapıda yalancı dallanma gösteren formlarıda görülmektedir (Whitton ve Potts, 2000).

Geniş bir yaşam alanına sahip olmaları taksonomik olarak yüksek çeşitlilik göstermelerine neden olmaktadır. Bu bakımdan türlerin teşhis edilmesi ve sınıflandırılmasında bazı zorluklar görülmektedir. Geleneksel olarak siyanobakterilerin sınıflandırılmasında (taksonomisinde) kullanılan yöntem morfolojik olarak mikroskop yardımıyla yapılmaktadır. Fakat değişen çevre koşullarıyla birlikte morfolojik özellikler değişebileceğinden geleneksel yöntemler taksonomi açısından yetersiz kalmaktadır. Bu yüzden son yıllarda DNA’ya dayanan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temelli

moleküler yaklaşımlar taksonomik çalışmalara katkı sağlaması açısından önemli hale gelmiştir (Bryant 1994; Boyer ve ark., 2001). Siyanobakterilerin, morfolojik verileri ve genetik analizleri sınıflandırmalarında tutarsızlıklara yol açtığından, mevcut yöntemlere ek olarak, hücresel yağ asidi bileşimleri; aile, cins ve tür seviyesindeki bakterileri sınıflandırmak için kullanılmaktadır (Sivonen ve diğerleri, 2001). Siyanobakteri türlerinin morfolojik karmaşıklığı ile yağ asidi modeli arasında doğrudan bir ilişki olduğu bilinmektedir. Bu nedenle lipidler ve lipidlerin yağ asitleri gibi markerlar, siyanobakterilerin morfolojik özellikleri ve taksonomik gruplandırmalarında tamamlayıcı olarak kullanılmaktadır (Krüger ve ark, 1995).

Yaşadığımız dünyada var olan mikroorganizmaların yararlı yönleri kadar zararlı yönlerinde olduğu bilinmektedir. Günlük hayatta kullandığımız birçok ürünün elde edilmesinde mikroorganizmalar insanlara fayda sağlamaktadır. Yoğurt, kefir, kıyma olmak üzere çeşitli süt ürünlerinin ve ekmeğin mayalanmasında, boza üretiminde mikroorganizmalardan yararlanıldığı bilinmektedir. Fakat bu yararlarının yanında insanda hastalık meydana getiren patojen mikroorganizmaların, sulara ve gıdalara bulaşarak, çoğalması bunları tüketen insanlarda sağlık sorunlarına yol açtığı bilinmektedir. Bunların en önemlilerinden biri olan gıda zehirlenmeleri, bakteri, virüs, parazit veya bunların toksinleriyle kontamine olmuş yiyeceklerin tüketilmesiyle gerçekleşmektedir. Gıda bozulmalarına ve dolayısıyla gıda zehirlenmelerine çoğunlukla gram negatif bakteri üyelerinden *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*, gram pozitif bakterilerden *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus*'un neden olduğu bilinmektedir (Mostafa ve ark, 2018).

Patojen mikroorganizmaları öldüren veya üremelerine engel olan; doğal ya da sentetik olarak üretilmiş kimyasal maddeler antimikrobiyal madde olarak adlandırılmaktadır. Bu maddeler çok düşük dozlarda, hedef aldığı patojenlerin gelişimini engelleyebilen biyolojik kökenli metabolitlerdir. Antimikrobiyal maddelerin birçoğu, bakteriler, algler ve funguslar gibi mikroorganizmalar tarafından üretilen doğal maddeler olup “antibiyotik” olarak adlandırılırlar. Antibiyotikler düşük dozlarda diğer mikroorganizmaları öldüren, insan metabolizmasına zarar vermeyen doğal veya onların sentetik maddeleridir (Talaro ve Talaro, 1993). Antimikrobiyal bileşiklerin en önemli özelliğinin seçici toksisite olması gerekmektedir. Seçici toksisite göstermeyen bileşikler, vücudumuzdaki yararlı

mikroorganizma florasına zarar verebildiği, bağışıklık sistemimizin zayıflamasına neden olabildiği bildirilmiştir (Akyüz, 2007). Antimikrobiyaller etki mekanizmalarına göre sınıflandırılır ve buna göre beş grupta incelenirler (Saran ve Karahan, 2010).

Çizelge 1.1. Antimikrobiyal bileşenlerin etki mekanizmalarına göre gruplandırılması

Antimikrobiyal bileşenlerin etki mekanizmaları	1.Hücre duvarı sentez inhibitörleri	1. Beta laktamlar (penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemler, beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonları) 2. Glikopeptitler (vankomisin, teikoplanin) 3. Diğerleri (fosfomisin, sikloserin, basitrasin, ristosetin, ramoplanin, mersasidin, moenomisin)
	2. Protein sentez inhibitörleri	1. 50S alt üniteye bağlanarak etkili olanlar (makrolidler, ketolidler, linkozamidler, streptograminler, kloramfenikol, oksazolidinonlar) 2. 30S alt üniteye bağlanarak etkili olanlar (aminoglikozidler, tetrasiklinler, glisilsiklinler) 3. Diğerleri (mupirosin, nitrofurantoin)
	3. Nükleik asit sentez inhibitörler	(kinolonlar, rifamisinler, metronidazol)
	4. Antimetabolitler	(trimetoprim-sülfametoksazol, paraamino salisilik asit)
	5. Membran bütünlüğünü bozanlar	1. Peptid antibiyotikler (polipeptit antibiyotikler [basitrasin, gramisidin S, polimiksinler], lineer katyonik peptitler [defensinler, maganinler], ribozomal peptitler [lantibiyotikler], diğerleri [pirokorisin, drosodoin, apiadesin]) 2. Sıklık lipopeptitler (daptomisin).

Antimikrobiyal maddelere maruz kalmaya bağlı olarak mikroorganizmalar, zamanla zarar görmekten kaçınmak için bazı direnç mekanizmaları geliştirmiştir. Bu sayede hedef alınan mikroorganizmada antimikrobiyal maddelerin etkisi giderek azalmakta ve zamanla etkisiz hale gelmektedir. Canlıda bu direncin ortaya çıkması doğal ve evrimsel bir tepkidir (Holmes, 2016). Mikroorganizmaların direnç kazanması sorunu, günümüzde küresel düzeyde önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Antimikrobiyal maddelere karşı gösterilen direncin yanında bu maddelerin olası yan etkileri nedeniyle, antimikrobiyal özellik gösteren doğal kaynaklara yönelim gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Enfeksiyon

hastalığına karşı, doğal kaynaklardan elde edilen, aktif bileşiklerin bulunması üzerine yapılan çalışmaların gittikçe arttığı bildirilmiştir (Çalışkan, 2001).

Aerobik solunum yapan canlılarda havanın serbest oksijeni, canlı vücudunda bulunan bazı organik bileşikler ile reaksiyona girebilmektedir. Bu reaksiyonlarda oksijenin eksik indirgenmesi sonucunda, reaktif oksijen türleri (ROT) olan serbest radikalleri meydana gelmektedir. Reaktif oksijen türlerinin en önemlileri; singlet oksijen (1O_2), süperoksit radikali ($O_2 \bullet^-$), hidroksil radikali ($\bullet OH$), radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) ve peroksinitrit ($ONOO^-$) olarak bilinmektedir. Metabolizmanın işleyişinde doğal bir süreç olan, serbest radikallerin olduğu oksidasyon reaksiyonu; organizmaya zarar verebilmektedir. Bağışıklık sistemini zayıflatmakta, kanser, kalp hastalıkları ve kronik hastalıklara sebep olabilmektedir (Halliwell ve Gutteridge 1990). Vücutta gerçekleşen katabolik reaksiyonların dışında sağlıksız beslenme, yağlı yiyecekler, sigara ve alkol kullanımı, bazı ilaçlar ve radyasyon da serbest radikallerin oluşumuna sebep olmaktadır. Serbest radikallerle savaşan vücudun doğal bir savunma mekanizması vardır. Bu mekanizmayı oluşturan bileşiklere “antioksidan” denilmektedir. Antioksidanlar doğal ve sentetik olmak üzere iki gruba ayrılır (Pradedova ve ark., 2010).

Çizelge 1.2. Antioksidan bileşiklerin sınıflandırılması

Doğal Antioksidanlar			Sentetik Antioksidanlar
Enzimatik Olanlar	Enzimatik Olmayanlar		
• Süperoksit dismutaz • Katalaz • Glutasyon peroksidaz • Glutasyon-S-transferaz • Glutasyon redüktaz • Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz	Endojen Antioksidanlar • Glutasyon • Seruloplazmin • Bilirubin • Ferritin • Laktoferrin • Ürik asit • Haptoglobinler • Albumin	Eksojen Antioksidanlar • E Vitamini (Tokoferoller) • β-Karoten • C Vitamini (Askorbik asit) • Flavonoidler	• Bütillenmiş hidroksi anisol • Bütillenmiş hidroksi tolüen • Propil gallat

Antioksidanların serbest radikallerin oluşumunu durdurduğu ve mevcut radikalleri süpürerek hücre hasarını engellediği bilinmektedir (Murray ve ark., 2000; Akbari ve ark., 2018). Fakat hücrelerdeki oksidasyona canlının doğal antioksidan savunma mekanizması yeterli olmamaktadır. Bu bakımdan antioksidan özellik gösteren bileşiklerin dışardan alınması önemlidir (Namiki 1990, Skrinjar ve ark., 2007).

Bazı siyanobakteri türlerinden elde edilen protein, vitamin, yağ asitleri ve pigment gibi yapıların antimikrobiyal ve antioksidan özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Sahip oldukları bu özelliklerden dolayı gıda, sağlık ve ilaç alanlarında kullanılmaktadırlar (Gargouri ve ark., 2016). Siyanobakteriler tıbbi alanlarda kullanımının yanında, atık suların ve ağır metallerin giderilmesinde, güneş enerjisinin biyokütleyle dönüştürülmesinde kullanılan mikrorganizmalardır. İçerdikleri zengin karbonhidrat, protein ve özellikle yağ asidinden dolayı hayvan yemi, gıda katkı maddesi olarak kullanılabilir. Fakat ülkemizde bu canlıların kullanım alanları ile ilgili yeteri kadar çalışma mevcut olmaması nedeniyle çok sayıda siyanobakteri türü bilinmesine rağmen bu canlılardan ekonomik anlamda yeteri kadar fayda sağlanamamaktadır.

Bu çalışmada, Samsun ilinde bulunan Lâdik Gölü'nün farklı bölgelerinden su örnekleri alınarak, siyanobakteriler izole edilmiştir. İzole edilen siyanobakteriler saflaştırılarak, 16S rRNA gen bölgesi PCR ile çoğaltılarak moleküler tanımlama yapılmıştır. Ayrıca saflaştırılan siyanobakterilerden hekzan ekstraksiyonu yapılarak yağ asit profilleri belirlenmiş, antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri incelenmiştir.

2. SİYANOBAKTERİLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ

2.1. Siyanobakterilerin Evrimi ve Ekolojisi

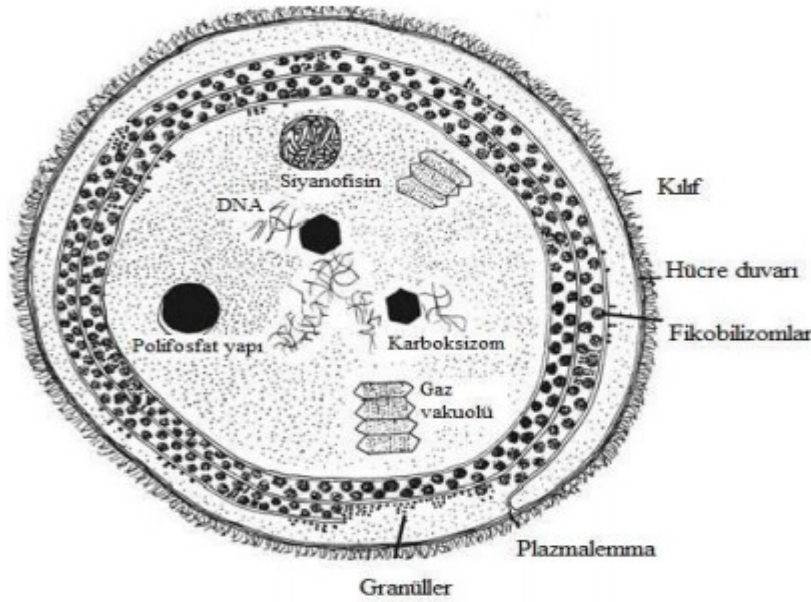
Siyanobakterilerin Batı Avusturalya Stromatolitlerinde bulunan 3,8 milyar yıl yaşında ki mikrofosillerinden, dünyadaki en eski yaşam formlarından biri olduğu bilinmektedir (Campbell ve Reece, 2000).

Dünya atmosferinde oksijen birikmesi, siyanobakterilerin evriminden 1 milyar yıl sonra gerçekleştiği; bu durumun siyanobakteriler tarafından azot tespiti ve fotosentezin tam olarak gerçekleştirilmesiyle ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bununla beraber kloroplastların da siyanobakterilerden evrimleştiği ileri sürülmektedir. Bu açıdan evrimsel olarak büyük bir öneme sahiptirler (Peschek ve ark., 1999; Stewart ve ark., 1987). Ortaya çıktıkları düşünülen 3.8 milyar yıl önce ki dönemden günümüze kadar ulaşabilmeleri, değişen çevre koşullarına karşı gösterdikleri hızlı adaptasyonların bir avantajı olduğu kabul edilmektedir (Komarek, 2016). Bu adaptasyonlar sayesinde dünya üzerinde çok geniş bir yayılım alanına sahip olmuşlardır. Isıya karşı geliştirdikleri toleranstan dolayı 0 °C'in altındaki sulardan, 70 °C'ye kadar sıcak sularda yaşayabilmektedirler. Beslenme istekleri oldukça basittir. Vitamin ihtiyaçları yoktur. Işık, CO₂, azot, su ve mineral maddeler bulduklarında öncü organizma olarak ortama yerleşirler. Hem fotosentezle organik madde üretimi hem de havanın serbest azotunu fiske etmelerinden dolayı birçok habitatın primer üreticisi olmuşlardır (Öner, 2001).

2.2. Siyanobakterilerin Hücre Yapısı

Siyanobakteriler; kendilerine özgü hücre yapısına sahip zarla çevrili çekirdek ve organelleri olmayan, 16S rRNA ve klorofil-a içeren, tek hücreli prokaryotik organizmalardır (Güner ve Aysel, 2006). Klorofil-a pigmentinin yanı sıra, fikosiyanın ve fikoeritrin adı verilen özel fotosentetik pigmentlere sahiptirler. Klorofil-a'nın ışığı absorbe etmede yetersiz kaldığı dalga boylarında bu pigmentlerden yararlanarak farklı derinliklerde yaşayabilmektedirler (Stewart ve Falconer 2008).

Siyanobakterilerin hücre duvarı Gram pozitifdir. Hücre duvarı peptidoglikan tabakası içerir ve dış kısmı lipopolisakkarit bir tabakadan oluşur. Hücre duvarının altında ince bir hücre zarı veya plazmalema bulunur. Bazı durumlarda hücre duvarını türe göre ince ya da kalın olabilen müsilaajlı bir zar çevreleyebilmektedir (Becker, 1995; Tomaselli, 2004). Dış kısımdaki müsilaaj tabaka, canlıyı su üstünde asılı tutar, siyanobakterilerin sudan besin sağlamasını ve siyanobakteriler ile beslenmek isteyen mikroskobik canlılardan korunmasını sağlar. Siyanobakterilerin genelinde tillakoid adı verilen hücre içi zarlar bulunur. En iç kısımda tamamen plazmadan oluşan bölgenin dış kısmı siyanobakterilere mavi- yeşil renk veren fikosiyanın pigmenti içerir (Graham ve Graham 2004).



Şekil 2.1 Siyanobakteri hücrelerinin genel yapısı (Lee, 2008).

Planktonik olanlarında kırmızı ve siyah renkleri ile optik mikroskopunda kolayca tanınan gaz vakuolleri bulunur. Gaz vakuolleri düşük ışık konsantrasyonunda üretilir. Vakuoller sayesinde hücrenin hacmi artarak yoğunluğu azalır. Böylece canlı yukarı doğru hareket eder ve su üzerinde durma özelliği kazanır. Gaz vakuolleri yüksek ışık konsantrasyonunda yok olur. Böylelikle siyanobakterilerin büyümesi için uygun su katmanını seçilerek kendileri için gerekli olan besin maddelerine erişebilir (Sharma ve ark., 2014).

Fotosentetik kısımları içeren ve serbestçe sitoplazmada dolaşan tilakoid isimli yapılar, sitoplazmik yüzeyde düzenli olarak sıralanmış fikobilizomlar ile de gösterilmektedir.

Fikobilizomlar fikosiyanin gibi fikobiliproteinleri içerirler. Siyanobakteriler selüloz içermediğinden sindirilmeleri algilere oranla daha kolaydır (Becker, 1995; Koray, 2002; Tomaselli, 2004). Yedek besin maddeleri glikojen, proteinlerden siyanofisin ve volitindir (Cirik ve Gökpınar, 1993).

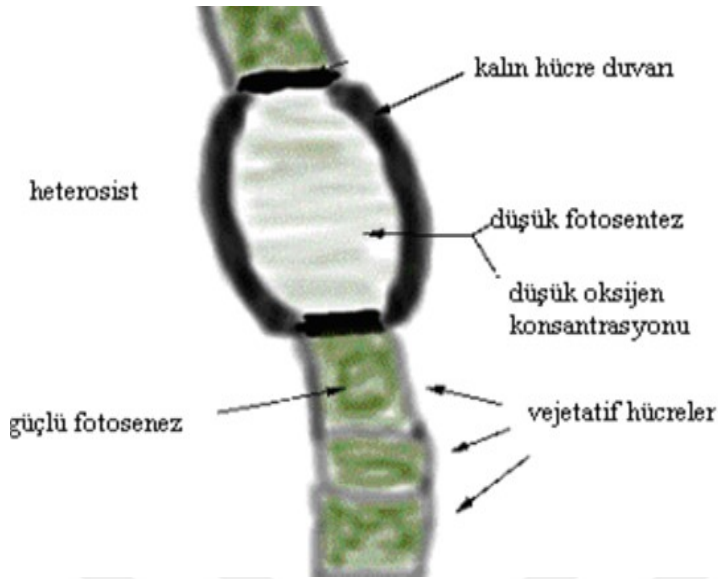
Siyanobakterilerde üreme sadece eşeysiz olarak görülür. Hücrelerin yapılarına göre bölünmeleri değişiklik gösterir. Tek hücreli olanlar enine bölünerek çoğalırken, ipliksi yapı gösteren türlerde aradaki hormogonyum oluşarak çoğalır (Güner ve Aysel, 2006).

Siyanobakteriler, ortam koşulları yaşamaları için uygun olmadığında heterosist veya akinete yapısıyla devamlılıklarını sağlarken, koşullar uygun olduğunda ise hormogonium gibi yapılarla çoğalırlar (Güner ve Aysel, 2006).

2.3. Siyanobakterilerdeki Özelleşmiş Hücreler

2.3.1. Heterosistler

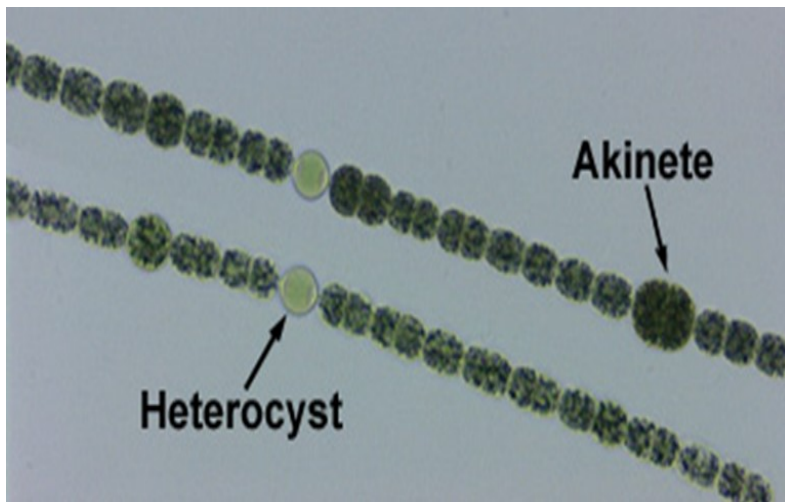
Heterosistler azot yokluğunda havanın serbest azotunu fikse eden Nostocales ve Stigonematales üyeleri dışında başka grupta bulunmayan özelleşmiş hücrelerdir (Boone, Casstenholz ve Garrity, 2001). Heterosistler ipliksi yapının ortasında, uçlara yakın kısımlarda veya tek uçta olabilir. Bu durum siyanobakteri sistematğinde oldukça önemlidir. Ayrıca heterosist hücreleri nitrojenaz enzimi katalizörlüğünde havadaki serbest azotu fikse ederek azotun amonyum olarak besin zincirine aktarılmasını sağlar (Cirik ve Gökpınar, 2008; Altuner, 2010).



Şekil 2.2. Heterosist yapısı (Whitton ve Potts 2000).

2.3.2. Akinete

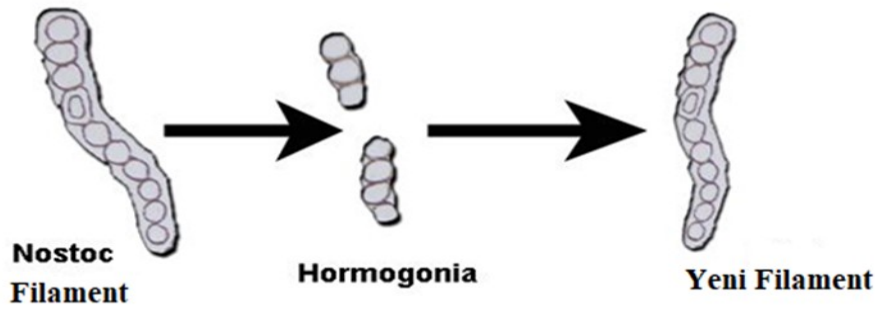
Akineteler bakterilerde ki endospor yapısına benzemektedir. Heterosistlerden daha büyük yapılardır. Nostocales üyeleri ışık ve besin sınırlamasıyla karşılaştıklarında hücre duvarının çevresinde kalın bir duvar daha oluşturarak, akineteleri meydana getirirler. Bu hücreler sayesinde bakteri, donmaya, kurumaya ve oksijensiz ortama karşı direnç gösterir. Akineteler siyanofisin, glikojen, lipit ve karatenoid pigmentlerini depolamaktadır (Boone ve diğerleri, 2001).



Şekil 2.3. Akinete yapısı (Whitton ve Potts 2000).

2.3.4. Hormogonyum

Hormogonyum Nostocales üyesi bazı Siyanobakteriler tarafından oluşturulan hareketli yapılardır. İpliksi yapı gösteren türlerde, yeni bir ortamla karşılaşıldığında stres görülebilir. Bu durumlarda iplikte aradaki hücreler ölür ve iplik parçalanır. Bu parçalara hormogonyum denir. Hormogonyumlar gelişerek yeni bir ipliksi üye oluşturur (Boone ve diğerleri, 2001; Altuner 2010).



Şekil 2.4. Hormogonyum yapısı

2.4. Siyanobakterilerin Taksonomisi

Siyanobakteriler; ekolojik açıdan önemli organizmalardır ve çok geniş bir yaşam alanına sahiptirler. Bu yüzden, morfolojik ve ekolojik olarak çok çeşitlilik gösterir. Türlerinin teşhis edilmesi ve sınıflandırılması zor ve karışıktır. Tek hücreli, çok hücreli veya filamentli yapıda olabilirler. Tek hücreli yapıları çubuk, yuvarlak ipliksi yapıda olabilirken çok hücreli yapıları yuvarlak şeklinde ve genel olarak koloni oluştururlar (Whitton ve Potts, 2000). Siyanobakteriler Cyanophyceae sınıfında, 9 takım içerisinde sınıflandırılır.

Bu takımlar;

1-Chroococcales

2-Chroococcidiopsidales

3-Gleobacterales

4-Nostocales

5-Oscillatoriales

6-Pleurocapsales

7-Pseudanabaenales

8-Spirulinales

9-Synechococcales'tir (Guiry ve Guiry, 2016).

2.4.1 Chroococcales

Hücreleri yuvarlak, tek tek ya da ikisi bir arada, bazen de 4,8 ve 16'lı koloniler halinde olabilirler. Nadir olarak çok sayıda hücre grubu bir arada olabilir.



Resim 2.2. Chroococcales

2.4.2. Chroococciopsidales

Hücreler küresel şekilli, nadiren tek halde bulunurlar. İnce ve renksiz bir kılıf bulunur. Hücreler bir zarla ayrılmıştır (Komarek 2006).



Resim 2.3. Chroococciopsidales

2.4.3. Gleobacterales

Tilakoidleri bulunmayan tek siyanobakteri cinsidir. Sadece Gloeobacteraceae cinsini içermektedir (Komarek, 2006).



Resim 2.4. Gleobacterales

2.4.4. Nostocales

Her tarafta aynı kalınlıkta ve dışta kaygan bir mütılaj tabakası ile çevrili ipliksi yapıdadırlar. Hücrelerinin şekli tesbih tanelerine benzer. İpliği oluşturan bazı hücreler asimilasyon pigmentlerini kaybederek sararırlar. Diğerlerinden daha büyük olan bu hücrelere heterosist adı verilir (Komarek, 2006).



Resim 2.5. Nostocales

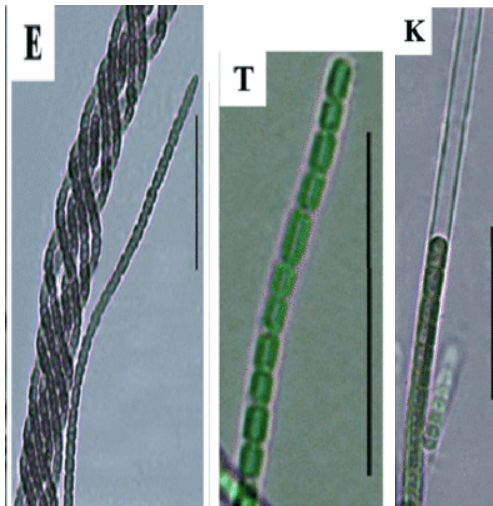
2.4.5. Oscillatoriales

Tek tek ve ince kılıflı olan ve uzun eksenî boyunca rotasyon yönünde kıvrımlı hareket edebilen ipliksi organizmalardır. Dallanma göstermezler (Komarek, 2006).



Resim 2.6. Oscillatoriales

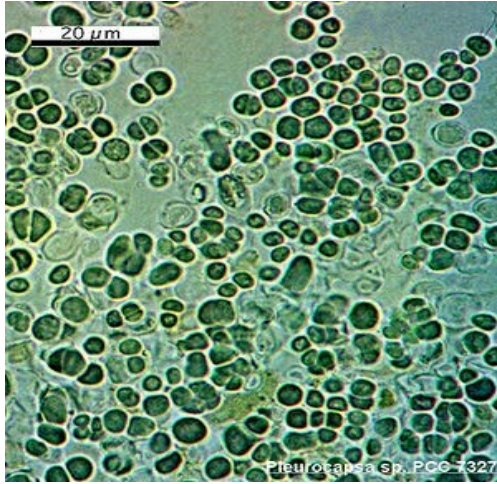
2.4.6. Pseudanabaenales



Resim 2.7. Pseudanabaenales

2.4.7. Pleurocapsales

Tek hücreli bulunabilirler ve azot fiksasyonu yeteneğine sahiptirler. Tatlı veya tuzlu sularda yaşayabilirler.



Resim 2.8. Pleurocapsales

2.4.8. Spirulinales

Spiral yapıda olup uzun ve kılıfsızdır. Afrika'da Çad bölgesinde yazın kuruyan gölcüklerde yetişen bazı türleri toplanarak bölge yöre halkı tarafından besin olarak değerlendirilirler.



Resim 2.9. Spirulinales

2.4.9. Synechococcales

Hücreler dikdörtgenimsi, silindirik ya da elips, dik, uzunlamasına, tek ya da 2'li, nadiren de 4'lü gruplar halinde birliktedir. Hücreler, ortak bir müsilaj bir kılıf olmadan dik konumdadır. Hücreler elips ya da yuvarlak uç silindirik haldedir. Hücrelerin uzunluğu 20μm'ye kadar olabilmektedir (Komarek, 2006).



Resim 2.10. Synechococcales

2.5. Siyanobakterilerin Moleküler Taksonomisi

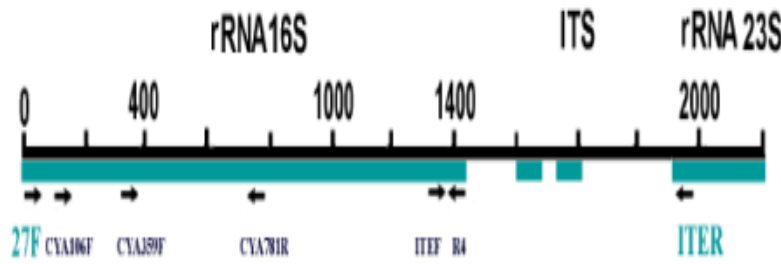
Siyanobakterilerin sınıflandırılmasında kullanılan geleneksel yöntem morfolojik olarak mikroskop yardımıyla yapılmaktadır. Fakat bu morfolojik özellikler, değişen çevre koşullarıyla birlikte değişebileceğinden taksonomi açısından yetersiz kalmaktadır. Bu yüzden DNA'ya dayanan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temelli moleküler yaklaşımlar taksonomik çalışmalara katkı sağlamaktadır (Neilan, Jacobs ve Goodman, 1995).

16S rRNA'ya dayalı siyanobakterilerin filogenisi

Hücrede ribozomlardaki proteinlere bağlı olarak bulunan ribozomal ribonükleik asitin (rRNA) tüm RNA'nın yaklaşık %80'inin oluşturduğu bilinmektedir. Bu ribozomlar biri büyük diğeri küçük iki alt birimden oluşmuşlardır. Bakterilerde büyük birim 50S, küçük birim 30S total ribozom 70S büyüklüğünde olduğu halde, ökaryotik hücrelerde büyük birim 60S, küçük birim 40S ve total ribozom ise 80S büyüklüğündedir (Kolbert ve ark., 2006).

Prokaryotlarda bulunan ribozomal RNA molekülü, 5S, 16S ve 23S olmak üzere üç çeşittir. Bakterilerde bulunan 16S ve 23S rRNA dizileri ile bu dizilerin arasına bulunan Internal Transcribed Sequence (ITS) bölgeleri de siyanobakterilerin cins altı taksonomisinde önemlidir (Boyer ve ark., 2001).

16S rRNA prokaryotlarda evrimsel olarak korunmuş ve sistematik açıdan önemli bir markır gendir (Nübel ve ark., 1997). Ayrıca 16S rRNA ile 23S rRNA gen bölgesi çok iyi korunmuş marker bir gendir (Albert ve ark., 2008). Ayrıca bu dizilerin arasında bulunan Internal Trascrived Sequence (ITS) bölgeleri de siyanobakterilerin cins altı taksonomisinde önemlidir (Boyer ve ark. 2001). Bu dizilerin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılması sağlanarak tür tayini yapılabilmektedir.



Şekil 2.5. Bağlanma sırasında primerlerin kısmi yerleri (Druga ve diğerleri, 2019).

Siyanobakterilerin morfolojik verileri ve genetik analizleri sınıflandırmalarında bazı tutarsızlıklara yol açmaktadır. Bu nedenle mevcut yöntemlere ek olarak, hücresel yağ asidi bileşimleri; aile, cins ve tür seviyesindeki bakterileri sınıflandırmak için kullanılmaktadır. Siyanobakterilerin lipidlerindeki, doyamamış yağ asidi içeriği morfolojik ve fizyolojik sınıflandırmalarıyla ilişkilidir. Tek hücreli ve filamentli siyanobakteriler, karboksil ucundan (Δ), 16 karbonlu (C16) ve 18 karbonlu (C18) veya metil ucundan (ω) sayılan çift bağların sayısına ve konumuna bağlı olarak yağ asitleri beş kümede gruplandırılmışlardır (Sivonen ve ark., 2002).

2.6. Siyanobakteriler ve Yağ Asitleri

Çoklu doyamamış yağ asitlerinin insan vücuduna olan olumlu etkilerinin anlaşılmasıyla bu asitlere olan ilgi gün geçtikçe artmıştır. Bu bağlamda çoklu doyamamış yağ asitlerinin doğal kaynakları birçok çalışmaya konu olmuştur. Yağ asitlerinin bitkisel ve hayvansal kaynaklarına ek olarak mikroorganizmalar da kullanılmaktadır. Mikroorganizmaların kısa sürede üreme yetenekleri, hızlı gelişme özelliği, endüstriyel yan ürünlerde ve atıklarda düşük maliyetle geliştirilebilir olmaları, yağ üretimlerinin her mevsim yapılması gibi

olumlu özellikleri onları lipit üretiminde alternatif haline getirmiştir (Aytuna, 2004). Günümüzde gıda ve kozmetik sektöründe kullanılan yağlar bitkisel ve hayvansal kaynaklı olarak üretilmektedir. Mikrobiyal kaynaklardan lipit üretimi için çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Fakat mikroorganizmalardan elde edilen lipit verimi ve bileşenleri ortam koşulları, ekstraksiyon yöntemi gibi dış değişkenlerden etkilenebilmektedir (Kennedy ve ark., 1993; Hassan ve ark., 1996; Bhatia ve ark., 1972; Atkinson ve Mavituna, 1991; Certik ve ark., 1996; Somashekar ve ark., 2001; Bayizit ve Başoğlu, 2000).

Bir siyanobakteri türü olan *Spirulina* bitki ve hayvanlar tarafından sentezlenmeyen; γ -linolenik asit (GLA, 18:3 ω 6), Porphyridium araşidonik asit (AA, 20:4 ω 6), *Nannochloropsis*, *Phaeodactylum*, *Nitzschia*, *Isochrysis*, *Diacronema* eikosapentaenoik asit (EPA, 20:5 ω 3) ve *Cryptocodinium*, *Schizochytrium* dokosaheksaenoik asit (DHA, 22:6 ω 3) sentezlemektedir (Gouveia ve ark., 2008).

2.7. Siyanobakterilerin Antimikrobiyal Aktivitesi

Antimikrobiyal maddeler, sentetik olarak veya doğal kaynaklardan elde edilen çok az dozlarda uygulandığında dahi mikroorganizma gelişimini engelleyen, biyolojik kökenli, sekonder metabolitlerdir. Bunlar, mikroorganizmanın çoğalmasını engelleyici olabildikleri gibi, mikroorganizmanın ölümüne neden olan maddeler de olabilirler (Evrin ve ark., 2010). Bir antimikrobiyalde olması gereken en önemli özellik ise “seçici toksik” etki yani konağa zarar vermeden mikroorganizmanın inhibe edilmesidir (Ustaçelebi, 1999).

Dünyanın çeşitli yerlerinden toplanan siyanobakteri türleri (*Oscillatoria redekei*, *Anabaena* sp. *Anabaena cylindrica*, *A. virabilis*, *Anabaena oryzae*, *Hapalosiphon* sp. *Spirulina* sp., *Spirulina platensis*, *Westiellopsis prolifica*, *Oscillatoria* sp. *Aulosira fertilissima*, *Lyngbya officinalis*, *Tolypothrix ceytonica*, *Tolypothrix tjipanensis*, *Synechocystis aquatilis*, *Nostoc muscorum*) üzerinde antimikrobiyal etki çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda genellikle metanol, hexan, kloroform, etanol, aseton, dietil eter, butanol ve DMSO organik çözücülerin kullanımıyla farklı siyanobakter ekstraktlar elde edilmiştir. Elde edilen ekstraktların patojenlere karşı etkisi incelenmiştir. En sık kullanılan patojenler *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas*

aeruginosa'dır (Mundt ve ark., 2003; Özdemir ve ark., 2004; El-Sheekh ve ark., 2006; Katırcıoğlu ve ark., 2006; Martins ve ark., 2008).

2.8. Siyanobakterilerin Antioksidan Aktivitesi

Metabolizmanın işleyişinde doğal bir süreç olan oksidasyon sonucunda serbest radikaller açığa çıkar. Eşlenmemiş elektron içeren bu atom veya moleküllerin hücrelerin zarar gördüğü reaksiyonları başlattığı bilinmektedir. Vücutta serbest radikallerin oluşumu katabolik reaksiyonların yanında sağlıksız beslenme, sigara, ilaçlar, alkol tüketimi, radyasyon, böcek ilaçları ve çevre kirliliği gibi nedenlerle de gerçekleşebilmektedir (Gökpınar ve ark., 2006). Serbest radikallerin, bağışıklık sistemini zayıflatarak kalp rahatsızlıkları, kanser ve bazı kronik hastalıklara ve erken yaşlanmaya neden oldukları bilinmektedir (Bilaloğlu ve Harmandar, 1999). Metabolizmada ortaya çıkan serbest radikalleri nötralize ederek hücrede hasar meydana gelmesini engelleyen bir savunma mekanizması vardır. Bu mekanizmayı oluşturan bileşikler 'antioksidanlar' olarak adlandırılır. Bu bakımdan antioksidanlar, hücre koruyucu tedavi ve dejeneratif hastalıklardan korunmada önemlidir (Baublis ve ark., 2000). Bu nedenle serbest radikallerin oluşumu ile mücadele eden antioksidan bileşiklerle yapılan çalışmalara artmaktadır (Gökpınar ve ark., 2006).

Siyanobakterilerin çeşitli ekstraktlarından elde edilen maddelerin antioksidan aktiviteleri üzerine birçok çalışma yapılmıştır. *Anabaena variabilis*, *Oscillatoria sp.*, *Chroococcus sp.*, *Nostoc sp.*, *Plectonema boryanum* ve *Scytonema sp.* türlerinden elde edilen heksan ve metanol ekstraktlarının serbest radikal giderme aktiviteleri araştırılmıştır ve *Plectonema boryanum* en yüksek aktiviteyi göstermiştir (Suhail ve ark., 2011).

2.9. Siyanobakterilerin Toksinleri

Çevresel faktörler siyanobakterilerin üremelerini etkilemektedir. Yaz ve erken sonbahar dönemlerinde, sucul ekosistemlerde sudaki besleyici elementler artmaktadır. Bu durumun siyanobakterilerin üreme faaliyetlerini arttırdığı bilinmektedir. Böyle zamanlarda sudaki alg, siyanobakteri ve plankton sayısının aşırı şekilde artış göstermesi 'ötrofikasyon' olarak adlandırılmaktadır. Ötrofikasyonun suyun berraklığında ve kokusunda değişimlere,

ekolojik dengesinde bozulmalara yol açtığı bilinmektedir. Ayrıca su yüzeyi aşırı artan siyanobakterilerle kaplandığında ışık alt tabaklara ulaşamaz. Bu da alt tabakada kalan canlıların fotosentezini engeller ve sudaki oksijen miktarı azalır. Dönem sonunda siyanobakteriler canlılıklarını yitirmeleriyle dibe çökerek, ayrışır. Bunun sonucunda suda hidrojen sülfür (H_2S), metan gazı, amonyak (NH_3) gibi bileşikler oluşur. Bu durum sudaki diğer canlıları olumsuz etkiler (Wetzel, 1993). Sularda oluşan ötrofikasyonların siyanobakterilerin kütlece yüksek popülasyona ulaşmasına bununla beraber toksin üretmelerine yol açtığı bildirilmiştir (Carmichael 1989, Codd ve ark., 1989, Codd ve ark., 1995, Carmichael 1997). Toksin ise “Düşük veya yüksek konsantrasyonlarda başka bir hücre, doku veya organizmaya zarar verebilecek mikrobiyal ürünler veya bileşenler” olarak tanımlanmıştır (Carmichael, 1992). Siyanobakterilerin canlı dokularında birikerek toksik etki oluşturan sekonder metabolit yapıdaki ürünleri siyanotoksin olarak adlandırılmaktadır (Negri ve Jones, 1995).

Siyanobakteriler; yapılan çalışmalar sonucunda “toksik” veya “toksik olmayan” olarak gruplandırılmıştır (Davis ve ark., 2009). Toksin üretimi genetik faktörlerin yanında, çevresel faktörlerden de etkilenmektedir. Fakat genetik olarak toksin üretebilen türlerde her zaman toksin üretmeyebilir. Hatta toksin üreten ve üretmeyen türler bir ekosistemden diğerine değişebilir (Briand ve ark., 2008). Üretilen toksin miktarı hücrenin büyüme miktarına bağlı olarak değişebildiği gibi (Sivonen, 1990) besin yoğunluğu, sıcaklık ve pH gibi faktörlerden de etkilenmektedir (Sivonen ve Jones 1999, Kaebernick ve Neilan 2001, Graham ve ark. 2004). Siyanotoksinler toksik etkilerine, moleküler yapılarına ve kökenlerine göre sınıflandırılabilir (Van der Merwe, 2015). Karaciğeri hedef alan (Hepatotoksinler): MC’ler, CYN’ler ve NOD’lardır (Humbert, 2009). ATX-a, hATX-a, ATX-a(s) ve STX’ler, nörotoksinler olup sinir sistemini etkilediği bilinmektedir. Solunum, periferik ve iskelet kaslarını felç ederek kısa sürede solunum durması ile ölüme neden olabilmektedirler (Kuiper-Goodman ve ark., 1999; Duy ve ark., 2000). Yapılan çalışmalarda MC’ler ve anatoksin (ATX)’ler için çok az sayıda da olsa etkili panzehirler olduğu, STX’ler için ise panzehir bulunmadığı bildirilmiştir (Hermansky ve ark., 1990, Hyde ve Carmichael, 1991).

Çizelge 2.1 Siyanotoksinlerin etkileri ve semptomları (Carmichael, 1993; Chorus 1999).

Toksin grubu	Memelilerde ilk hedef organ		Siyanobakteriler
Siklik peptitler	Mikrosistin	Karaciğer	Microcystis, Anabaena, Planktothrix Nostoc, Hapalosiphon, Anabaenopsis Nodularia
	Nodularin		
Alkaloidler	Anatoksin-a	Sinir sinapsları	Anabaena, Oscillatoria, Aphanizomenon
	Anatoksin-a(S)	Sinir sinapsları	Anabaena
	Aplysiatoksin	Deri	Lyngbya, Schizothrix, Planktothrix (Oscillatoria)
	Silindrospermopsis	Karaciğer	Cylindrospermopsis, Aphanizomenon, Umezakia
	Lyngbiyatoksin-a	Deri, bağırsak sistemi	Lyngbya
	Saksitoksin	Sinir aksonları	Anabaena, Aphanizomenon, Lyngbya, Cylindrospermopsis
Lipopolisakkarit (LPS) Endotoksinler	Deri		Anabaena, Aphanizomenon, Lyngbya, Cylindrospermopsis Anabaena fl os-aque, A.cylindrica, Oscillatoria tenuis, O. brevis

Siyanobakteri toksinleri insan ve hayvan sağlığı için büyük bir tehlike oluşturmaktadır. Özellikle kıyı bölgelerinde siyanobakterilerin oluşturduğu toksin topluluklar, yumurta bırakmak ve üremek için kıyı bölgelere gelen balıklara ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Siyanobakteri toksinlerinin bulunduğu suların içilmesi veya bu sulara temas edilmesi toksik etkilerinin ortaya çıkması için yeterlidir. Olası bir zehirlenme durumunda

çocukların, kronik karaciğer ve böbrek rahatsızlığı olan kişilerin daha çok risk taşıdığı bildirilmektedir (Brittain ve ark., 2000).

2.10. Siyanobakterilerin Kullanım Alanları

Siyanobakteriler binlerce yıldır ilaç, gıda ve su ürünleri yetiştiriciliği endüstrisi için yüksek değerlikli bileşiklerin doğal bir kaynağı olarak kullanılmaktadır. Dünya’da ve Türkiye’de farklı amaçlar doğrultusunda siyanobakteri üretimleri gerçekleştirilmektedir. Kullanım alanlarının içinde gıda takviyesi, akuakültür için yem ve yeşil su hazırlanması, gübre, kozmetik ve gıda ürünleri içine katkı maddesi olması yer almaktadır.

1959 yılında Brandily Çad Gölü’nün kuzey kıyısında yaşayan Kadjidi kabilesinin gölden topladıkları *Spirulina sp.*’yı un haline getirerek yiyeceklerine kattıklarını, yaptığı gözlem ve incelemeler sonucunda da Kadjidi kabilesinin diğer bölgelerde yaşayan yerlilere göre daha uzun boylu ve daha sağlıklı olduklarını bildirmiştir (Yılmaz ve Duru, 2011).

Siyanobakterilerden elde edilen çoklu doymamış yağ asitleri olan PUFA’lar sağlık alanında çok önemli faydası olan önemli biyoaktif bileşenlerdendir. PUFA’lar içeriğindeki omega 3 ve omega 6 gibi çoklu doymamış yağ asitleri insan vücudunda sentezlenmedikleri için çok gerekli yağ asitleridir (Ward ve Singh, 2005). Çoklu doymamış yağ asitlerinin ana kaynağı halk arasında en çok balıklar olarak bilinmesine karşın balıklar çoklu doymamış yağ asitlerini sentezleyemezler, dışarıdan siyanobakteri tüketerek bünyelerine alırlar. Ayrıca balık yağı gıda takviyesi olarak arzu edilmeyen kokusu ve tadı nedeniyle sınırlı tüketilmektedir (Akyl ve ark., 2016).

Proteinler, eksikliğinde dengesiz beslenmeye yol açtığı için beslenmedeki en önemli faktörlerdendir. Yüksek protein içeriğinden dolayı yetiştirilen ve besin olarak kullanılan bir siyanobakteri olan *Spirulina*’nın ham protein içeriği %60 olarak bilinmesinin yanı sıra vitamin, mineral ve birçok biyoaktif maddeyi içeriğinde bulundurmaktadır. Hücre duvarı, insan vücudu tarafından %86 oranında kolayca sindirilebilir polisakaritlerden oluşmaktadır. *Spirulina*, diyet gıdası olarak tablet, pul ve toz şeklinde kullanılmaktadır. Aynı zamanda su ürünleri yetiştiriciliği, akvaryum ve kümes hayvanları endüstrisinde de kullanılmaktadır (Sjors ve Alessvero, 2010). *Spirulina* protein, karetenoid, fikosiyenin ve

klorofil gibi pigmentleri, vitamin ve yağları içeren zengin içeriği sayesinde kozmetik sektöründe; krem, maske, sabun ve şampuan olarakta kullanılmaktadır. Siyanobakterilerden pigmentler, vitaminler ve enzimler gibi hassas kimyasalların çoğunluğu elde edilmekte ve ticari olarak kullanılmaktadır.

Siyanobakteri türlerinin büyük bir kısmı vitamin özellikleri olarak oldukça zengindir ve bu vitaminleri çevrelerine salarlar. B grubu vitaminler ve E78 gibi ticari önemi olan vitaminlerin kaynakları, denizlerde yaşayan siyanobakterilerdir. Laktamaz, lipaz ve proteaz gibi enzimler endüstri, klinik, tıp ve eczacılık sektörlerinde ticari amaçla kullanılmaktadır. Bu enzimlerin büyük ölçekli üretimi denizel siyanobakteriler kullanılarak yapılabilmektedir.

Siyanobakterilerin pigment maddeleri olan Karatenoidler ve fikobiliproteinler ticari olarak önemli bir yere sahiptir. Siyanobakterilerde pigmentler protoplast adı verilen hücrenin iç kısmındaki canlı yapıda yoğun olarak bulunmaktadır. Bu bölge kromatoplazma olarak adlandırılır. Elektron mikroskopuyla yapılan çalışmalarda hücre membranına paralel halde bulunan serbest sitoplazmik bileşenler, Kromatoplazma bölgesinde yer alan tilakoidlerin, olduğu anlaşılmıştır. Tilakoid membranların içeriğinde yağda çözünen klorofil-a ve karotenoidler bulunur. Tilakoidlerin dış yüzeylerine tutunmuş küçük bölmelerde ise suda çözünen fikobiliproteinler bulunur. Bununla birlikte tilakoid adı verilen boşluklar içerisinde silindirik biçiminde bulunan gaz vezikülleri *Spirulina*'ya yüzebilme yeteneği verir (Tomaselli, 1997).

Fikoeritrin; kırmızı renkli fikobiliprotein; fikoeritrin, mavi fikobiliproteinler de; fikoksiyanin olarak isimlendirilmektedir. Suda erime özelliği olan bu pigmentler doğal renklendirici olarak gıdalarda, aynı zamanda kozmetik ve eczacılık alanında kullanılabilmektedirler. *Porphyridium sp.* türü; floresan pembe renk veren bir pigment kaynağıdır. En önemli pigmentleri olan fikobiliproteinler, B-fikoeritrin ile bfikoeritrin; tekstil sektöründe, jelâtin içeren tatlılar ve süt ürünlerinde renklendirici olarak kullanılmaktadır. Fikoksiyaninin gıda sektöründe ürünlerin renk kalitesini artırmak amacıyla kullanılmaktadır. Aynı zamanda toksik, alerjen ve kansorejen riski olmayan doğal bir renk maddesi olduğundan sentetik pigment maddelerinin yerini almıştır (Sarada ve ark., 1999). Fikoksiyaninin kullanım alanlarından bir başkası da fonksiyonel gıda olarak tüketimidir. S.

Platensis'in kurutularak tüketimindeki en önemli faktör fikosiyaninidir. Fikasiyonin içeriği siyanobakterilere antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antikanser özellikler kazandırmaktadır. Aynı zamanda fikosiyaninin bağışıklık sistemini uyardığı ve kolestrol düşürücü etki gösterdiği de bilinmektedir (Erdal ve Ökmen, 2013).

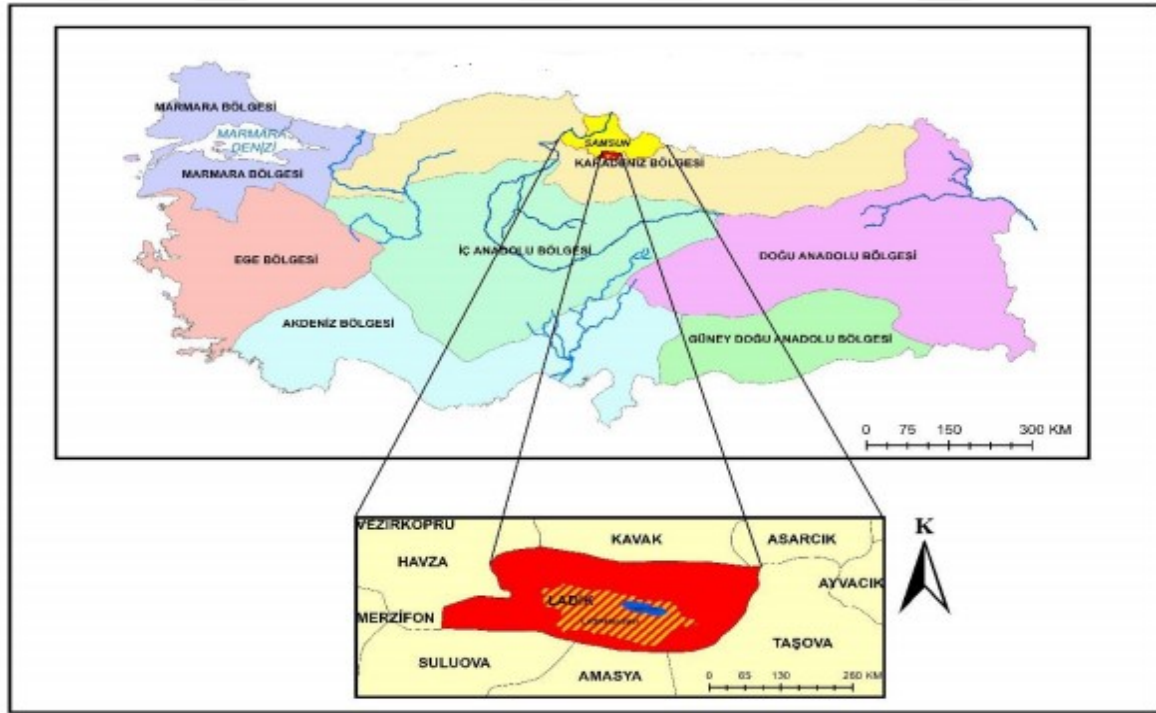


3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışma alanı

Çalışma alanı olarak seçilen Lâdik Gölü Orta Karadeniz Bölgesi'nde, Samsun ilinin güneybatısında, 35°40'-36°05' doğu meridyenleri ile 40°50'-41°00' kuzey enlemleri arasında yer almaktadır (Anonim, 1997).



Resim 3.1. Ladik Göl Haritası

Ladik Gölü, Kuzey Anadolu fay hattının zaman içerisindeki faaliyetleri sonucu oluşmuş, tektonik bir göldür. Gölü Akdağ'dan gelen Çakırgümüş deresi ve Küpecik deresi beslerken, gölün boşaltımını Yeşilırmak Nehri'ne bağlanan Tersakan çayı yapmaktadır. 5 km uzunluğunda, 2 km genişliğindeki gölün yüzölçümü 558 km²'dir. Gölün yüzey derinliği 2.5 m ile 6 m arasında değişirken, rakımı 867 m'dir. Sıcaklığı 7 ile 28°C arasında değişen göl ötrofik özellik göstermektedir (Maraşlıoğlu, 2001).

3.1.2. Çalışmada kullanılan su örnekleri

Su örnekleri Samsun İline bağlı Ladik ilçesinde bulunan Ladik gölünde belirlenen 6 bölgeden 3 Ağustos 2019 tarihinde örnek alınmıştır. Örneklem bölgeleri çizelgede belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. Örneklem bölgeleri

	Bölge İsmi	Bölge Kordinatı
1	1. Bölge	40°54'29.6"N 35°58'41.9"E
2	2. Bölge	40°54'17.8"N 35°59'07.6"E
3	3. Bölge	40°54'09.2"N 35°59'46.0"E
4	4. Bölge	40°53'57.6"N 36°00'37.1"E
5	5. Bölge	40°53'43.5"N 36°01'27.0"E
6	6. Bölge	40°53'38.5"N 36°02'04.7"E



Resim 3.2. Ladik Gölü örneklem bölgeleri

3.1.3. Çalışmada kullanılan besiyerler

BG11

NaNO₃ 10 ml (MERCK)

K₂HPO₄.3H₂O 10 ml(MERCK)

MgSO₄.7H₂O 10 ml (MERCK)

CaCl₂.2H₂O 10 ml (MERCK)

Sitrik asit 10 ml (MERCK)

Ferrie Sitrata 10 ml (MERCK)

NaEDTA 10 ml (SİGMA)

Na₂CO₃ 10 ml (MERCK)

Trace elements 1 ml (MERCK)

Agar powder (g) 12 g (MERCK)

Cycloheximide 0,5 g (MERCK)

Yukarıda verilen bileşenler eklenerek, hacim 1000 ml'ye distile su ile tamamlanarak, 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Abelson ve Simon 1988).

Nutrient Broth

Prosedüre göre 1 litre çözelti için 8 gram Nutrient Broth (MERCK) tartılarak, 121°C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. (NÜVE-STEAMART OT-90L)

3.1.4. Çalışmada kullanılan çözeltiler

Lizis Tamponu

40 mM EDTA (SİGMA)

400 mM NaCl (MERCK)

0,75 M Sukroz (MERCK)

50 mM Tris HCl (pH 8)

Derişimlerine uygun hazırlanan lizis tamponu ağız kapalı şekilde cam şişede oda sıcaklığında saklanmıştır (Boutte ve ark. 2005).

T.E. Buffer Tamponu

1 M Tris (MERCK)

0,5 M EDTA (SİGMA)

Cam şişe içerisinde derişimlerine uygun olarak hazırlanan tampon (pH:8) oda sıcaklığında saklanır (Sambrook ve ark., 1989).

5X TBE Tamponu

2x54 gram Trizma-Base (SİGMA)

2x17 gram Borik Asit (MERCK)

2x20 ml 0,5 M EDTA (SİGMA)

Cam şişe içerisinde derişimlerine uygun hazırlanan tampon (pH:8) 2 litreye tamamlanarak oda sıcaklığında saklanır.

Reagent-1 Çözeltisi

15 gram NaOH (MERCK)

50 ml Metanol (MERCK)

50 ml su

Reagent-2 Çözeltisi

65 ml Hidroklorik Asit (MERCK)

55 ml Metanol (MERCK)

Reagent-3 Çözeltisi

50 ml Hekzen (MERCK)

50 ml Tert-Butyl Eter (MERCK)

Reagent-4 Çözeltisi

1,08 gram NaOH (MERCK)

90 ml su

DPPH hazırlama

25 mg DPPH

1000 ml Su

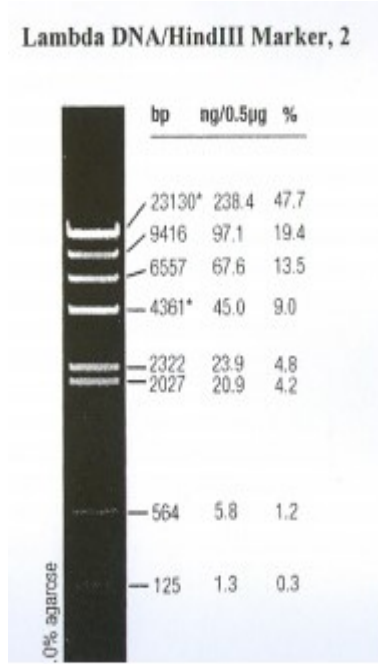
4°C’de 24 saat saklanmıştır.

3.1.5. Çalışmada kullanılan primerler

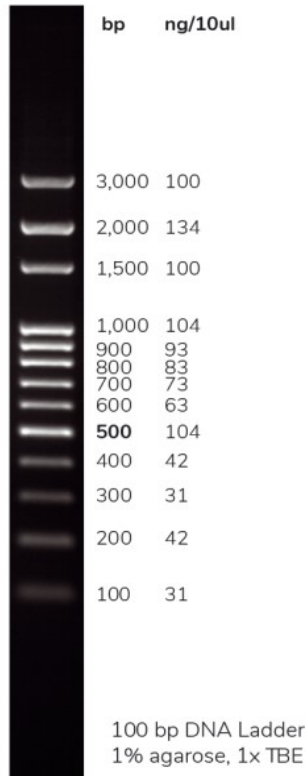
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan primerler (Taton ve ark. 2003; Boutte ve ark. 2005; Boutte ve ark. 2006).

Primer İsmi	Sekans (5' -3')	Pozisyon 3' ucu
CYA359F	ggg gaa ttt tcc gca atg gg	359
CYA781R (a)	gac tac tgg ggt atc taa tcc cat t	781
CYA781R (b)	gac tac agg ggt atc taa tcc ctt t	781
23S30R	ctt cgc ctc tgt gtg cct agg t	30

3.1.6 Çalışmada kullanılan markerlar



Resim 3.3. Lambda λ DNA/HindIII Digest (FERMENTAS) Markır'ın fragment profili



Resim 3.4. 100 bp DNA Ladder (SOLIS BİODYNE) Markır'ın fragment profili

3.2. Metod

3.2.1. Su örneklerinin toplanması

Çizelge de belirtilen istasyonlardan 2019 yılı içerisinde ağustos ayında 6 istasyondan su örnekleri alınmıştır. Yapılan örneklemede alınan su örnekleri aynı gün laboratuvara getirilmiş ve analiz edilmiştir.



Resim 3.5. Ladik Gölünden su örneği alınması

3.2.2. Su örneklerinin kimyasal özelliklerinin belirlenmesi

Su örneklerinin ortalama magnezyum, demir, kalsiyum, potasyum, sodyum miktarları ICP-OES Mikro element analizi ile Amasya Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarından, hizmet alımı yapılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Su örneklerinden siyanobakteri izolasyonu ve kültüre alınması

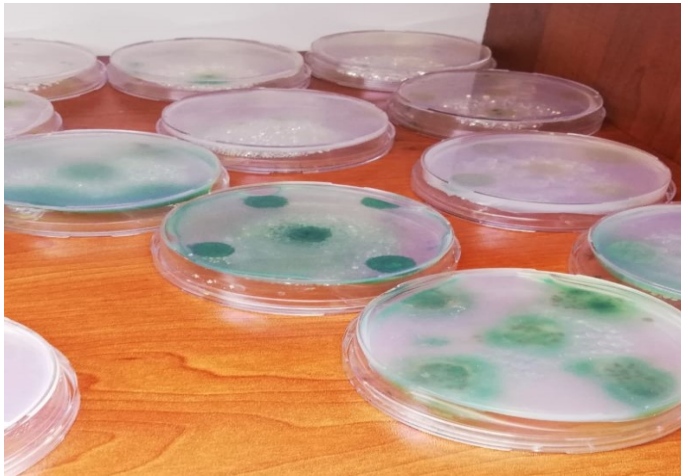
Su örnekleri aynı gün Amasya Üniversitesi Eğitim Fakültesi Araştırma ve Uygulama Laboratuvarına getirilmiştir. Alınan örneklerin ekimi, bir gün öncesinden hazırlanan BG11 besiyeri bulunan steril erlenlere yapılmıştır. Erlenler oda sıcaklığında lüx beyaz ışık altında 20 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. 20 gün sonunda erlenlerde gelişen mavi-yeşil renkteki koloniler incelenmiş farklı renk ve morfolojik yapıdaki koloniler

görülmüştür. Kolonileri saflaştırmak amacıyla erlenlerden BG11 besiyeri bulunan cam tüplere ekim yapılmış, siyanobakteri türleri dışındaki kolonileri öldürmek amacıyla cam tüplere ridolin çözeltisi eklenmiş ve 15 gün süreyle lüx beyaz ışık altında inkübasyona bırakılmıştır. Cam tüplerde saflaşan türler sırasıyla 100 ml, 250ml, 500 ml ve 1000ml erlenlere ekim yapılarak biyokütle elde edilmiştir (Abelson ve Simon 1988).

Cam tüplerde saflaşmayan kültürler BG11 katı besiyerine damlatma yöntemiyle ekim yapılarak, oda sıcaklığında lüx beyaz ışık altında inkübasyona bırakılmıştır. Katı besiyerde saflaşan türler, BG11 bulunan cam tüplere ekilerek çoğaltılmış, çoğalan türler sırasıyla 100 ml, 250 ml, 500 ml ve 1000 ml erlenlere ekilmiştir. 1000'lik erlenler çalkalamalı inkübatörde (Innova 43 Incubator Shaker Series) inkübasyona bırakılarak yeterli biyokütle elde edilmiştir.



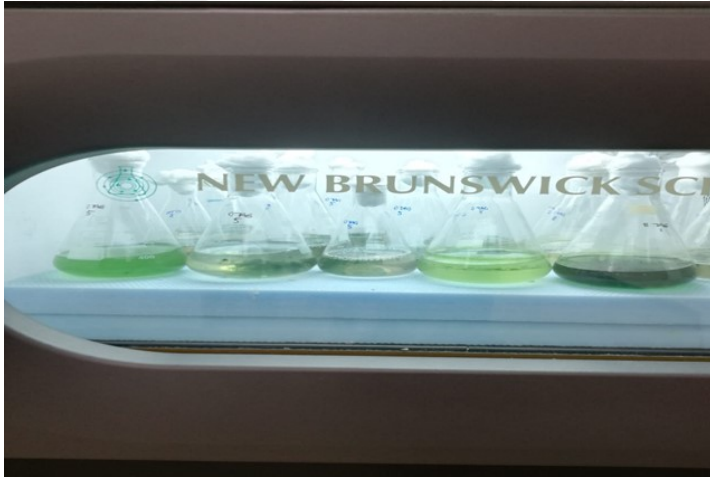
1)



2)



3)



4)

Resim 3.6. Siyanobakterilerin izolasyonu ve kültüre alınması; 1,2,3,4

3.2.4. Siyanobakteri izolatlarından ekstrakt eldesi

1000'lik erlende yeterli biyokütle oluşturan kültürler, tüplere alınarak 14.000 devirde 10 dk santrifüj (Sigma 3-30K) edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen pellet liyofilizatörde kurutulmuştur. Liyofilize edilmiş örnekler hekzan ile ultrasonikatörde (Bandelin Sonoplus) parçalanmıştır. Hekzan ekstraktları DMSO'da çözülmüştür. Örnekler -80°C 'de (Nuaire Glacier - 86 °C Ultralow Temperature Freezer) saklanmıştır.



1)



2)



3)

Resim 3.7. Siyanobakteri izolatlarından ekstrakt eldesi;1, 2, 3

3.2.4. İzolatların İdentifikasyonu

İzolatların mikroskopik analizi

İzolatların mikroskopik incelemesi amacıyla sıvı kültürlerden steril pasteur pipeti ile ateş ortamında cam tüplerden bir miktar sıvı kültür, lam üzerine aktarılmış ve üzerine lamel kapatılarak ışık mikroskobu altında, izolatların filamentli ya da tek hücreli olup olmadıkları, saflıkları ve filamentli türlerin morfolojik analizler yapılarak sonuçlar kaydedilmiştir (Boone ve ark. 2001).

İzolatların moleküler identifikasyonu

Elde edilen Siyanobakteri izolatlarının identifikasyonu için nükleik asit analizine dayalı testler uygulanmıştır (Bryant 1994; Amann ve ark. 1995; Suzuki ve ark. 2001; Boutte ve ark. 2005; Case ve ark. 2007).

16S rRNA geni amplifikasyonu için izolatlardan DNA ekstraksiyonu

16S rRNA geni amplifikasyonları için sıvı besiyerinde saflaştırılmış izolatlar, 1 litre erlende lüx ışık altında 3 hafta inkübasyona bırakılmıştır. Yeterli biyokütle elde edilen izolatların DNA izolasyonu iki farklı yöntemle yapılmıştır.

- Manuel yöntem ile DNA izolasyonu:
- EcoSpin Bakteriyel DNA Kit ile İzolasyon:

EcoSpin DNA kit siyanobakteri genomik DNA izolasyonu için kullanıldı. Örneklerden total DNA ekstraksiyonu üretici firmanın prosedürüne göre yapıldı.

Prosedüre göre:

- 1 ml bakteri kültürü 6000 rpm’de santfirüj edilerek, süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- Pellet üzerine 200 µl Resuspension Buffer eklenerek vortekslenmiştir.
- Parçalanmış kültür üzerine 200 µl Liziz Buffer eklenerek, tüpler ters düz edilmiştir.
- 20 µl Proteinaz-K eklenerek 55°C de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- 400 µl Binding Buffer eklenerek kolletör tüplere aktarılmış ve 11000 rpm’de 1 dakika santfirüjlenmiştir. Kollektör tüpündeki sıvı uzaklaştırılmıştır.
- 500 µl Wash Buffer eklenerek 30 saniye santfirüj edilmiş, tüpteki sıvı tekrar uzaklaştırılmıştır.
- 200 µl Wash Buffer eklenerek işlem tekrarlanmıştır.
- Kolon 1.5 ml ependorf tüplere aktarılmış, 50 µl Elution Buffer membrana eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
- 11000 rpm’de 30 saniye santfirüjlenerek filtrede tutulan DNA toplanarak -20 °C’de saklanmıştır.

Bu iki yöntemle elde edilen DNA’lar agaroz jel elektroforezi yöntemi ile gözlemlenmiştir.

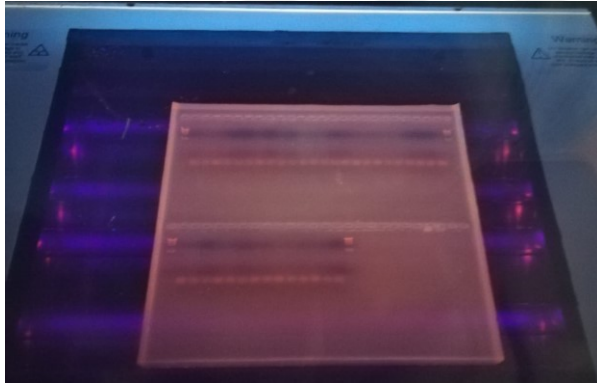
Agaroz Jel Elektroforezi

%1’lik agaroz 1X TBE tamponu içinde çözölmüştür. Solüsyon agaroz çözünene kadar mikrodalgada ısıtılmıştır. Solüsyon tank tepsisine dökölmüş, 30 dakika donması

beklenmiştir. Donan jele 1 μ l boya 7 μ l DNA kullanılarak yükleme yapılmıştır. Elektroforez (Peqlab) 120V'da 45 dk süre ile yapılmıştır. Elektroforez sonrasında jel, ethidium bromide ile boyanmış ve UV Transillüminator (Cleaver Scientific Ltd.) ile görsel hale getirilmiştir. Marker olarak, pBR322 DNA/Alu I (MBI Fermentas) kullanılmıştır (Boutte ve ark. 2005; Calusinka 2005).



Resim 3.8. Elektroforez düzeneği



Resim 3.9. UV transillüminator cihazı ile jel görüntülenmesi

3.2.5. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

PCR yöntemi ilk kez 1985 yılında bulunmuş ve geliştirilmiştir (Saiki ve ark. 1985, Mullis 1990). İn-vitro bir yöntem olan PCR, hedef bir DNA parçasının, ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz enzimi ve spesifik primerler kullanılarak çok sayıda kopyası üretilir. PCR basamakları:

- Denatürasyon (yüksek ısı altında çift sarmal yapıdaki DNA ipliklerinin birbirinden ayrılması),
- Bağlanma (özgün primerlerin kalıp DNA'nın tek ipliklerine bağlanması),

- Uzama (enzim yardımıyla zincirin uzaması)'dır.

Bu basamakların çoklu tekrarı ile istenen DNA bölgesinin milyarlarca kopyası üretilir. Siyanobakteri kültür örneklerinden izole edilen genomik DNA örneklerinde, 16S rRNA geninin yaklaşık 1500 baz çifti uzunluğundaki bölgesi, 359F-30R evrensel primerleri kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır (Neilan ve ark. 1994, Yılmaz ve ark. 2008). 16SrRNA geni prokaryotik ribozomların bir kısmını kodlar. Korunmuş nükleotit dizisinin yanında yatay gen transferlerine direçli oluşu nedeniyle siyanobakteri türlerinin taksonomisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Neilan ve ark. 1994). Yapılan tez çalışmasında, 16S rRNA gen bölgesinin dizilenmesi ile filogenetik ağaçlar oluşturularak izole edilen bazı kültür örneklerinin genetik karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. 16S rRNA gen bölgesinin PCR ile tespiti, örneklerdeki siyanobakteri varlığını doğrulamıştır.

Elde edilen Siyanobakteriyel genomik DNA'dan 16S rRNA gen + ITS ve 5' 23S ucunun PCR amplifikasyonu 24µl lik bir reaksiyon karışımında gerçekleştirilmiştir. Kullanılan primer setleri CYA 359F (5'-ggggaattttccgcaatggg-3') ve 23S30R (5'-cttcgcctctgtgtgcctagg-3') dir.

Çizelge 3.3. PCR reaksiyon karışımı

Bileşenler	Hacim
10X Thermo Taq Buffer	2,5 µl
BSA	2,5 µl
MgCl ₂	2 µl
359F	1 µl
30R	1 µl
dNTPmix	1 µl
Dream Taq Polimeraz	0,25 µl
Steril Su	13,75 µl
Toplam Hacim	24 µl

1 µl genomik DNA, toplam hacim 25 µl'ye tamamlanmıştır. PCR koşulları aşağıdaki şekilde ayarlanmıştır.

Çizelge 3.4 PCR döngüsünde ayarlanan sıcaklık değeri ve süreleri

Basamak Döngü	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	94 °C	5 dk	1
Denatürasyon	94 °C	3 dk	35
Bağlanma	60 °C	3 dk	
Uzama	72 °C	3 dk	
Son Uzama	72 °C	7 dk	
Soğuma	4 °C	süresiz	

Çalışmalar sonucunda elde edilen PCR ürünleri %1 agaroz jellerde TBE (Tris-Borat-EDTA) çözeltisi içeren yatay elektroforez tankında 120V'da 30 dakika yürütülmüştür. Elektroforez sonrasında jel, ethidium bromide ile boyanmış ve UV ile görsel hale getirilmiştir.



Resim 3.10. PCR cihazı (Peqlab)

3.2.6. İzolatlardan elde edilen 16S rRNA + ITS + 5' 23S rRNA'nın amplified ribosomal DNA restriction analizi (ARDRA)

İzolatlardan elde edilen 16S rRNA PCR ürünü kalıp olarak kullanılmıştır. Restriksiyon analizi için MspI enzimi (MBI FERMENTAS) kullanılmıştır. Kesim reaksiyonu için 15 µl PCR ürünü, 1 µl restriksiyon enzimi ve 2 µl Tango buffer kullanılmıştır. Son hacim distile su ile 20 µl 'ye tamamlanmıştır. 37°C de 2,5 saat inkübe edilmiş, sonrasında enzimin inhibisyonu için 65°C de 20 dk bekletilmiştir. Örnekler 1X TBE içerisinde hazırlanan %2 agaroz jele yüklenerek 50 V akımda 2-3 saat yürütülmüştür. Örneklerin görünür hale getirilmesi için jel içerisine yükleme boyası eklenmiştir. Marker olarak pBR 322 DNA/AluI (Mbo I Fermentas) kullanılmıştır (Boutte ve ark. 2005).

3.2.7. İzolatlardan elde edilen PCR ürünlerinin dizi analizi

Dizi analizi için ARDRA jelinde aynı profiller gösteren izolatlardan bir tanesi seçilerek amplifikasyon ürününün saflaştırılması yapılmıştır. Saflaştırma işleminde EcoSpin Bacterial Genomic DNA kit kullanılmıştır. Saflaştırma işlemi şu basamaklarda gerçekleştirilmiştir.

- PCR ürünlerinin üzerine 60 µl DNA Binding Buffer eklenmiş ve yavaşça tüp ters düz edilmiş,
- PCR ürünü ve DNA Binding Buffer'ı içeren karışım kolona yüklenmiş ve 11,000xg de 1 dk santrifüj edilmiş,
- 700 µl Membrane Wash Solution kolona uygulanmış ve 11,000xg de 1 dk santrifüj edilmiş,
- Toplama tüpü uzaklaştırılmış ve yeni bir toplama tüpü kolona yerleştirilmiş.
- 500 µl Membrane Wash Solution kolona uygulanmış ve 11,000xg de 5 dk santrifüj edilmiş,
- Toplama tüpü uzaklaştırılmış ve 1,5 ml hacimde ependorf tüpü kolona yerleştirilmiş,
- Elüsyon için 30 µl Elütation Buffer kolona uygulanmış ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir, 11,000xg de 1 dk santrifüj edilmiş ve elüent -20 °C de saklanmıştır.

3.2.8. İzolatların DNA dizi analizi

İzolatlara ait PCR ürünlerinin DNA dizi analizi MacroGen (Hollanda) firmasına yaptırılmıştır.

3.2.9. Siyanobakterilerin toplam yağ miktarının belirlenmesi

Toplam yağ miktarının belirlenmesi Bligh ve Dyer (1959) metoduna göre yapılmıştır. Liyofilize edilen örneklerden 40 mg tartılarak Reagent-1 çözeltisinden 1 ml eklenmiştir. 10 saniye vortekslenen örnekler 100°C de 5 dakika bekletilmiş tekrar vortekslenerek 100°C de 25 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda 2 ml Reagent-2 çözeltisinden eklenerek vortekslenmiştir. 80°C de 10 dakika bekletilen örnekler 2 dakika buzda bekletildikten sonra 1,25 ml Reagent-3 çözeltisi eklenmiş, 10 dakika çevrilerek fazların ayrılması sağlanmıştır. Cam pipetle alt çözelti uzaklaştırıldıktan sonra Reagent-4 çözeltisinden 3 ml eklenerek 5 dakika çevirildikten sonra tam ayrılma için bekletilmiştir. Ayrılan yağ cam pipetle viyole alınarak 8°C de saklanmıştır.

3.2.10. FAME analizi

Yağ asitlerinin belirlenmesi için elde edilen siyanobakteri örneğine ait yağlar öncelikle metanolik HCl kullanarak türevlendirilmiş ve GC/MS’de analiz edilmiştir. Örneklerin analizi Amasya Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarından hizmet alımı yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Yağ asitleri metil esterleri oluşturmak için metanolik sodyum hidroksit ile saponifikasyon gerçekleştirilecek ve metilasyon metanol-HCl karışımı ile sağlanacaktır. Yağ asidi metil esterlerinin ekstraksiyonu için hekzan-metilterbutileter kullanılacaktır (Sasser, 1990).

3.2.11. Antimikrobiyal Aktivite

Mikrodilüsyon metodu

Ekstraktların antimikrobiyal aktiviteleri için Amasya Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kültür koleksiyonundan sağlanan Gam negatif (+) bakteriler; *Bacillus cereus* ATCC 7064,

Micrococcus luteus NRLL 1018, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Gam negatif (-) bakterilerden *Salmonella typhimurium* LT2, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, Mayalardan *Candida albicans* ATCC 14053, *Candida krusei* ATCC 34135 kullanılmıştır.

Deney suşları 5 ml Nutrient Broth besiyeri bulunan deney tüplerine ekilmiş, etüvde 37°C' de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda OD'leri ayarlanmıştır. OD'leri ayarlanmış kültürlerden 400 µl alınarak içinde 60 ml nutrient broth besiyeri bulunan erleninde karıştırılmıştır.

Steril 96 mikrokuyucuklu plakanın 1 numaralı kuyucuklarına kültürlerden 170 µl eklenmiş, diğer kuyucuklara 100 µl kültür eklenmiştir. 1 numaralı kuyucuklara 20mg/ml DMSO'da çözülen siyanobakteri ekstraktlarından 30 µl eklenmiştir. Karışım birinci kuyucuklardan itibaren pipetle çek bırak yapılarak yarı yarıya seyreltilmiştir.

Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) için plakalar etüvde 37°C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda üremeyi engellenen ekstre konsantrasyonu gözlemlenmiştir. Üremenin görülmediği kuyucuklardan, petrideki katı besiyerlere spot ekim yapılarak etüvde 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmış, üreme olmayan kuyucukların belirlenmesiyle MİK değerleri tespit edilmiştir (Zgoda ve Porter, 2001).

3.2.12. Antioksidan aktivite

DPPH metodu

100 µL örnek üzerine 2 mL 0.1 mM DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) çözeltisi konularak vortekslenmiş ve 30 dakika süre ile oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda örneklerin absorbans değerleri spektrofotometrede 520 nm'de metanole karşı mikropilaka okuyucu (BECKMAN COULTER DTX880) ile ölçülüp, değerler kaydedilmiştir (Kumaran ve Joel Karunakaran, 2006).



Resim 3.11. Mikroplaka okuyucu

CUPRAC metodu

100 μ L örnek üzerine 1 mL 0.01 M bakır (II) klorür ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 1 mL amonyum asetat (NH_4Ac) tampon çözeltisi (pH 7.0), 1 mL 0.0075 M neokuproin ve 1 mL distile su eklenerek, vorteksle karıştırılmış ve 30 dakika süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda spektrofotometrede 450 nm absorbans değerinde köre karşı okuma yapılmıştır. Sonuçlar, “mg Trolox ekivalent (TE)/ 100 g numune” olarak verilmiştir (Apak ve diğ., 2006).

4. BULGULAR

4.1. Su Örneklerinin Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

2019 yılında alınan su örnekleri Amasya Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarından, hizmet alımı yapılarak ICP- OES Mikro element analizi yapılmış, analiz sonucu Magnezyum, Demir, Kalsiyum, Potasyum ve Sodyum miktarlarının ortalamaları Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Ladik gölü su analizi

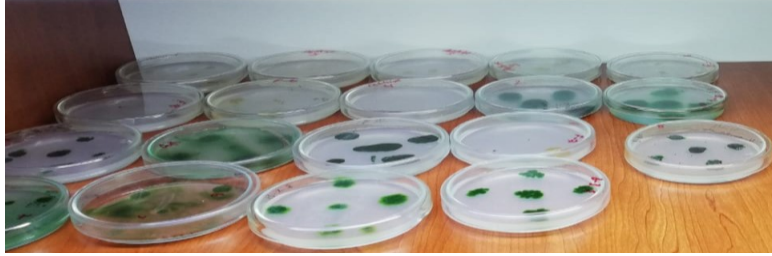
ICP-OES Analizi	Ortalama
Magnezyum (Mg)	5.292 mg/L
Demir (Fe)	0.013 mg/L
Kalsiyum (Ca)	37.30 mg/L
Potasyum (K)	2.611 mg/L
Sodyum (Na)	9.261 mg/L

Çizelge 4.1 de görüldüğü gibi Ladik Gölü su örneğinin temmuz ayı pH değeri 7.6 olup Na iyonu değeri 9.261 mg/L, K iyonu 2.611 mg/L, Mg iyonu 5.292 mg/L, Ca iyonu 37.30 mg/L, Mg iyonu 5.292 mg/L, Fe iyonu 0.013 mg/L olarak bulunmuştur.

4.2. Su Örneklerinden Siyanobakteri İzolasyonu ve Kültüre Alınması

Su örnekleri, BG-11 sıvı besiyerine ekim yapılarak, lüx ışık altında 14 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında ışık mikroskobunda (Leica DM500) görüntüleme yapılmış, farklı filamentli görünüme ve koloni morfolojisine sahip olan 14 adet izolat seçilmiş ve bu izolatların, katı besiyerine ekimleri yapılarak gelişmeleri sağlanmıştır. Petrilerdeki izolatların saflıkları mikroskopla görüntülenerek analiz edilmiştir. Saf olmayan izolatların besiyerlerine ekimleri tekrar yapılmış, bu işlem izolatlar

saflaşınca kadar devam etmiştir. Mikroskopta saflıkları kontrol edilen kültürler oda sıcaklığında stoklanmıştır. Şekil 4.1’de bazı izolatların besiyerindeki görüntüleri verilmiştir.

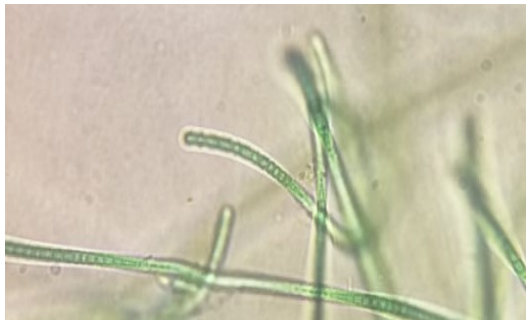


Resim 4.1. Katı besiyerine ekilen izolatlar

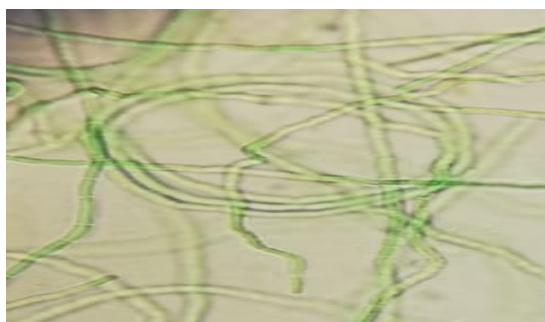
4.3. İzolatların İdentifikasyonu

4.3.1. İzolatların mikroskopik analizi

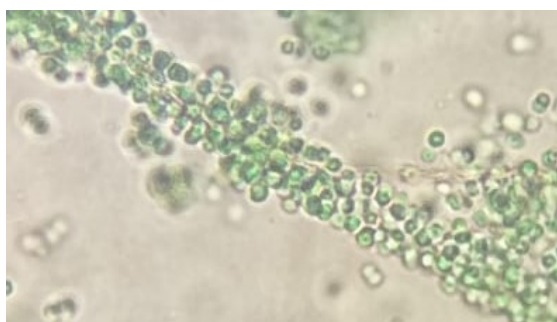
Sıvı besiyerlerinde bulunan saf kültürlerin ışık mikroskobu altında incelemeleri yapılmıştır. İncelemeler sonucunda, izolatların filametli ya da tek hücreli olup olmadıkları, saflıkları ve türlerin özelleşmiş hücre yapısı içerip içermedikleri morfolojik analizler yapılarak belirlenmiştir. Yapılan mikroskopik inceleme sonucunda elde edilen izolatların 7 tanesinin filamentli 9 tanesinin tek hücreli olduğu görülmüştür. Resim 4.2’de mikroskopik görüntüleri verilmiştir. Mikroskopla yapılan morfolojik incelemede Komarek’in teşhis anahtarına göre L4-10 türünün Phormidium, L-3-23 türünün Geitlerinema, L-1-15 türünün Nostocopsis, L-1-16 ve L-322 türlerinin Aphanocapsa, L-5-2 türünün Geitlerinema, L-5-5 türünün Lyngbya, L-4-11 ve L-1-17 türlerinin Synechococcus türüne ait olabilecekleri düşünülmüştür (Casamatta ve ark., 2016).



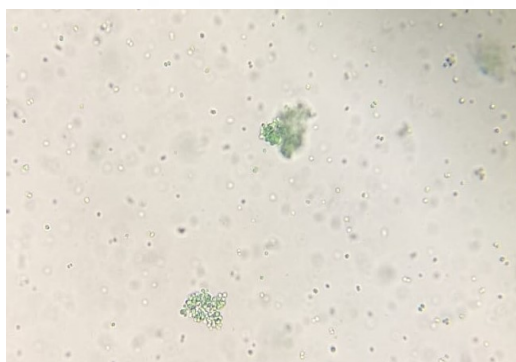
L4-10



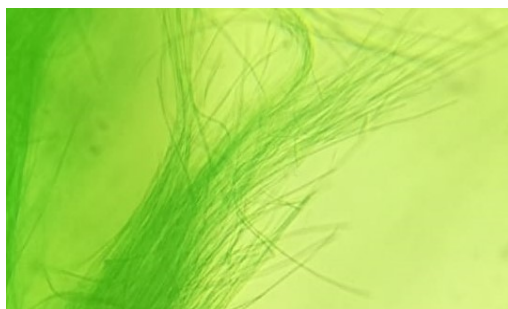
L3-23



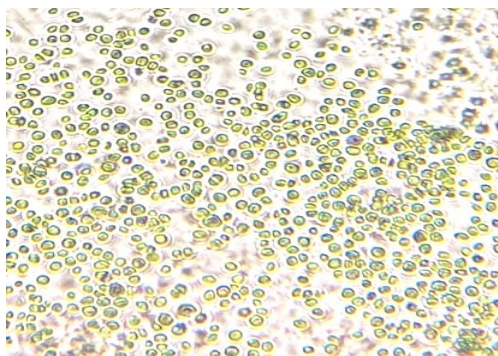
L1-15



L1-16



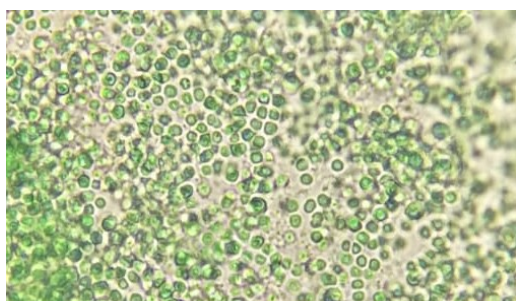
L5-2



L4-11



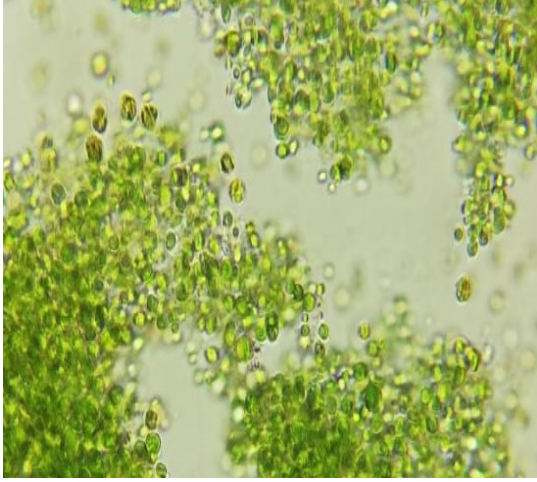
L3-22



L1-17



L5-5



L3-26

Resim 4.2. Seçilen bazı izolatların mikroskopik görüntüleri

4.3.2. İzolatların moleküler identifikasyonu

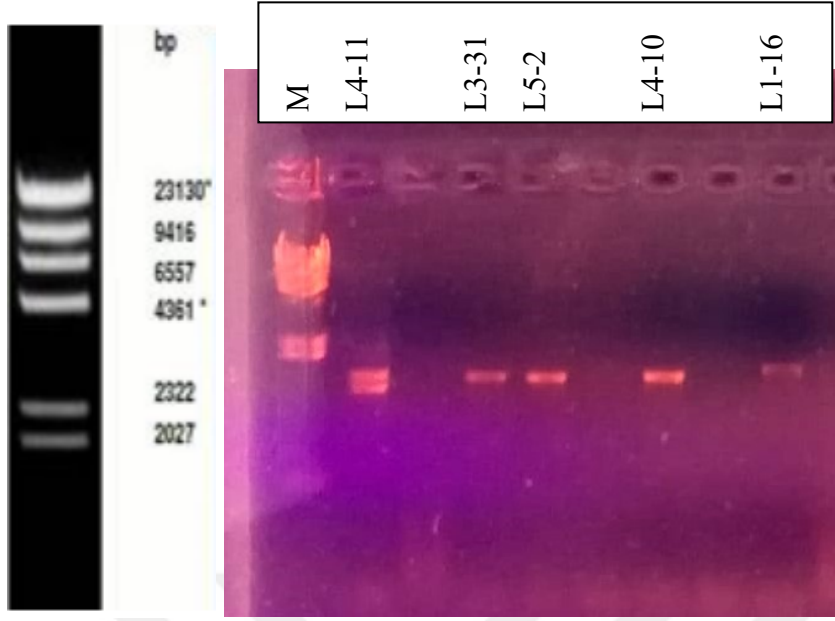
16S rRNA geni amplifikasyonu için izolatlardan DNA ekstraksiyonu

Çalışmada su örneklerinden izole edilen Siyanobakterilerin 16S rRNA geni amplifikasyonu için daha önce 3.2.4.'de belirtilen yöntem ile yapılmıştır.

16S rRNA + ITS + 5' 23S rRNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) İle Amplifikasyonu

İzolatların genomik DNA'sından 16S rRNA gen + ITS ve 5' 23S ucunun PCR amplifikasyonu 2.2.4.2'de belirtilen PCR koşullarında CYA 359F (5' - ggggaattttccgcaatggg-3') ve 23S30R (5' - cttgcctctgtgtgcctaggt-3') primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR sonrası elde edilen amplifikasyon ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür.

Resim 4.3.'de elde edilen amplifikasyon ürünlerinden bazı örnekler verilmiştir. 16S rRNA + ITS + 5' 23S rRNA'nın yaklaşık olarak 1500-2000 baz büyüklüğünde bir ürün olması gerektiğinden, elde edilen ürünün büyüklüğü, kullanılan Lambda DNA/HindIII Marker'ın bant profili ile karşılaştırılarak doğrulanmıştır.



1)

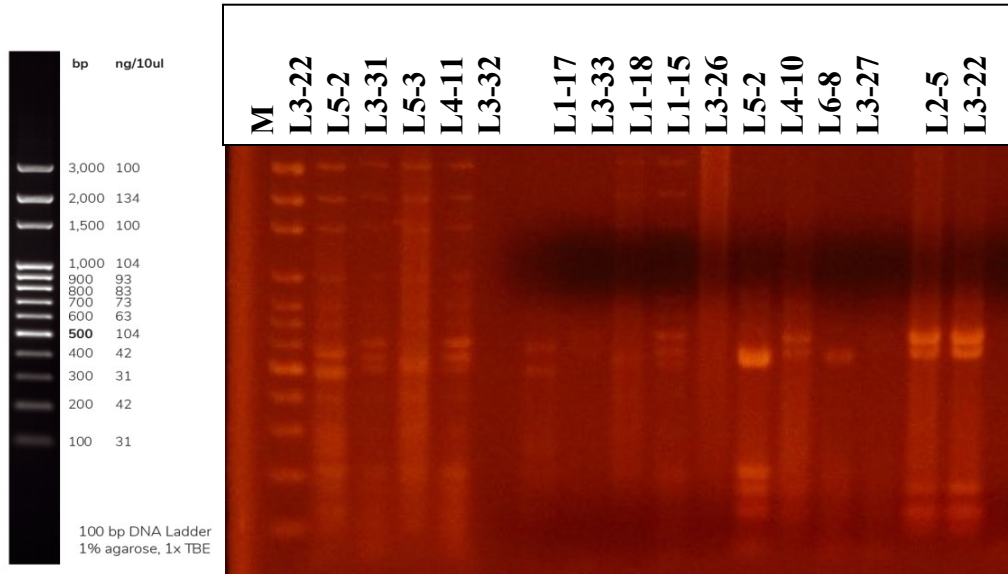
2)

Resim 4.3. Lambda DNA Hind III marker, beş örneğin 16S rRNA + ITS + 5' 23S rRNA geni amplifikasyon ürünleri; 1,2

Şekilde görüldüğü gibi, oluşan PCR ürünlerinin büyüklüğündeki ufak farklılıklar, filamentli ve tek hücreli siyanobakterilerin sahip oldukları ITS bölgesinin farklı büyüklüklerde olmasından kaynaklanmaktadır.

Elde edilen izolatların 16S rRNA + ITS + 5' 23S rRNA'nın amplified ribosomal DNA restriction analizi (ARDRA)

İzolatlardan elde edilen PCR ürünlerinin, ARDRA analizleri için kalıp olarak, amplifiye edilen 16S rRNA + ITS + 5' 23S rRNA bölgesi kullanılmıştır. PCR reaksiyonu daha önce belirtilen koşullarda CYA 359F (5' - ggggaattttccgcaatggg-3') ve 23S30R (5' - cttegcctctgtgtgcctaggt-3') primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzolatlardan elde edilen PCR ürünlerinin kesimi için MspI restriksiyon endonukleaz (MBI Fermentas) kullanılmıştır (Boutte ve ark. 2005). Aşağıdaki şekilde agaroz jel elektroforezi ile elde edilen restriksiyon fragmentlerinden bazıları Resim 4.4. de örneklenmiştir.



Resim 4.4. Elde edilen izolatların ARDRA jeli (MspI)

Şekil 4.4.'de örnek olarak 3, 6, 8 izolatlara 4, 12 izolatlara ve 5, 9, 10, 11 izolatlara ait olan 16S rRNA gen bölgesi restriksiyon profillerinin aynı olduğu görülmektedir. Aynı restriksiyon profiline sahip olan bu izolatlar aynı grup içerisinde toplanmıştır. Şekil 4.4.'de görüldüğü gibi 1, 2, 7, 13, 14, 15, 16 izolatlara ait elde edilen PCR ürünlerinin farklı restriksiyon profilleri görünmektedir. Gruplamalar yapılırken, her bir izolata ait olan bant sayıları ve bu bantların kullanılan PBR322/AluI (Fermentas) markırına göre pozisyonları kriter alınmıştır. Örnek olarak verildiği gibi, jeldeki 3, 6, 8 olarak isimlendirilmiş izolatlara ait bant profili bir grup oluşturmakta, 5, 9, 10, 11 olarak isimlendirilmiş izolatlara ait bant profili diğer bir grubu oluşturmaktadır. Örneklerde de verildiği gibi, tüm profiller, kullanılan markıra göre analiz edilmiş ve elde edilen 16 adet izolata toplam 10 farklı restriksiyon profil grubu elde edilmiştir. İzolatların ait oldukları profil grupları Çizelge 4.2.de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. İzolatların ARDRA profil grup numaraları

Grup No	İzolat Kodu	İzolat No
Grup 1	M2	L-3-22, L-4-11, L-3-27, L-3-25
Grup 2	M7	L-2-5, L-4-10
Grup 3	M4	L-3-31, L-3-32, L-3-33
Grup 4	M6	L-3-23, L-5-2, L-5-5
Grup 5	M1	L-4-11, L-1-16, L-1-15, L-3-26

Çizelge 4.2 İzolatların ARDRA profil grup numaraları (devamı)

Grup 6	M8	L-1-17
Grup 7	M10	L-4-15
Grup 8	M3	L-4-12
Grup 9	M9	L-6-18
Grup 10	M5	L-3-27

Her bir gruba ait olan temsili 1 izolat seçilerek bu izolatın, 16S rRNA + ITS + 5' 23S rRNA gen bölgesi amplifikasyon ürününün (yaklaşık 2000-2500 bp) kısmi MacroGen firmasına DNA dizi analizi yaptırılmıştır. Elde edilen dizi analizi sonuçları Blast (Basic Local Alignment Search Tools) algorithm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ile analiz edilmiştir. The BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) software programı otomatize Clustal W alignment temeline bağlı olarak sekans alignment için kullanılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. ARDRA grup numaralarına göre 30R/1494R primerleri ile sekans analiz sonuçları

İzolat Kodu	Primer	Blast Analizi Sonucu	Benzerlik Oranı (%)	Uzunluk bp	Gen Bankası Numarası
M1	30R	Synechocystis sp. 0TAG6 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	100%	1481	OK631714.1
	1494R	Synechocystis sp. MA01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.71%	1435	MG742357.1
	1494R-30R	Synechocystis sp. MA01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.08%	1435	MG742357.1

Çizelge 4.3. ARDRA grup numaralarına göre 30R/1494R primerleri ile sekans analiz sonuçları (devamı)

M2	30R	Synechocystis sp. 0TAG6 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	99%	1481	OK631714.1
	1494R	Synechocystis sp. YACCYB510 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	1386	MH683775.1
	1494R-30R	Synechocystis sp. 0TAG6 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	99.93%	1481	OK631714.1
M3	30R	Synechocystis sp. 0TAG6 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	99.08%	1481	OK631714.1
	1494R	Synechocystis sp. YACCYB510 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	952	MH683775.1
	1494R-30R	Synechocystis sp. 11TAC14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	1386	MZ790592.1

Çizelge 4.3. ARDRA grup numaralarına göre 30R/1494R primerleri ile sekans analiz sonuçları (devamı)

M4	30R	Geitlerinema carotinosum AICB 37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; tRNA- Ile and tRNA-Ala genes, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	1860	AY423710.1
	1494R	Geitlerinema carotinosum AICB 37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; tRNA- Ile and tRNA-Ala genes, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	1876	AY423710.1
	1494R- 30R	Geitlerinema carotinosum AICB 37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; tRNA- Ile and tRNA-Ala genes, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene	100%	1860	AY423710.1

Çizelge 4.3. ARDRA grup numaralarına göre 30R/1494R primerleri ile sekans analiz sonuçları (devamı)

M5	30R	Synechocystis sp. 0TAG6 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	100%	1481	OK631714.1
	1494R	Synechocystis sp. YACCYB510 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	1386	MH683775.1
	1494R-30R	Synechocystis sp. YACCYB510 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.18%	1380	MH683775.1
M6	30R	Phormidesmis sp. WJT36-NPBG27 clone P5A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, tRNA-Ile and tRNA-Ala genes, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	98.78%	713	KC525090.1
	1494R	Phormidium tenue BDU 92362 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.59%	995	KU958134.1
	1494R-30R	Phormidesmis sp. WJT36-NPBG27 clone P5A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, tRNA-Ile and tRNA-Ala genes, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	98.92%	3144	KC525090.1

Çizelge 4.3. ARDRA grup numaralarına göre 30R/1494R primerleri ile sekans analiz sonuçları (devamı)

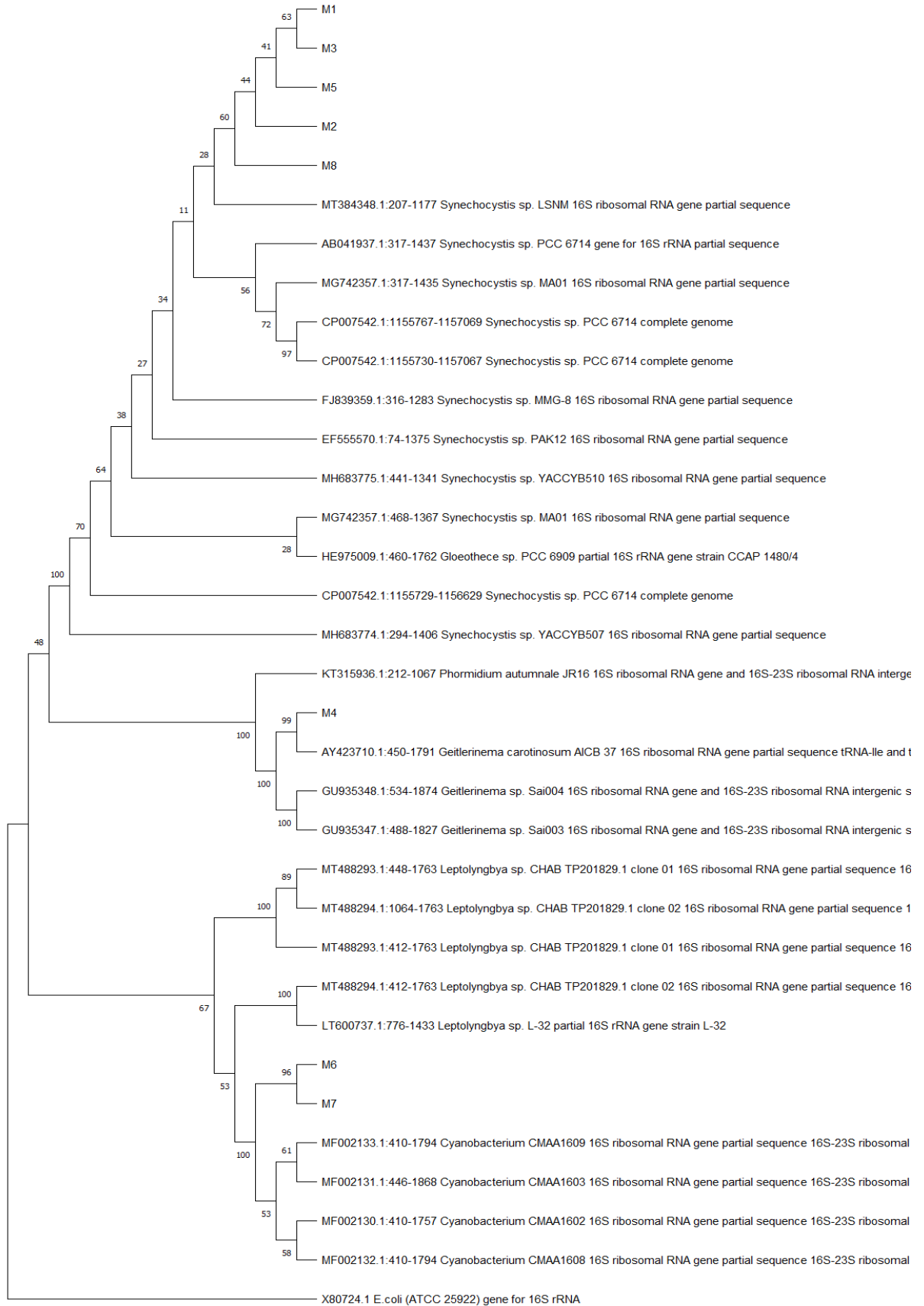
M7	30R	Phormidesmis sp. WJT36-NPBG27 clone P5A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, tRNA-Ile and tRNA-Ala genes, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	98.27%	823	KC525090.1
	1494R	Phormidium tenue BDU 92362 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.67%	945	KU958134.1
	1494R-30R	Phormidesmis sp. WJT36-NPBG27 clone P5A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, tRNA-Ile and tRNA-Ala genes, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	98.58%	3227	KC525090.1
M8	30R	Synechocystis sp. YACCYB510 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.88%	1534	MH683775.1
	1494R	Synechocystis sp. YACCYB510 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.88%	868	MH683775.1
	1494R-30R	Synechocystis sp. 11TAC14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.85%	2934	MZ790592.1

Ladik su örneğinin bakteriyel çeşitliliği incelendiğinde örneklemeden elde edilen 16 izolatın 11 tanesinin Synechocystis cinsine, 3 tanesinin Geitlerinema, 2 tanesinin Phormidium cinsine ait olduğu görülmektedir. İzolatların ait olduğu cinsler yüzde olarak değerlendirildiğinde toplamda 16 izolatın %69'ünün Synechocystis cinsine, %19 Geitlerinema cinsine %12'sinin ise Phormidium cinsine ait olduğu görülmektedir.

Filogenetik ağacın elde edilmesi

Filogenetik ağaç Neighbour-Joining metoduna göre “MEGA 11” programı kullanılarak, elde edilmiştir. Oluşan dallar “bootstrap” analizi ile doğrulanmıştır. Ağacın istatistiksel olarak güvenilirliği “bootstrap” değerlerinin genel olarak %50’nin üzerinde olduğu ve bu nedenle güvenilir olduğu anlaşılmıştır. M6 ve M7 izolatlarının %100 aynı küme içerisinde toplanması BLAST ile elde edilen sonuçlar ağacın topolojisini desteklemektedir.





Resim 4.5. 16S rRNA filogenetik ağaç

4.4. İzolatların Yağ Asidi Metil Esterleri (FAME) Analizi

16S rRNA gen ürününün Msp I enzimiyle kesim analizi sonucunda elde edilen farklı ARDRA profiline sahip izolatlar için FAME analizi uygulanmıştır.



1)



2)



3)

Resim 4.6. FAME analizi uygulanan bazı izolatlar

FAME analizi sonucunda L1-15 kodlu izolatın %39,81 Phenol, %2 2,85 Heptadecane içerdiği, L1-16 kodlu izolatın % 39,40 Heptadecane, % 15,74 Benzaldehyde içerdiği, L1-

17 kodlu izolatin %29,68 Heptadecane, % 14,42 Hexadecanoic acid içerdği, L2-5 kodlu izolatin %65,48 n-Hexane, %20,32 Decane (CAS) içerdği, L3-26 kodlu izolatin %33,51 Hexadecanoic acid, methyl ester, % 15,73 Heptadecane (CAS) içerdği, L3-26 kodlu izolatin %15,77 Tetradecanoic acid, methyl ester, %15,51 Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl) içerdği, L4-10 kodlu izolatin %43,82 n-Hexane, % 21,03 Decane (CAS) içerdği, L5-2 kodlu izolatin %38,75 n-Hexane, %18,07 Hexane içerdği tesbit edilmiştir.

Çizelge 4.4. İzolatların FAME analiz profilleri

İzolat L1-15	Alıkonma Zamanı	% Miktarı
Phenol,2,4-bis(1,1 dimethylethyl	8.197	39.81
Heptadecane	10.576	22.85
Eicosane (CAS)	16.207	8.81
Decane (CAS)	4.222	8.05
n-Hexane	6.782	6.19
Benzaldehyde, 3,4-dimethyl -Dimethylbenzaldehyde	5.984	4.22
İzolat L1-16	Alıkonma Zamanı	% Miktarı
Heptadecane	10.576	39.40
Benzaldehyde, 4-propyl-	6.391	15.74
n-Hexane	6.646	12.58
Hexadecanoic acid, methyl ester	15.259	5.31

Çizelge 4.4 İzolatların FAME analiz profilleri (devamı)

Hexane (CAS)	4.222	5.86
Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)	8.197	5.03
2,3-Dimethyl-undec-1-en-3-ol	16.192	3.94
3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexacen-1-ol	14.340	3.34
İzolat L1-17	Alıkonma Zamanı	% Miktarı
Heptadecane	10.576	29.68
Hexadecanoic acid, methyl ester	15.259	14.42
Phenol,2,4-bis(1,1dimethylethyl)	8.197	11.01
Phenol,2,4-bis(1,1dimethylethyl)	8.197	11.01
n-Hexane	6.662	7.19
Neophytadiene7,11,15-trimethyl	13.422	6.83
Cyclohexane, 1-methyl-4-(1-methyle thenyl)	14.340	5.42
2,3-Dimethyl-undec-1-en-3-ol	16.192	5.37
Isophytol1-Hexadecen-3-ol, 3,7,11,15-tetramethyl-	15.741	4.35

Çizelge 4.4 İzolatların FAME analiz profilleri (devamı)

İzolat L2-5	Alıkonma Zamanı	% Miktarı
n-Hexane-Skellysolve	6.662	65.48
Decane (CAS)	4.223	20.32
Hexadecanoic acid, methyl ester, Palmitic acid	15.259	8.54
n-Hexane	15.033	5.65
n-Hexane	15.033	5.65
İzolat L3-22	Alıkonma Zamanı	% Miktarı
Tetradecanoic acid, methyl ester	11.028	15.77
Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)	8.197	15.51
Decane (CAS)	4.223	7.60
Heptadecane, 7-methyl-7-Methyl	11.404	11.53
n-Hexane	6.737	11.06
9-Hexadecenoic acid, methyl ester	14.822	9.74
Heptadecane (CAS)	10.576	3.21

Çizelge 4.4 İzolatların FAME analiz profilleri (devamı)

İzolat L3-26	Alıkonma Zamanı	% Miktarı
Hexadecanoic acid, methyl ester	15.274	33.51
Heptadecane (CAS)	10.576	15.73
Hexadecanoic acid, methyl ester	15.274	33.51
Heptadecane (CAS)	10.576	15.73
2,3-Dimethyl-undec-1-en-3-ol	16.192	7.91
Valeric acid, tridec-2ynyl ester	18.225	3.72
İzolat L3-27	Alıkonma Zamanı	% Miktarı
Hexadecanoic acid, methyl ester	15.274	30.92
1-Pentadecene	10.576	19.69
2,3-Dimethyl-undec-1-en-3-ol	16.192	6.52
Neophytadiene 7,11,15 TRIMETHYL	13.422	5.26
9-Hexadecenoic acid, methyl ester	14.822	5.50
2,6-Octadienal, 2,6-dimethyl-8	18.225	3.10

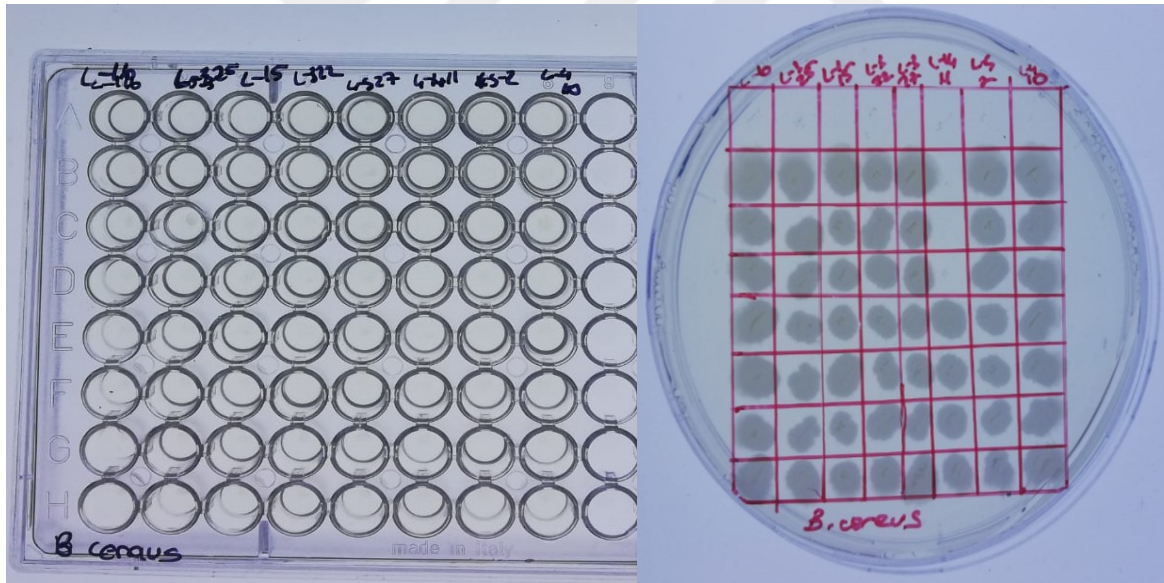
Çizelge 4.4 İzolatların FAME analiz profilleri (devamı)

İzolat L4-10	Alıkonma Zamanı	% Miktarı
n-Hexane	6.691	43.82
Decane (CAS)	4.222	21.03
Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-(CAS)	8.197	19.31
9-Hexadecenoic acid, methyl ester	14.837	9.39
Hexadecanoic acid, methyl ester	15.273	6.45
İzolat L5-2	Alıkonma Zamanı	% Miktarı
n-Hexane	6.661	38.75
Hexane (CAS)	4.222	18.07
Undecanoic acid, methyl ester	7.098	15.32
Hexadecanoic acid, methyl ester	15.258	9.11
n-Hexane	4.779	8.33
13-methyltetradecanoate Pentadecanoic acid, methyl ester	12.322	4.35

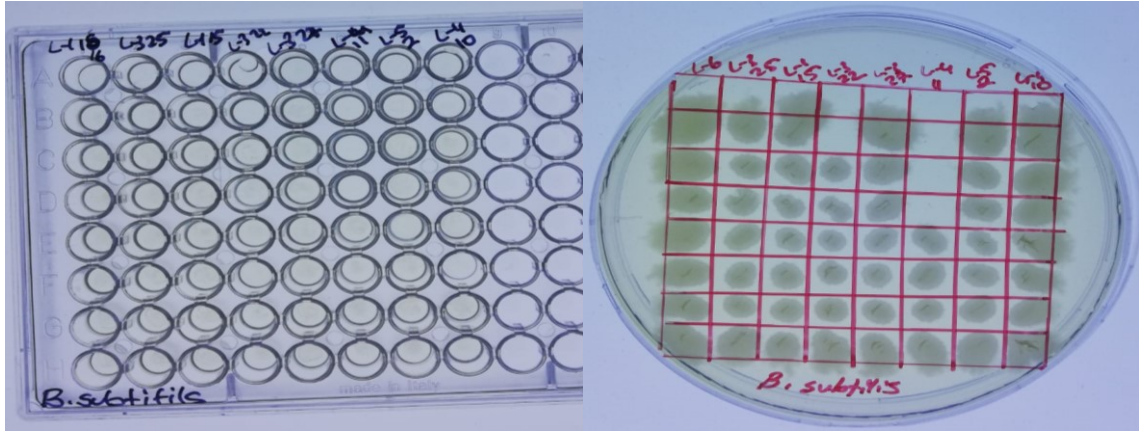
4.5. Siyanobakteri Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri

Bu çalışmada, bütün siyanobakteri türlerinden elde edilen hekzan ekstraktların, Mikrodilüsyon Yöntemi kullanılarak; Gam pozitif (+) bakterilerden *Bacillus cereus* ATCC 7064, *Micrococcus luteus* NRLL 1018, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Gam negatif (-) bakterilerden *Salmonella typhimurium* LT2, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, Mayalardan *Candida albicans* ATCC 14053, *Candida krusei* ATCC 34135'a karşı antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Herhangi bir üremenin gerçekleşmediği en düşük madde konsantrasyonları (MİK) belirlenmiştir.

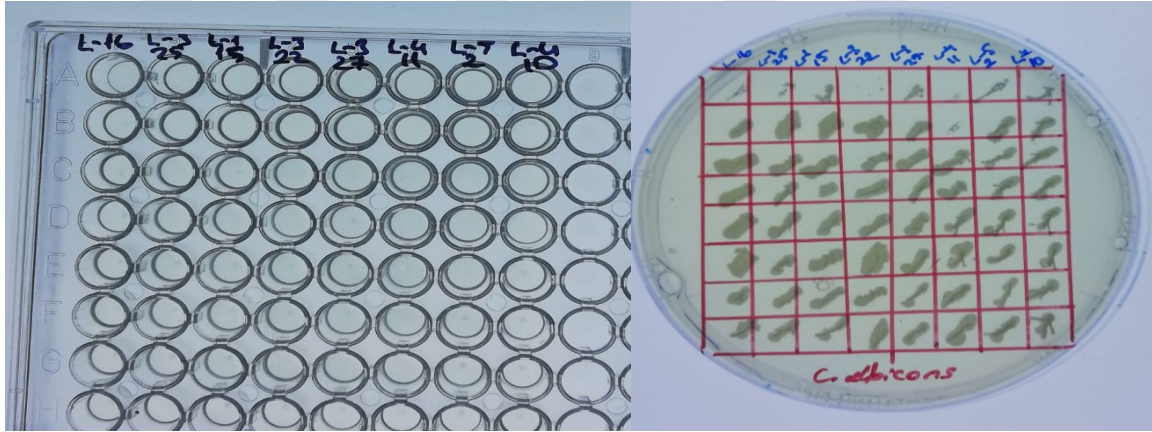
Çalışmada kullanılan siyanobakterilerin ekstraktının, bakteriyal test mikroorganizmaları üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri Çizelge 4.5.'de görülmektedir.



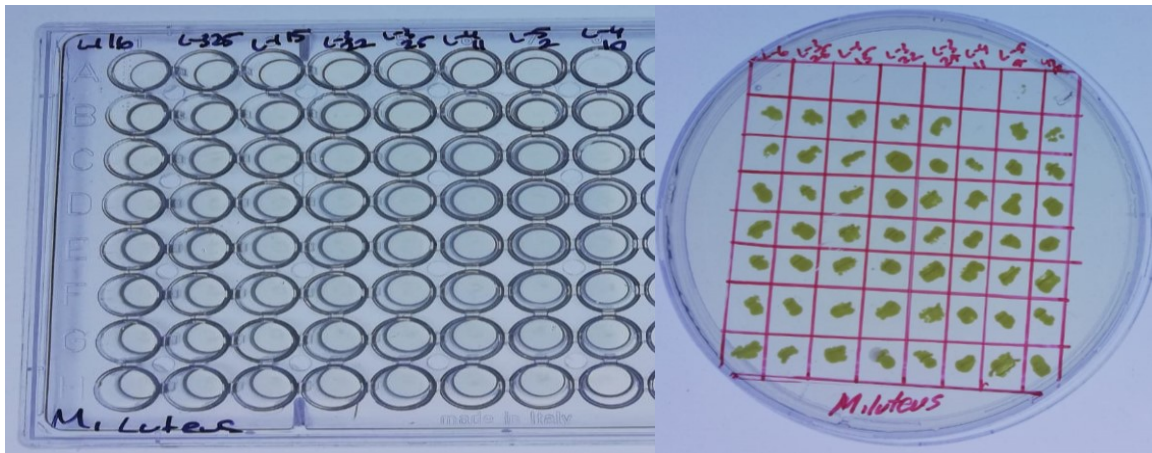
Resim 4.7. Siyanobakteri türlerinin *Bacillus cereus* ATCC 7064 üzerine antimikrobiyal etkisi



Resim 4.8. Siyanobakteri türlerinin *Bacillus subtilis* ATCC 6633 üzerine antimikrobiyal etkisi



Resim 4.9. Siyanobakteri türlerinin *Candida albicans* ATCC 14053 üzerine antimikrobiyal etkisi



Resim 4.10. Siyanobakteri türlerinin *Micrococcus luteus* NRLL 1018 üzerine antimikrobiyal etkisi

Resim 4.5; Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’deki siyanobakteri ekstraktlarının MİK değerlerine bakıldığında, çalışılan konsantrasyonlarda bazı siyanobakteri türlerinin ekstraktlarının antimikrobiyal etki gösterdiği, bazı siyanobakteri türlerin ekstraktlarının çalışılan konsantrasyonlarda antimikrobiyal etki göstermediği tespit edilmiştir

Çizelge 4.5. Siyanobakterilerin ekstraktının, bakteriyel test mikroorganizmaları üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri

	MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) mg/ml					
Test Mikroorganizmaları	L-1-16	L-3-25	L-1-15	L-3-22	L-3-27	DMSO
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 7064	3	3	3	3	3	3
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	3	1,5	3	1,5	3	3
<i>Micrococcus luteus</i> NRLL 1018	3	3	3	3	3	3
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	3	>3	>3	1,5	>3	3
<i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i> LT2	1,5	3	3	3	3	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>3	3	3	3	1,5	3
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	3	3	3	3	3	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	3	3	3	1,5	3	3
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	3	3	>3	3	3	3
<i>Candida krusei</i> ATCC 34135	3	3	>3	3	3	3

Çizelge 4.5. Siyanobakterilerin ekstraktının, bakteriyal test mikroorganizmaları üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri

	MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) mg/ml					
Test Mikroorganizmaları	L-4-11	L-5-2	L-4-10	L-3-33	L-3-31	DMSO
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 7064	0,0375	3	3	>3	>3	3
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	>3	3	3	3	>3	3
<i>Micrococcus luteus</i> NRL 1018	1,5	3	3	3	3	3
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0,0375	3	>3	>3	>3	3
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	>3	3	>3	>3	>3	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>3	>3	3	>3	3	3
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	3	3	3	3	3	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0,0375	3	>3	>3	>3	3
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	1,5	3	3	3	3	3
<i>Candida krusei</i> ATCC 34135	>3	3	3	3	3	3

Bacillus cereus ATCC 7064 üzerine L-1-16, L-3-25, L-1-15, L-3-22, L-3-27, L-5-2, L-4-10 kodlu ekstraktların MİK değerinin 3 mg/ml olduğu görülürken, L-3-33 ve L-3-31 kodlu

ekstraktların MİK değerinin 3 mg/ml'den büyük olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında L-4-11 kodlu ekstraktın MİK değerinin 0,0375 mg/ml olduğu belirlenmiştir.

Staphylococcus aureus ATCC 25923 üzerine L-1-16, L-1-15, L-3-27, L-5-2, L-4-10, L-3-33 kodlu ekstraktların MİK değerinin 3 mg/ml olduğu tespit edilmiştir. L-3-33 ve L-3-31 kodlu ekstraktların MİK değerinin 3 mg/ml'den büyük olduğu tespit edilmiştir. L-3-25 ve L-3-22 kodlu ekstraktların MİK değerinin 1,5 mg/ml olduğu tespit edilmiştir.

Micrococcus luteus NRLL 1018 üzerine L-1-16, L-3-25, L-1-15, L-3-22, L-3-27, L-5-2, L-4-10, L-3-33, L-3-31 kodlu ekstraktların MİK değerinin 3 mg/ml olduğu tespit edilmiştir. L-4-11 kodlu ekstraktların MİK değerinin 1,5 mg/ml olduğu tespit edilmiştir.

Bacillus subtilis ATCC 6633 üzerine L-3-25, L-1-15, L-3-27, L-4-10, L-3-33, L-3-31 kodlu ekstraktların MİK değerinin 3 mg/ml'den büyük olduğu tespit edilmiştir. L-1-16 ve L-5-2 kodlu ekstraktların MİK değerinin 3 mg/ml olduğu tespit edilmiştir. L-3-22 kodlu ekstraktların MİK değeri 1,5 mg/ml olarak bulunmuştur. L-4-11 kodlu ekstraktların MİK değerinin 0,0375 mg/ml olduğu tespit edilmiştir.

Salmonella typhimurium LT2 üzerinde L-4-11, L-4-10, L-3-33, L-3-31 kodlu ekstraktların MİK değerinin 3 mg/ml'den büyük, L-3-25, L-1-15, L-3-22, L-3-27, L-5-2 kodlu ekstraktların MİK değerinin 3 mg/ml olduğu tespit edilmiştir. L-1-16 kodlu ekstraktların MİK değeri 1,5 mg/ml bulunmuştur.

Klebsiella pneumoniae üzerine L-1-16, L-4-11, L-5-2, L-3-33 kodlu ekstraktların MİK değerinin 3 mg/ml'den büyük olduğunun tespiti yapılmıştır. L-3-25, L-1-15, L-3-22, L-4-10, L-3-31 kodlu ekstraktların MİK değeri 3 mg/ml olarak hesaplanmıştır. L-3-27 kodlu ekstraktın MİK değeri 1,5 mg/ml bulunmuştur.

Escherichia coli ATCC 25922 üzerine L-1-16, L-3-25, L-1-15, L-3-22, L-3-27, L-4-11, L-5-2, L-4-10, L-3-33, L-3-31 kodlu ekstraktların MİK değeri 3 mg/ml bulunmuştur.

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 üzerine L-1-16, L-3-25, L-1-15, L-3-27, L-3-31 kodlu ekstraktların MİK değeri 3 mg/ml bulunmuştur. L-4-10, L-3-33, L-3-31 kodlu ekstraktların MİK değerinin 3 mg/ml'den büyük olduğu tespit edilmiştir. L-4-11 ekstraktların MİK değeri 0,0375 mg/ml olarak bulunmuştur.

Candida albicans ATCC 14053 üzerine L-1-15 kodlu ekstraktların MİK değerinin 3 mg/ml'den büyük olduğunun tespiti yapılmıştır. L-1-16, L-3-25, L-3-22, L-3-27, L-5-2, L-4-10, L-3-33, L-3-31 kodlu ekstraktların MİK değeri 3 mg/ml olarak bulunmuştur. L-4-11 kodlu ekstraktların MİK değeri 1,5 mg/ml olarak tespit edilmiştir.

Candida krusei üzerine L-1-15, L-4-11 kodlu ekstraktların MİK değerinin 3 mg/ml'den büyük olduğu tespit edilmiştir. L-1-16, L-3-25, L-3-22, L-3-27, L-5-2, L-4-10, L-3-33, L-3-31 kodlu ekstraktların MİK değeri 3 mg/ml olduğu bulunmuştur.

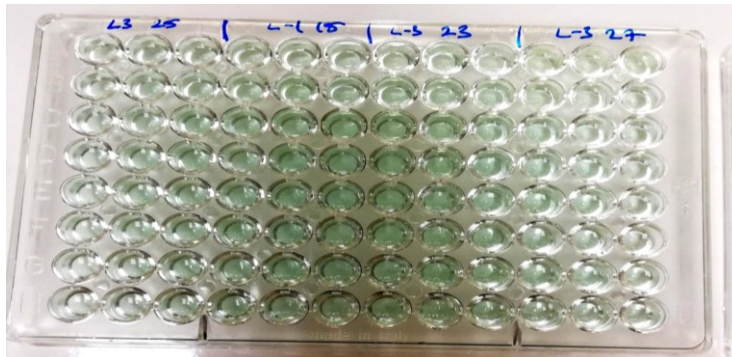
4.6. Siyanobakteri Ekstraktlarının Antioksidan Aktiviteleri

Bu çalışmada bütün siyanobakteri türlerinden elde edilen metanolik ekstraktların, antioksidan aktivitesini belirlemek amacı ile DPPH radikalleri süpürme yöntemi ve Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi kullanılmıştır.

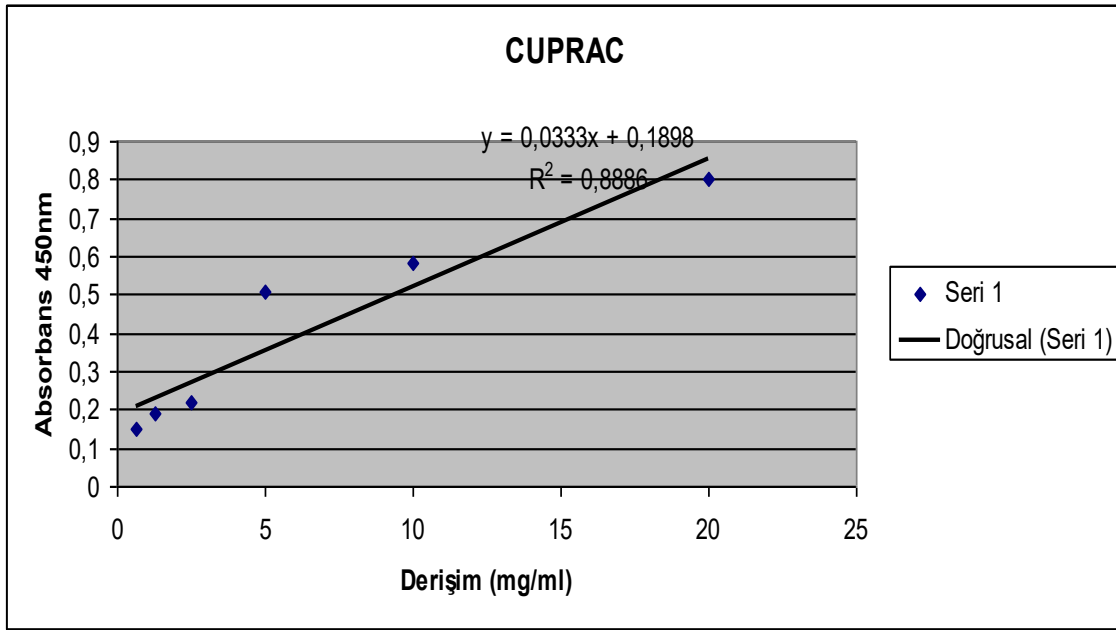
4.6.1. Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi

Antioksidan özelliklerini belirlemek amacıyla metanolik ekstraktlara Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi uygulanmıştır.

L-3-22, L-1-15, L-3-23, L-3-27 kodlu siyanobakteri ekstraktlarının Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasitesi ile ilgili deneysel çalışmalar Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4'de görülmektedir.

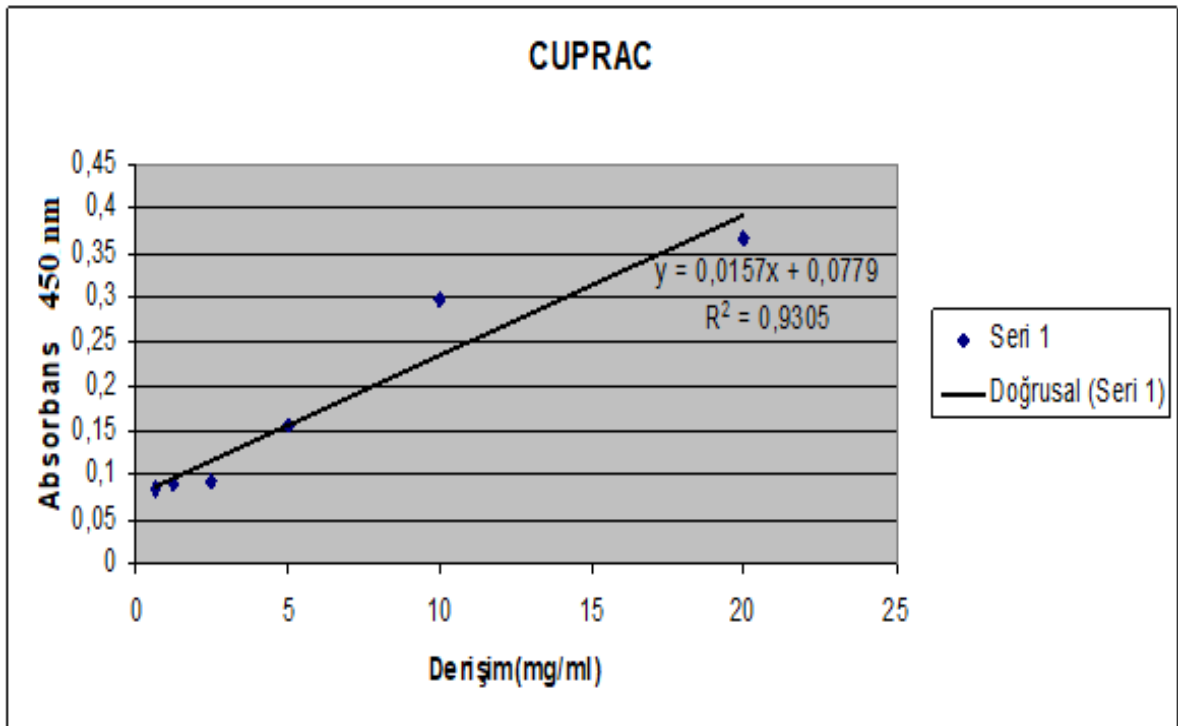


1)

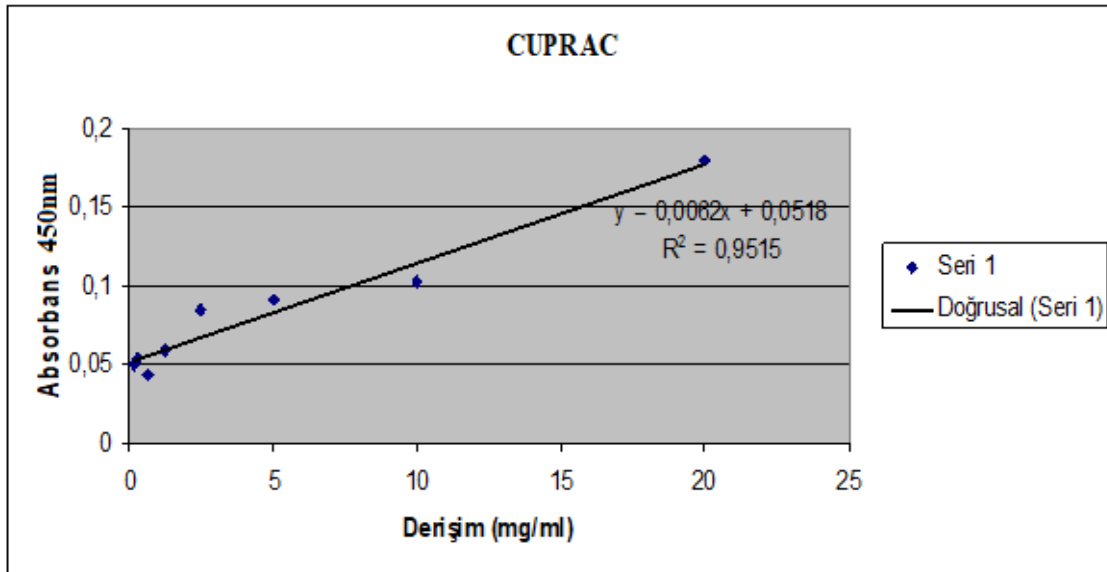


2)

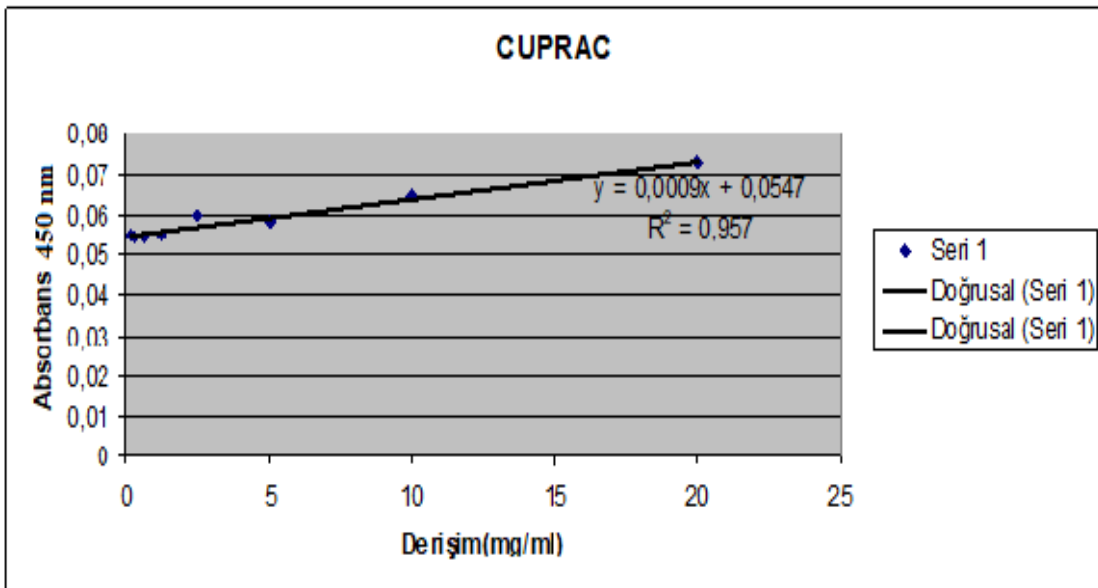
Şekil 4.1. L3-22 kodlu siyanobakteri türünün Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasitesi (1,2)



Şekil 4.2. L-1-15 kodlu siyanobakteri türünün Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasitesi

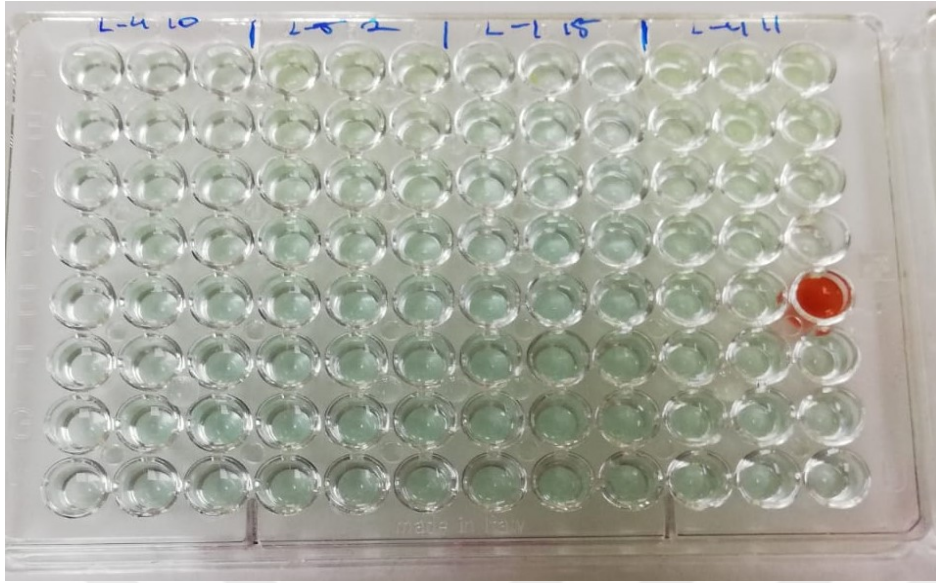


Şekil 4.3. L-3-23 kodlu siyanobakteri türünün Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasitesi



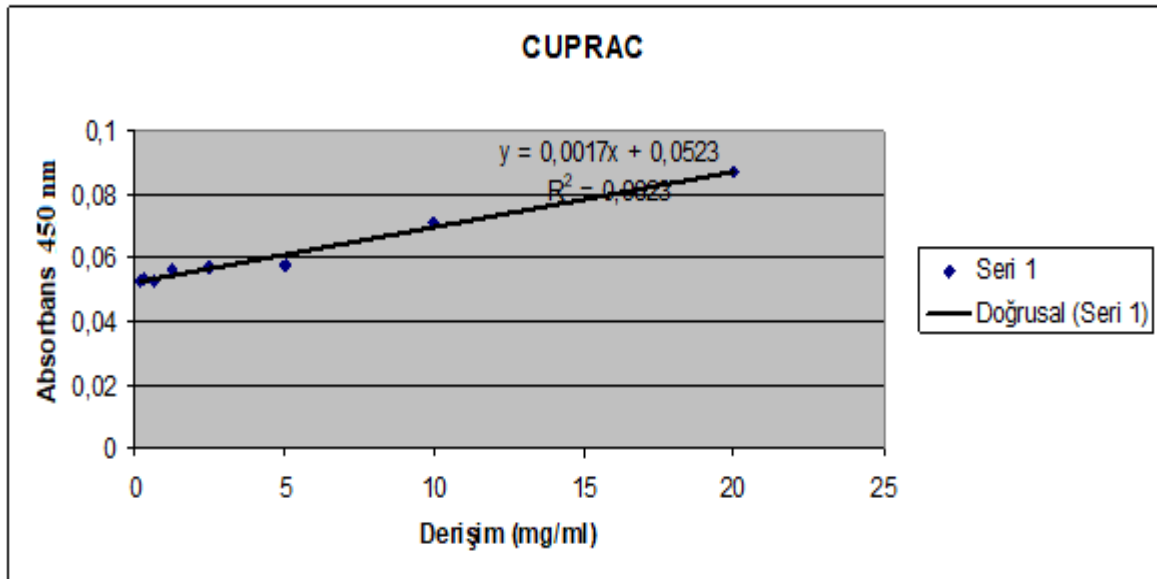
Şekil 4.4. L-3-27 kodlu siyanobakteri türünün Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasitesi

L4-10, L5-2, L1-15, L4-11 kodlu siyanobakteri türünün Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasitesi ile ilgili deneysel çalışmalar Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8’de görülmektedir.

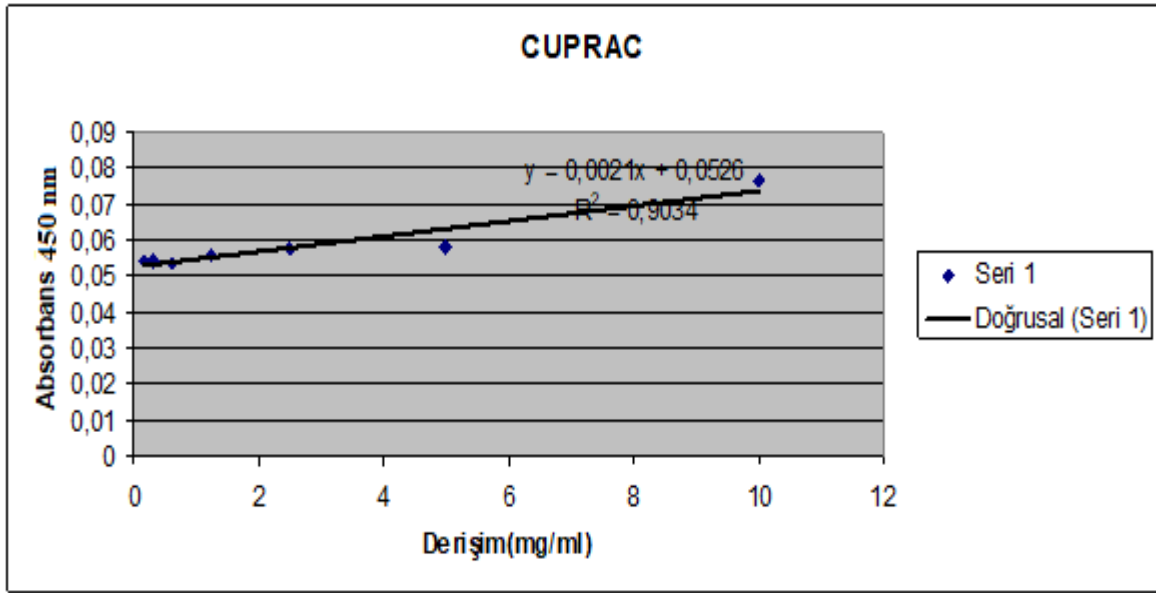


1)

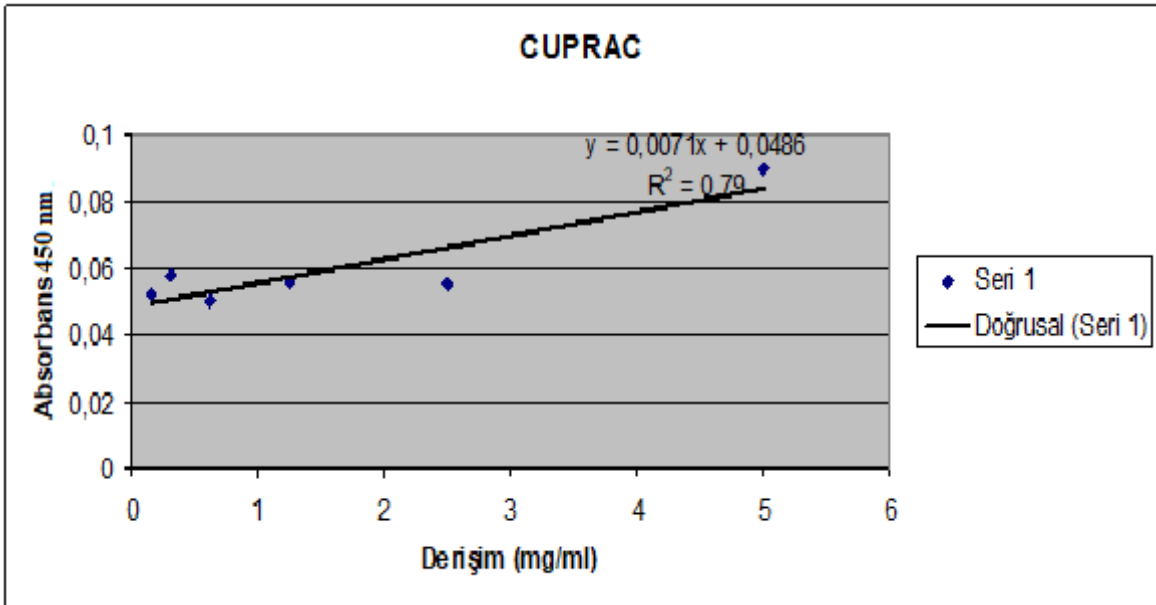
2)



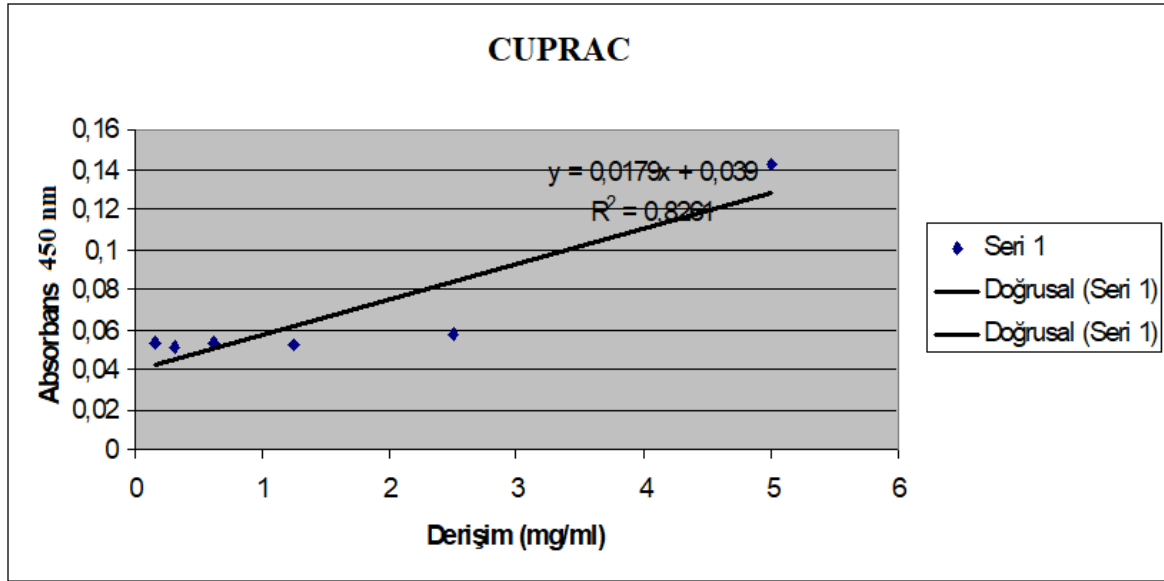
Şekil 4.5. L-4-10 kodlu siyanobakteri türünün Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasitesi; 1,2



Şekil 4.6. L-5-2 kodlu siyanobakteri türünün Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasitesi



Şekil 4.7. L-1-18 kodlu siyanobakteri türünün Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasitesi



Şekil 4.8. L-4-11 kodlu siyanobakteri türünün Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasitesi

Çizelge 4.6. Tüm siyanobakteri ekstraktlarının Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasitesi

Ladik Gölü Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi	
Siyanobakteri türleri	CUPRAC
L-3-25	0,89525515± 0,0662912
L-1-15	1,144688± 0,038368078
L-3-23	0,038368078± 0,624467014
L-3-27	8,952551477± 1,144647653
L-4-10	0,089525515± 0,038368078
L-5-2	0,089525515± 0,624467014
L-1-18	2,302085 ± 0,649619
L-4-11	1,79051 ± 0,594396
L-1-17	1,151042 ± 0,357187
L-6-18	3,517074 ± 0,066044
L-1-16	2,366031 ± 0,955357
L-5-22	2,557872 ± 0,389323

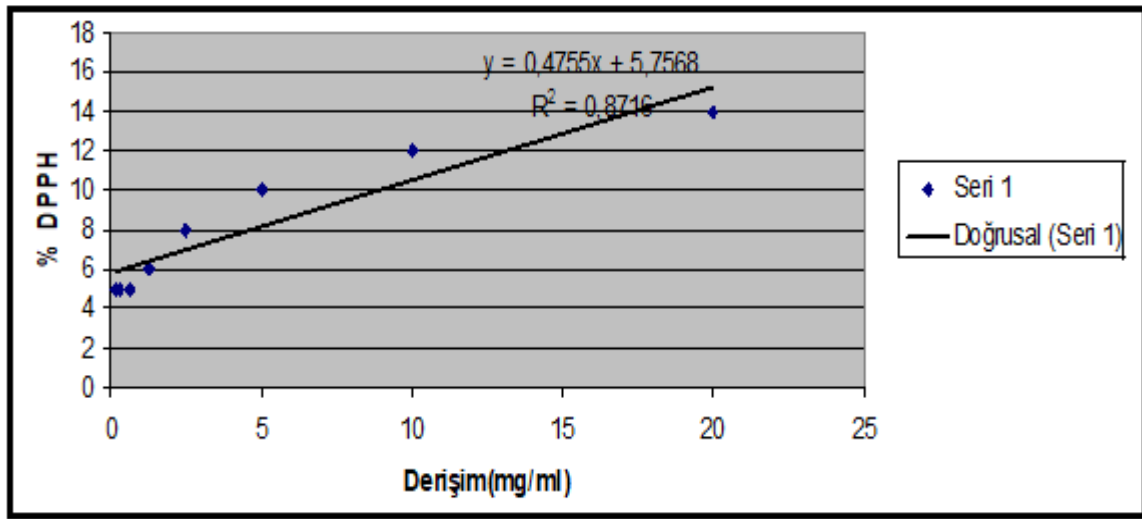
Ladik Gölü'nden izole edilen siyanobakteri türlerinin ekstraktlarının Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite çalışmalarından elde edilen verilere bakıldığında L3-25, L4-10 ve L5-2 kodlu ekstraktların Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasitesi 0,8 µg TE/gr bulunmuştur. L1-15 kodlu ekstraktın 1,14, L-3-23 kodlu 0,03 µg TE/gr, L3-27 kodlu ekstraktın 8,9 µg TE/gr, L1-18 kodlu ekstraktın 2,3, L4-11 kodlu ekstraktın 1,7 µg TE/gr, 16-18 kodlu ekstraktın 3,5 µg TE/gr, 11-16 kodlu ekstraktın 2,3 µg TE/gr, L5-2 kodlu ekstraktın 2,5 µg TE/gr bulunmuştur.

Siyanobakteri türlerinin ekstraktlarının Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasitelerine bakıldığında antioksidan etkisi bulunan ve antioksidan etkisi olmayan türlerin olduğu görülmüştür. Bazı türlerin ekstraktları çok yüksek antioksidan etkiye sahip olduğu tespit edilirken, bazı türlerin ekstraktı düşük antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir.

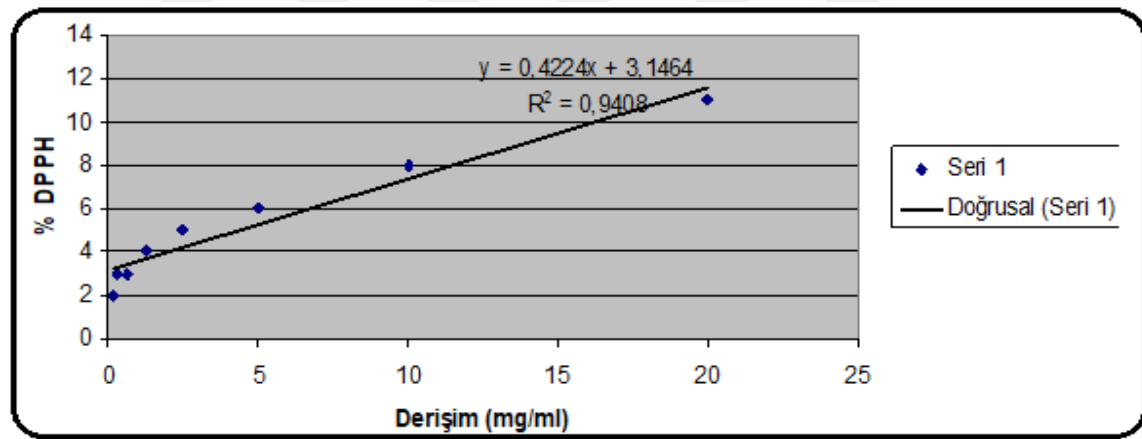
4.6.2. Siyanobakteri ekstaktlarının DPPH radikali süpürme aktiviteleri

Siyanobakteriyel ekstraktlarının antioksidan aktivitelerini belirlemek amacı ile DPPH metodu denenmiştir. Ekstarktların farklı derişimleri (0,15625 – 20 mg/ml) denenmiştir. Şekil 4.9.- Şekil 4.13.'de bazı siyanobakteri ekstraktlarının DPPH radikalini uzaklaştırma sonuçları verilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.7. Tüm siyanobakteri türlerinin ekstraktının DPPH süpürme kapasitesi özetlenmiştir.

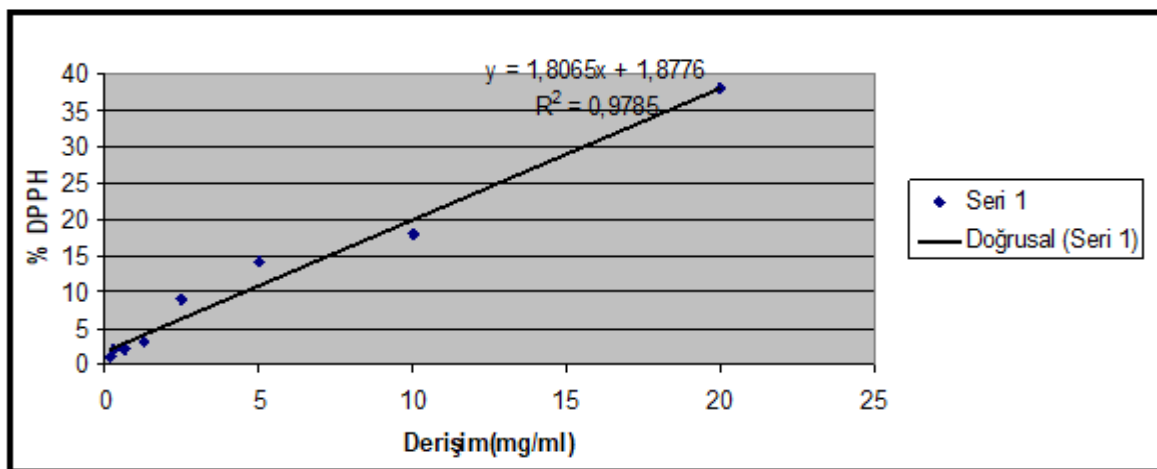
L-3-22, L-1-15, L-3-23, L-3-27 kodlu siyanobakteri ekstraktlarının DPPH süpürme kapasitesi ile ilgili deneysel çalışmalar Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4'de görülmektedir.



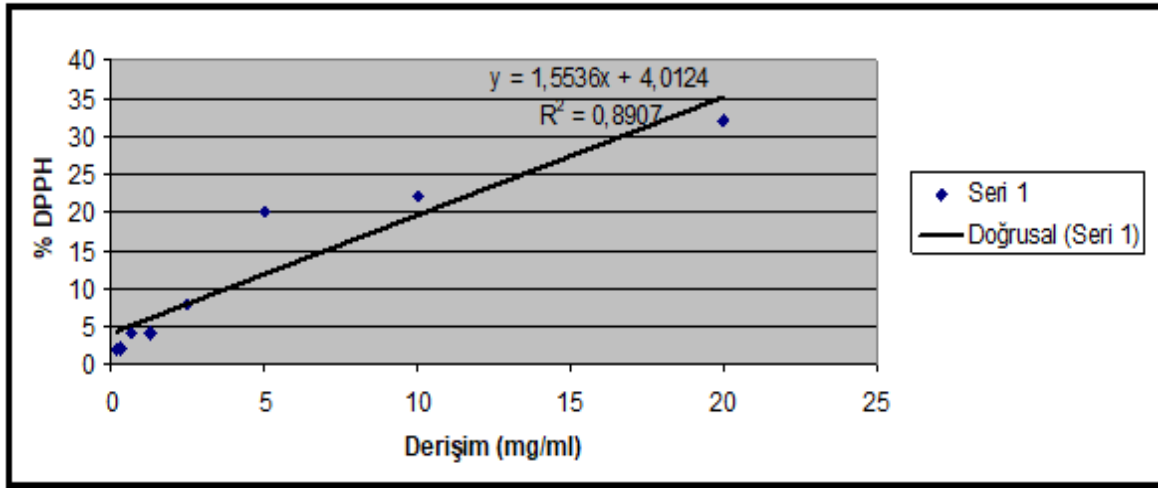
Şekil 4.9. L3-22 kodlu siyanobakteri türünün DPPH süpürme kapasitesi



Şekil 4.10. L-1-15 kodlu siyanobakteri türünün DPPH süpürme kapasitesi

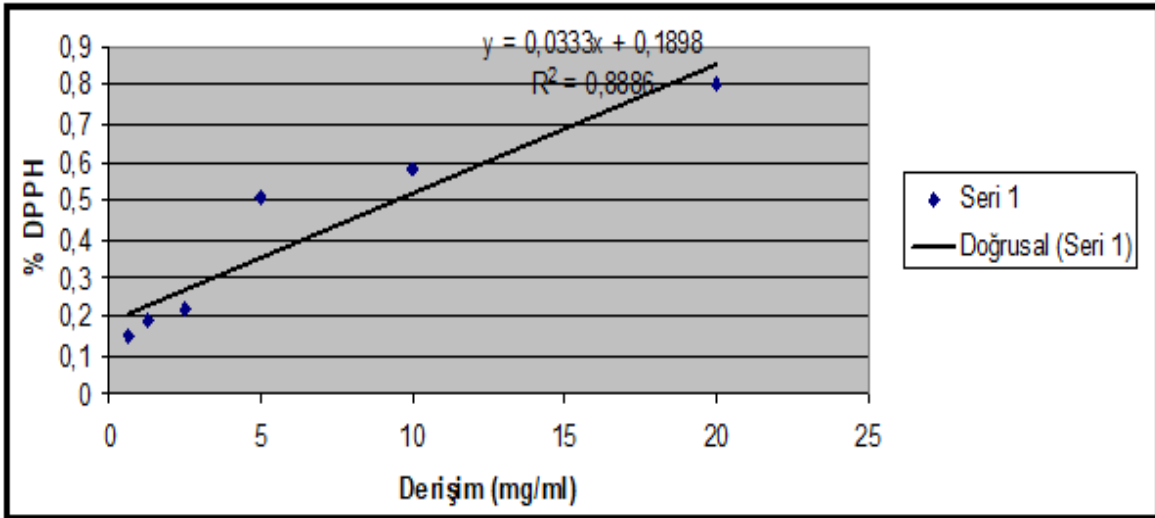


Şekil 4.11. L-3-23 kodlu siyanobakteri türünün DPPH süpürme kapasitesi

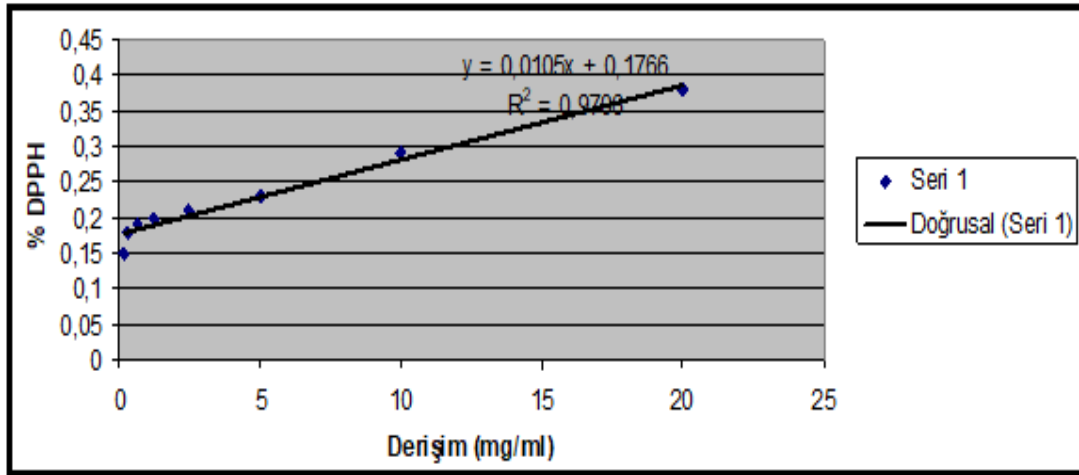


Şekil 4.12. L-3-27 kodlu siyanobakteri türünün DPPH süpürme kapasitesi

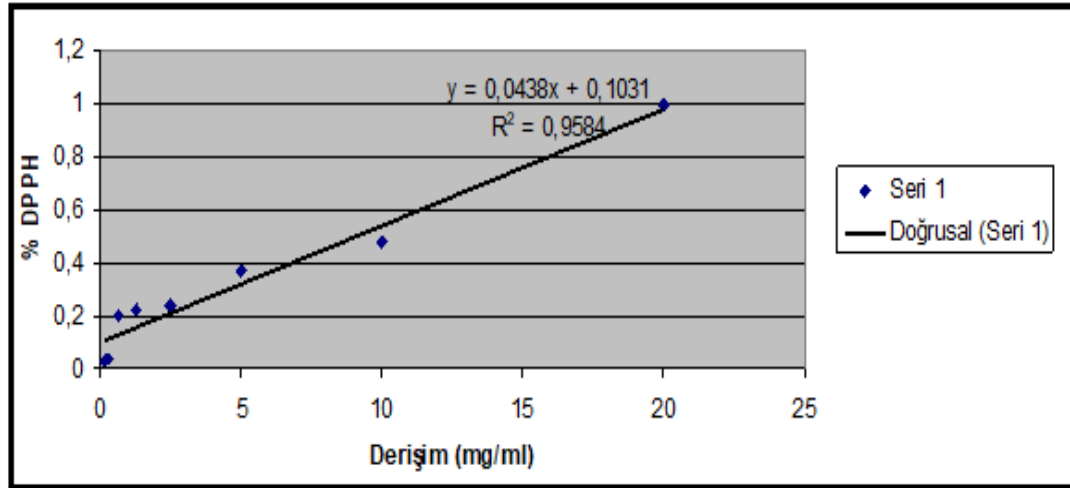
L4-10, L5-2, L1-15, L4-11 kodlu siyanobakteri türünün Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasitesi ile ilgili deneysel çalışmalar Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16'da görülmektedir.



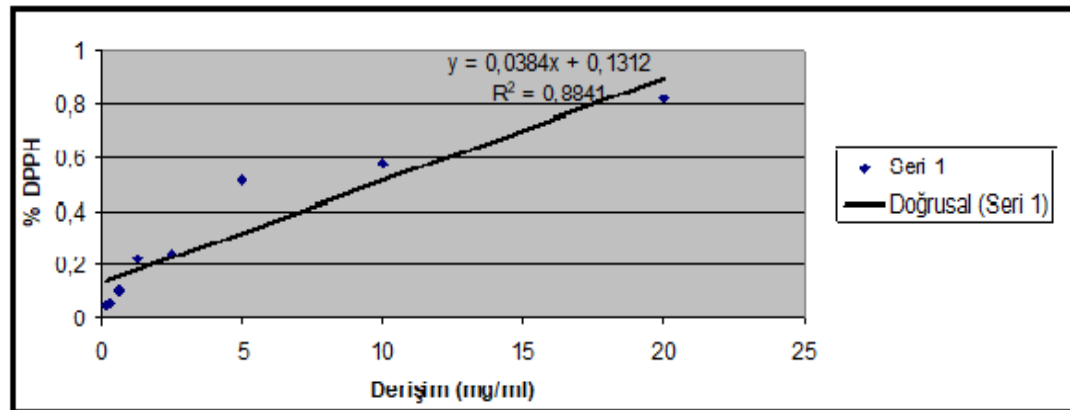
Şekil 4.13. L-4-10 kodlu siyanobakteri türünün DPPH süpürme kapasitesi



Şekil 4.14. L-5-2 kodlu siyanobakteri türünün DPPH süpürme kapasitesi



Şekil 4.15. L-1-18 kodlu siyanobakteri türünün DPPH süpürme kapasitesi



Şekil 4.16. L-4-11 kodlu siyanobakteri türünün DPPH süpürme kapasitesi

Çizelge 4.7. Tüm siyanobakteri türlerinin ekstraktının DPPH süpürme kapasitesi

Ladik Gölü Bakır DPPH antioksidan kapasite yöntemi	
Siyanobakteri türleri	% DPPH
L-3-22	15 ± 0,00338
L-1-15	11 ± 0,003
L-3-23	38 ± 0,03
L-3-27	32 ± 0,012
L-4-10	0,82 ± 0,027
L-5-2	0,38 ± 0,006
L-1-18	0,99 ± 0,066
L-4-11	0,82 ± 0,027
L-1-17	Hesaplanamadı
L-6-18	Hesaplanamadı
L-1-16	Hesaplanamadı
L-5-22	Hesaplanamadı

Çalışmadan elde edilen veriler incelendiğinde, *Synechocystis sp.* türüne ait L3-23 kodlu izolata ait ekstrakt 20 mg/ml konsantrasyonunda % 38 DPPH radikali süpürme aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır. *Phormidesmis sp.* türüne ait L5-2 kodlu izolata ait ekstraktında 20 mg/ml konsantrasyonunda % 38 DPPH radikali süpürme aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır. Yine *Synechocystis sp.* türüne ait L3-27 kodlu izolata ait ekstrakt 20 mg/ml konsantrasyonunda %32, L3-22 kodlu izolata ait ekstrakt %15, L1-15 kodlu ekstrakt %11 DPPH radikali süpürme aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır. (Çizelge 4.7.)

5. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Prokaryotik ve fototrofik yapılarından dolayı başlangıçta algler içerisinde gruplandırılan siyanobakteriler daha sonraları mavi-yeşil alglerin kloroplast ve zar ile çevrili çekirdeklerinin olmadığına anlaşılmışla bakterilerle daha yakın ilişkili oldukları açığa çıkarılmıştır. Siyanobakteriler morfolojik olarak filamentli veya yuvarlak formlarda koloni oluşturan ya da tek hücreli olan mikroorganizmalardır. Organizmaların morfolojik özelliklerine dayalı oluşturulan klasik taksonomi bu canlıların sınıflandırılmasında yetersiz kalmaktadır. Çünkü çevresel koşullar değiştiğinde, morfolojik özellikleri de değişmektedir (Wehr ve Sheath, 2003; Hasler ve ark., 2012).

Siyanobakterilerin taksonomisinde en güvenilir yöntem morfolojik, ekolojik ve moleküler karakterizasyonu bir arada içeren çok yönlü yaklaşımdır. Bu sebeple genetik olarak tanımlanan türler fenotip ve ekolojik veriler ile uyumlu olmalıdır (Hoffmann ve ark., 2005; Komarek, 2010; Komarkova ve ark., 2010). 16S rRNA analizi gibi moleküler metotların kullanımıyla morfolojik özelliklerin genetik olarak kıyaslanmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Birbirlerine morfolojik olarak çok benzeyen Geitlerinema, Microcoleus ve Phormidium gibi filamentli siyanobakterilere ait türler sıklıkla karıştırılmaktadır. Bu durumda türlerin 16S rRNA sekansının benzerliği, morfolojik özellikleri ile kıyaslanarak doğrulanmıştır (Hasler ve ark., 2012). % 95 16S rRNA sekans benzerliği siyanobakteri genuslarını ayırmada kriter olarak kabul edilmektedir (Komarkova, 2010).

Çalışmamızda, Samsun ili Ladik Gölünden 2019 yılı Temmuz ayında örnekleme yapılmıştır. Su örneklerinin pH değeri incelendiğinde nötral (pH 7,9) özellikte olduğu görülmektedir. Sucul sistemlerde yaşayan canlıların yaşamlarını etkileyen, etkenlerin başında gelen pH büyük önem taşımaktadır. Sucul bir sistemde canlıların yaşayabilmesi için bulunması gereken optimum pH değerinin (6,5-8,5) arasında olduğu ifade edilmiş olup, bu değerlerin dışında kalan değerlerde canlıların olumsuz etkilendiği, yaşama ortamı bulamadığı, hatta öldürücü bir etki gösterdiği bildirilmiştir (Goldman ve Horn, 1983). Su örneklerine yapılan ICP-OES Analizi sonucunda Çizelge 4.1. de görüldüğü gibi Ladik Gölü su örneğinin temmuz ayı pH değerinin 7,9 olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık iyon analizleri sonucunda Na iyonu değeri 9,261 mg/L, K iyonu 2,611 mg/L, Mg iyonu 5,292

mg/L, Ca iyonu 37,0 mg/L, Fe iyonu 0,013 mg/L olarak bulunmuştur. Maraşlıoğlu ve ark. (2001) Ladik Gölünde yaptığı çalışmada, yaz ayında yaptıkları örneklemelerde pH değerini 8,1 olarak belirlemişlerdir. Na iyonu değeri 6,9 mg/ml, K iyonu 2,3 mg/ml, Mg iyonu 5,4 mg/ml, Ca iyonu 47 mg/ml olarak belirlemiştir. Sonuçlar karşılaştırıldığında Ca iyon değeri azalırken, Na iyon değerinin yükseldiği görülmektedir. Na değerinin yükselmesi yaz aylarındaki akıştan kaynaklı bir artış olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca sularda, Na iyon değerinin yükselmesi, Ca ve Mg değerinin düşmesinin, iyon değişimiyle açıklanabileceğini belirtmektedir (Tarcan, 2000).

Laboratuvara getirilen su örnekleri mikroskop kullanılarak incelenmiş ve agar ekim yöntemi ile tek tür saflaştırılınca kadar saflaştırma işlemine devam edilmiştir. Saflaştırma sonucunda 16 izolat elde edilmiştir. Yapılan mikroskopik inceleme sonucunda elde edilen izolatların 7 tanesinin filamentli 9 tanesinin tek hücreli olduğu görülmüştür. İzolatların mikroskopik olarak Phormidium, Geitlerinema, Nostocopsis, Aphanocapsa, Geitlerinema, Lyngbya ve Synechococcus cinslerine ait olabilecekleri tespit edilmiştir. Siyanobakteri izolatların mikroskopik incelemesine ek olarak bu izolatlardan elde edilmiş olan genomik DNA ekstraksiyonu sonrasında 16S rRNA PCR amplifikasyonu yapılmıştır. Aynı restriksiyon profillerine sahip olan izolatlar aynı ya da çok benzer 16S rRNA dizisine sahip olacakları düşünüldüğünden, elde edilen PCR ürünleri dizileme basamağından önce restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Böylece dizilenecek olan sayı sınırlandırılmıştır (Sjoling ve Cowan 2003; Taton ve ark. 2003). Çizelge 4.2. de gösterilen 16S rRNA sekanslarına ait BLAST sonuçlarına bakıldığında Grup 1, 2, 5, 6, 8 ve 10'un Synechococcus, Grup 4, 7 ve 9'un Phormidium, Grup 3'ün Geitlerinema cinslerine ait olduğu görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlar, *Synechococcus* cinsinin daha fazla ARDRA grubunu temsil ettiği ve ayrıca bu cinslerin sayı olarak en fazla üyeyi temsil ettiğini göstermektedir.

Çalışmamıza benzer olarak Karan ve ark. (2007) Tokat il sınırlarında yapılan örneklemelerle izole edilen *Chroococcus minitus*, *Geitlerinema carotinosum*, *Oscillatoria limnetica* *Phormidium* sp., *Nostoc linckia*, *Anabaena oryzae* ve *Cylindrospermum* sp. türlerini morfoloji ve 16S rRNA dizilemesi sonucunda tanımlamışlardır. Demirel, Koçyiğit, Sukatar ve Yüksel (2009) Zeytindalı kaplıcaları, Şifne Termal Otel ve Balçova Termal Otel olmak üzere 3 istasyondan elde edilen 4 siyanobakteri türünü laboratuvar

kültür ortamında saflaştırılarak izole etmişler. Daha sonra DNA izolasyonu ile elde edilen DNA'ları PCR'da çoğaltmışlardır. Siyanobakterilerin 16S rRNA gen bölgeleri yine PCR'da çoğaltılarak elde edilen dizi analizi verileri bilgisayar programlarında yorumlayarak filogenetik bakımdan tür tayini yapmışlardır. Yapılan çalışmalar sonucu 3 türün *Geitlerinema sp.*, 1 türün ise kültürü belirlenmemiş tür olduğu belirtilmiştir. Yılmaz, Aslım ve Cansunar (2010) Küçükçekmece Gölünden alınan örnekler Bergey's in Manual of Systematic Bacteriology'e göre ve 16S rRNA'larından elde edilen dizi analizlerinin Gen Bankası verileri ile karşılaştırması sonucunda *Synechocystis sp.* türünü tanımlamıştır. Demirel (2010) İzmir ilindeki Balçova, Zeytinalı, Karakoç, Sifne ve Gülbahçe sıcak su kaynağındaki 10 siyanobakteri türünün 16S rDNA dizisini çıkararak ve bu dizilerin filogenetik ağacı ve GenBank yapılarını oluşturmuştur. Böylelikle termal alanlardaki siyanobakteri kültürlerinden 10 (*Spirulina subsalsa*, *Geitlerinema*, *Leptolyngbya*, *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Pseudoscillatoria*, *Phormidium sp.*) tür izole etmiştir. Başka bir çalışmada Küçükçekmece lagunu, Sapanca, İznik, Manyas ve Taşkısı göllerinden yapılan örneklemeler sonucunda hepatotoksin üreten *Microcystis sp.*, *Planktothrix sp.*, *Nodularia spumigena*, *Anabaenopsis elenkinii*, *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* ve *Cylindrospermopsis raciborskii* türleri izole edilmiş ve 16S rRNA dizi analizi ile tanımlanmıştır (Köker ve ark. 2017). Batu (2017) Mogan Gölü, Beytepe Göleti ve Delice Nehrinde yapılan örneklemelerle izole edilen, *Lyngbya limnetica*, *Aphanocapsa incerta*, *Chroococcus turgidus*, *Chroococcus minimus*, *Phormidium formosum* türlerini morfoloji ve 16S rRNA dizilemesi sonucunda tanımlamışlardır.

Yapılan tüm bu çalışmalar ve bizim çalışmamız göstermektedir ki morfolojiye ve ekolojiye dayalı geleneksel yaklaşım takson tanımlaması yaparken belirsizliklere yol açmaktadır. Bu yöntem kolay ve hızlı olmasından dolayı hala yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu geleneksel yaklaşımlar türleri tek başına bildirmekte olup taksonları arasındaki ilişkinin evrimsel boyutu hakkında bilgi verememektedir. Mikroskoba dayalı yöntemlerle fenotopik çeşitlilik, 16S rRNA'ya dayalı yöntemlerle elde edilen genotopik çeşitliliğe göre çok fazladır. Bu yüzden 16S rRNA gen bilgisi daha güvenilir olmaktadır. Bu bağlamda bizim çalışmamızda mikroskobik olarak yapılan morfolojik incelemede Komarek'in teşhis anahtarı kullanılmıştır. Bu anahtara göre L4-10 türünün *Phormidium*, L-3-23 türünün *Geitlerinema*, L-1-15 türünün *Nostocopsis*, L-1-16 ve L-322 türlerinin *Aphanocapsa*, L-5-2 türünün *Geitlerinema*, L-5-5 türünün *Lyngbya*, L-4-11 ve L-1-17 türlerinin *Synechococcus*

türüne ait olabilecekleri düşünülmüştür. Fakat 16s rRNA 16S rRNA sekanslarına ait BLAST sonuçları incelendiğinde *Nostocopsis* olarak tahmin edilen L-1-15 kodlu izolatın *Synechococcus* türüne ait olduğu tespit edilmiştir. *Aphanocapsa* olarak düşünülen L-1-16, L-3-22 türlerinin *Synechococcus sp.* türüne ait olduğu belirlenmiştir. *Lyngbya* olarak tahmin edilen L-5-5 türünün *Geitlerinema* türüne ait olduğu tespit edilmiştir. Bu veriler mikroskopik yöntemlerin güvenilir olmadığını, türlerin tanımlanmasında moleküler yöntemlerin daha güvenilir olduğunu açıkça göstermektedir.

Çalışmamızın ikinci kısmında farklı ARDRA profillerine sahip 10 izolata yağ asiti analizi uygulanmıştır.

Yapılan analiz sonucunda *Synechocystis sp.* türüne ait olduğu belirlenen L1-15, L1-16, L1-17, L5-2, L3-26, L3-27 izolat numaralı örneklerin içeriğinde sırasıyla %22, %39, %29, %38, %33, %30 ‘Heptadekanoik asit’ olduğu tespit edilmiştir. *Phormidesmis sp.* türüne ait olduğu belirlenen L2-5 ve L4-10 izolat numaralı örneklerin içeriğinde ise en fazla ‘Hekzanoik asit’ bulunmuştur. L2-5 izolat numaralı örnekte %65 oranında bulunurken L4-10 numaralı izolatta %48 oranında bulunduğu görülmüştür. Bu durum benzer morfolojik özellik gösteren türlerin benzer yağ asidi içeriğine sahip olduğunu göstermesi açısından önemlidir.

Çoklu doymamış yağ asitleri olan PUFA (Polyunsaturated fatty acid) ’lar insan sağlığına faydası bildirilmiş olan biyoaktif bileşenlerdendir. İçeriğinde bulunan omega3 ve omega6 gibi çoklu doymamış yağ asitleri insan vücudunda sentezlenememektedir (Ward ve Singh, 2005). Bu canlılardan çoklu doymamış yağ asitleri, polisakkarit, protein, pigment, sterol, vitamin gibi yüksek değerlikli bileşikler elde edilmektedir. Bu bileşikler antioksidan, antitümör, antikoagülan, antiinflamatuvar, anti-viral gibi bağışıklık sistemini düzenleyici bileşenler içermektedir. Bundan dolayı diyabet, oksidasyon, iltihaplanma gibi rahatsızlıkları giderdiği ve yüksek kolesterolü düşürdüğü bilinmektedir (Gargouri ve ark., 2016). Siyanobakteri türü olan *Spirulina*; bitkiler ve hayvanlar tarafından sentezlenmeyen çoklu doymamış yağ asitleri olan γ -linolenik asit (GLA, 18:3 ω 6), *Porphyridium* araziidonik asit (AA, 20:4 ω 6), *Nannochloropsis*, *Phaeodactylum*, *Nitzschia*, *Isochrysis*, *Diacronema* eikosapentaenoik asit (EPA, 20:5 ω 3) ve *Cryptocodinium*, *Schizochytrium* dokosaheksaenoik asit (DHA, 22:6 ω 3) sentezleyebilmektedir (Gouveia ve ark. 2008).

Çalışmamıza benzer olarak Galhano ve ark (2010) Orta-Batı Portekiz Vela Gölü ve Mondego Nehri'nden izole edilmiş Nostocacean, Heterocystous, Cyanobacterial suşların yağ asidi bileşimi incelemişlerdir. Lipid analizini gaz kromatografisi ile taşıyıcı olarak He gazı kullanılarak analiz etmişlerdir. Toplam FAME'leri standart gaz-kromatografisi ile tanımlamışlardır. Farklı yağ asitlerinin konsantrasyonları yüzde alan metodu ile hesaplayarak yağ asitleri analiz edilmiştir. Altı suşun lipidlerinde baskın hücresel FAME'ler palmitik (16: 0), oleik (18: 1ω9) ve α-linolenik (18: 3ω3) olduğu belirlenmiş, birkaç istisna dışında, suşların az miktarda C20 PUFA'lar içerdiği tespit edilmiştir. Yılmaz (2009) Salda Göl'ünden izole edilen *Chlorella sp.* İle Acı Göl'den izole edilen *Oscillatoria amphibia'nın* yağ asidi analizlerini yapmıştır. Yağ asitleri Gaz Kromatografi/Kütle Spektrometresi (GK/KS) analizleriyle yapılmış olup *Chlorella sp.* uçucu yağında bulunan maddeler % 92,21 oranında tanımlanmış, temel bileşenler; nitrik asit, 2-metilpropil ester (% 51,11) ve fitol (% 29,84) olarak belirlenmiştir. O. amphibia uçucu yağında bulunan temel bileşenler; nitrik asit, 2- metilpropil ester (% 22,62) ve sikloheksilheptadekan (% 12,87) olarak belirlenmiştir (İçyüz, 2009). Denizli-Sarayköyde bulunan termal su kaynağından izole edilen siyanobakteri *Pseudanabaena sp.* ve *Synechococcus sp.* Klevenger cihazı kullanılarak hidrodistilasyon ile uçucu yağ ekstrakte edilmiş ve Gaz Kromatografi/ Kütle Spektrometresi (GK/KS) analizleri gerçekleştirilmiştir. *Pseudanabaena sp.* uçucu yağ bileşenlerinde % 99,40 verimle 4 çeşit, *Synechococcus sp.* uçucu yağ bileşenleri toplam bileşiğin % 97,75'inde 5 çeşit madde tanımlanmıştır. GK/KS analizi ile karışık kültürden elde edilen toplam uçucu yağ bileşiğinin % 59,78'ini oluşturan 10 çeşit madde tanımlanmıştır.

Çalışmamızda üçüncü kısmında uygun kültür koşullarında üretilen siyanobakteri biyokütlelerinin hekzan kullanarak elde edilen ekstraktlarının antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Antimikrobiyal direnç tüm dünyada medikal ve zirai alanda ciddi bir sorun olmaya başlamıştır. Bakterilerin antibiyotiklere karşı geliştirdikleri direnç, hayvan ve insan sağlığını ciddi olarak tehdit etmektedir. Direnç mekanizması üzerinde yapılan klinik çalışmalar ile antimikrobiyallerin klinik kullanımları tanımlanabilmiştir (Helms ve ark., 2002). Bakteriyal direncin nasıl ortaya çıktığının bilinmesi; antimikrobiyaller, mikroorganizmalar ve çevre üzerindeki etkileşimin anlaşılmasını sağlayacaktır. Hassas bir bakterinin dirençli duruma gelebilmesinde birçok

yol mevcuttur. Genel olarak, antimikrobiyallere karşı direnç içsel veya dışsal olabilir. İçsel direnç bakteri tarafından taşınan direnç genlerinin varlığına bağlıdır. Dışsal direnç ise, iyileştirici özelliği olmayan antimikrobiyallerin kullanımı ya da ani mutasyonlara bağlı genomdaki değişimler gibi birçok nedene bağlı olabilmektedir. Özellikle tedavi edici dozun altında madde kullanımı, direnç gelişimindeki en yaygın nedenlerden biridir (McDermott ve ark., 2003).

Siyanobakterilerden elde edilen ekstraktların antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek için Mikrodilüsyon Yöntemi ile Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) belirlenmiştir. Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında gram pozitif (+) bakterilerden *Bacillus cereus* ATCC 7064, *Micrococcus luteus* NRL 1018, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, gram negatif (-) bakterilerden *Salmonella typhimurium* LT2, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, mayalardan *Candida albicans* ATCC 14053 ve *Candida krusei* ATCC 34135 kullanılmıştır. Pozitif kontrol çalışmaları ile 10 adet izolatın ekstraktının minimum inhibisyon konsantrasyonu incelenmiştir. Yapılan analizler sonucunda *Geitlerinema sp.* cinsi ile ilişkilendirilen L3-31 kodlu izolatların hiçbir mikroorganizma üzerinde önemli bir antimikrobiyal etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. *Synechocystis sp.* cinsi ile ilişkilendirilen L3-22 ve L3-25 kodlu izolatlarının ekstraktının *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 türüne karşı önemli derecede antimikrobiyal etkiye sahip olduğu (1,5 mg/ml) tespit edilmiştir. Yine *Synechocystis sp.* cinsi ile ilişkilendirilen L1-16 kodlu izolatın *Salmonella typhimurium* LT2 türüne karşı etkili olduğu (1,5 mg/ml) tespit edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite bakımından en etkili siyanobakteri türlerinin L4-11 ve L3-22 kodlu *Synechocystis sp.* *Bacillus cereus* ATCC 7064, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 türlerine karşı etkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu türün antimikrobiyal aktivitelerinin de diğer türlerden yüksek bulunması, günümüzde hem gıda uygulamalarında, hem de ilaç geliştirmede siyanobakteriyel türlerin tercih sebeplerinden birini oluşturması beklenmektedir. Bundan sonraki çalışmaların siyanobakteriyel türlerde çok yönlü biyolojik aktivite çalışmalarına yönelik olması gerekmektedir.

Çalışmamıza benzer olarak. Mundt ve ark. (2003) tarafından *Oscillatoria redekei*'den elde edilen alfa linolenik asidin antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu belirlemiştir. El-Sheekh

ve ark. (2006)'nın *Nostoc muscorum* ile yaptığı çalışmada çözücü olarak kloroform, dietileter, dietilasetat, n-butanol kullanılmış ve kloroform ile hazırlanan ekstraktların en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi, n-butanol ile hazırlanan ekstraktların en düşük antimikrobiyal aktiviteyi gösterdiğini tespit etmiştir. Katırcıoğlu ve ark. (2006)'nın yaptığı çalışmada çözücü olarak metanol, kloroform, aseton, etanol, eter kullanılmış ve etanol ekstraktlarının hem Gram (-) hemde Gram (+) bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bulgusu çalışmamızın sonucu ile benzerlik göstermektedir. Kaushik ve ark. (2008)'nın bir Cyanobacteria olan *Nostoc commune* ile yaptıkları çalışmada test bakterileri olarak pek çok Gram (+) ve Gram (-) bakteri kullanılmış ve en fazla inhibisyon zonu Gram pozitif bir bakteri olan *Staphylococcus aureus*'a karşı gözlemlenmiştir. Bizim çalışmamızda *Synechocystis sp.* türüne ait L3-22 ve L3-25 kodlu izolatlarının elde ettiğimiz ekstraktlarının *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 türüne karşı önemli antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Sonuçlar Kaushik ve ark. (2008)'nın bulgularının bir kısmıyla benzerlik göstermesi açısından önemlidir. Plaza ve ark. (2009)'nın *Synechocystis sp.* ile yaptıkları çalışmada *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 üzerine önemli antimikrobiyal etkisi olduğunu belirlemiştir. Bizim yaptığımız çalışmada da *Synechocystis sp.* ekstraktının *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 üzerine önemli antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu bakımdan çalışmamız Plaza ve ark. yaptığı çalışmayla uyushmaktadır. Kaushik ve ark. (2009)'nın *Anabaena variabilis* ile yaptığı çalışmada duyarlı mikroorganizmaların *S. aureus* MTCC-740 ve *E. coli* MTCC-739 olduğu açıklanmıştır. Sethubati ve Prabu (2010)'nın *Oscillatoria sp.*, *Phormidium sp.* ve *Lyngbya majuscula* siyanobakterileriyle yaptığı çalışmada; en yüksek aktiviteyi *Oscillatoria sp.*, en düşük aktiviteyi ise *L. majuscula* ile hazırlanan ekstraktın gösterdiği tesbit edilmiştir. Sánchez-Saavedra ve ark. (2010)'nın yaptığı çalışmada ekstraktların tümünün *Bacillus subtilis*'in gelişimini inhibe ettiğini belirlemişlerdir. Bizim çalışmamızda da L3-22 ve L4-11 kodlu izolatların yüksek antimikrobiyal etki gösterdiğinin tespit edilmesi benzerlik göstermektedir. Demiriz ve ark. (2011) *Oscillatoria limosa*, *O. limnetica*, *Phormidium tenue*, *Chlorella vulgaris*, *Spirulina major* ile siyanobakterilerin antibakteriyal fonksiyonu çalışmasında *O. limosa*'nın etanol ekstraktı *Salmonella enteritidis* ATCC 13076' e karşı en yüksek aktiviteyi göstermiştir. *Staphylococcus aureus* ATCC 19213 ve *Bacillus subtilis* ATCC 6633 etanol ekstraktına karşı direnç göstermiştir. *Staphylococcus aureus* ATCC 19213 'a karşı en yüksek aktiviteyi, *O. limnetica*'nın tampon ekstraktı göstermiştir. *Escherichia coli* O157:H7'nin en dirençli mikroorganizma

olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda en dirençli mikroorganizma *Escherichia coli* tespit edilmiştir, bu bakımdan bulgular benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızın dördüncü kısmında antioksidan aktivite çalışmalarında DPPH radikalleri süpürme aktivitesi ve CUPRAC yönteminden yararlanılmıştır.

DPPH radikal giderme aktivitesi metodu, gerek doğal gerekse sentetik özellikteki maddelerin antioksidan özelliklerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan, tekrarlanabilirliği yüksek, basit ve hızlı sonuç veren bir yöntemdir (Brand-Williams ve ark., 1995; Scalzo, 2008). Çalışmamızda, hekzanda hazırlanan çözeltisinin farklı konsantrasyonlarının (0,695–20 mg/ml) DPPH radikali üzerine etkisi denenmiştir. Çalışmadan elde edilen veriler incelendiğinde *Synechocystis sp.* türüne ait L3-23 kodlu izolata ait ekstrakt % 38, L3-27 kodlu izolata ait ekstrakt % 32, L3-22 kodlu izolata ait ekstrakt % 15, L1-15 kodlu ekstrakt % 11, *Phormidesmis sp.* türüne ait L5-2 kodlu izolata ait ekstrakt % 38 DPPH radikali süpürme aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır. Ekstrakt konsantrasyonu yükseldikçe DPPH süpürme aktivitesi yükselmiş, ekstrakt konsantrasyonu düştükçe aktivite de düşmüştür.

Tütem ve Apak (1991) tarafından ılımlı bir oksidan olarak çeşitli indirgen ajanların tayini için kullanılabileceği önerilen bis (neokuprein) bakır (II) klorür reaktifi, sistein (Tütem ve Apak, 1991), E vitamini (Tütem ve ark., 1997) ve askorbik asit (Güçlü ve ark., 2005)' in tayininde başarı ile kullanmıştır. Bu yöntem daha sonra kuprik iyonu indirgeme potansiyelini ölçmek amacıyla, bitki ekstraktların ve insan serumunda (Apak ve ark., 2004; Apak ve ark., 2005) denenmiş ve bakır iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity: CUPRAC) olarak isimlendirilmiştir. Lissi ve ark., (2000) *Spirulina sp.*'den elde edilen fikosiyaninin, troloks antioksidanından yaklaşık olarak 16 kat askorbik asit antioksidanından ise yaklaşık olarak 20 kat daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda tüm siyanobakteri türlerinin hekzan ekstraktının Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite sonuçları incelendiğinde en yüksek Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite sonucunun *Synechocystis sp.* türüne ait L1-14, L3-25 kodlu ekstraktlarda olduğu ve bu değer 0,03 µg TE/gr olduğu saptanmıştır. En düşük Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite ise *Synechocystis sp.* türüne ait L3-27 kodlu ekstraktın 8,9 µg TE/gr olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak değerlendirildiğinde, bazı siyanobakteri ekstraktlarının antioksidan aktiviteye sahip oldukları belirlenmiş olup, DPPH süpürme aktivitesinin en iyi iki sonucun *Synechocystis sp.* türüne ait L3-23 kodlu izolata ait ekstrakt ve *Geitlerinema sp.* türüne ait L5-2 kodlu izolata ait olduğu görülmüştür. Buna ilave olarak Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasitesinin en yüksek olduğu sonucun *Synechocystis sp.* türüne ait L3-27 kodlu ekstrakta ait olduğu tespit edilmiştir. Bu

Bundan sonraki çalışmaların siyanobakteriyel türlerde çok yönlü biyolojik aktivite çalışmalarına yönelik olması gerekmektedir. Siyanobakteriyel özütlerin, kimyasal bileşenleri aydınlatılarak, etken maddenin izole edilip, fonksiyonel grupların ilave edilmesiyle, bu bileşenlerin aktivitelerinin hangi derecede olduğunun araştırılması gerekmektedir. Ayrıca bu bileşenlerin hedeflerinin ve mekanizmalarının belirlenmesine de ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Akbari, M., Ostadmohammadi, V., Lankarani, K. B., Tabrizi, R., Kolahdooz, F., Heydari, S.T., ... & Asemi, Z. (2018). The effects of vitamin D supplementation on biomarkers of inflammation and oxidative stress among women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Hormone and Metabolic Research*, 50(04), 271-279.
- AKYIL, S., İltar, I., Mehmet, K. O. Ç., & Kaymak-Ertekin, F. (2016). Alglerden elde edilen yüksek değerlikli bileşiklerin biyoaktif/biyolojik uygulama alanları. *Akademik Gıda*, 14(4), 418-423.
- Akyüz, E. (2007). *Polygonum bistorta ssp. carneum bitki ekstraktlarının kromatografik yöntemlerle kimyasal bileşiminin belirlenmesi ve antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri* (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Alberts, B., Johnson, A., Walter, P., Lewis, J., Raff, M., & Roberts, K. (2008). Molecular cell biology. *New York: Garland Science*.
- Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59(1), 143-169.
- Ambudkar, S. V., Abelson, J. N., Gottesman, M. M., & Simon, M. I. (Eds.). (1998). *ABC Transporters: Biochemical, cellular, and molecular aspects* (Vol. 292). Gulf Professional Publishing.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E., & Erça, E. (2006). The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 57(5-6), 292-304.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E. ve Altun, M. (2005) Total antioxidant capacity assay of human serum using copper (II)-neocuproine as chromogenic oxidant: the CUPRAC method, *Free Radical Research*, 39: 949-961.
- Aytuna, H. (2004). *Katı Faz Fermantasyon Yöntemiyle Küflerden Lipit Üretimi* (Doctoral dissertation, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Baublis, A. J., Clydesdale, F. M., & Decker, E. A. (2000). Antioxidants in wheat-based breakfast cereals. *Cereal Foods World*, 45(2), 71-74.
- Bilaloğlu, G. V., & Harmandar, M. (1999). Flavonoidler. *Aktif Yayınevi, İstanbul*, 334-354.

- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911-917.
- Boone, D.R., Casstenholz, R.W. ve Garrity, G.M. (eds). (2001), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd. End. Springer. New York.
- Boutte, C., Grubisic, S., Balthasart, P., & Wilmotte, A. (2006). Testing of primers for the study of cyanobacterial molecular diversity by DGGE. *Journal of Microbiological Methods*, 65(3), 542-550.
- Boutte, C., Komárková, J., Grubisic, S., Znachor, P., Bataille, A., Zapomělová, E., ... & Wilmotte, A. (2005). A polyphasic approach to assess the cyanobacterial diversity of summer samples from Czech reservoirs. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes*, 177-195.
- Boutte, C., Komárková, J., Grubisic, S., Znachor, P., Bataille, A., Zapomělová, E., ... & Wilmotte, A. (2005). A polyphasic approach to assess the cyanobacterial diversity of summer samples from Czech reservoirs. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes*, 177-195.
- Boyer, S. L., Flechtner, V. R., & Johansen, J. R. (2001). Is the 16S–23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in cyanobacteria. *Molecular biology and evolution*, 18(6), 1057-1069.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Briand, E., Gugger, M., François, J. C., Bernard, C., Humbert, J. F., & Quiblier, C. (2008). Temporal variations in the dynamics of potentially microcystin-producing strains in a bloom-forming *Planktothrix agardhii* (cyanobacterium) population. *Applied and environmental microbiology*, 74(12), 3839-3848.
- Brittain, S., Mohamed, Z. A., Wang, J., Lehmann, V. K. B., Carmichael, W. W., & Rinehart, K. L. (2000). Isolation and characterization of microcystins from a River Nile strain of *Oscillatoria tenuis* Agardh ex Gomont. *Toxicon*, 38(12), 1759-1771.
- Bryant, A.D. (1994), *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Calusinka, M. (2005), Diversity of mat-forming cyanobacteria from meltwaters on Livingstone Island, Antarctic Peninsula: A molecular and morphological approach, Master's Thesis, University of Liege, Belgium.
- Campbell, N., A., Reece J., B., 2000. 'Biyoloji', Palme Yayıncılık, Ankara.
- Carmichael, W. W. (1992). A status report of planktonic cyanobacteria (blue-green algae) and their toxins. *United States Environmental Protection Agency*, 600, 32-33.

- Carmichael, W. W. (1997). The cyanotoxins. In *Advances in botanical research* (Vol. 27, pp. 211-256). Academic Press.
- Carmichael, W. W., Ownby, C. L., & Odell, G. V. (1989). Freshwater Cyanobacteria (blue-green algae) toxins, natural toxins, Pharmacology and Terapeutics, ed, 3- 16.
- Carpenter, E. J., Foster, R. A., Rai, A. N., Bergman, B., & Rasmussen, U. (2002). Cyanobacteria in symbiosis.
- Casamatta, D. A., & Hašler, P. (2016). Blue-green algae (Cyanobacteria) in rivers. In *River Algae* (pp. 5-34). Springer, Cham.
- Case, R. J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W. F., & Kjelleberg, S. (2007). Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and environmental microbiology*, 73(1), 278-288.
- Cirik, S., Gökpınar, Ş., 2008. Plankton Bilgisi ve Kültürü. Ege Üniversitesi Yayınları, Su Ürünleri Fakültesi, 5. Baskı, Yayın No: 47, 274 s, Bornova- İzmir.
- Codd, G. A. (1995). Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance. *Water Science and Technology*, 32(4), 149-156.
- Çalışkan, S. (2001). Bazı makrofungus türlerinin antimikrobiyal etkisi üzerine araştırmalar (Doctoral dissertation, Pamukkale Üniversitesi).
- Davis, T. W., Berry, D. L., Boyer, G. L., & Gobler, C. J. (2009). The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of Microcystis during cyanobacteria blooms. *Harmful algae*, 8(5), 715-725.
- Demiriz, T., Cokmus, C., & Pabuccu, K. (2011). Antimicrobial activity of some algal species belonging to cyanobacteria and chlorophyta. *Asian Journal of Chemistry*, 23(3), 1384.
- Drugă, B., Bica, A., Coman, C., Nicoară, A., & Dragoş, N. (2009). NEW PRIMER COMBINATION FOR SEQUENCING THE CYANOBACTERIAL 16S rRNA GENE. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 14(1).
- Duy, T. N., Lam, P. K., Shaw, G. R., & Connell, D. W. (2000). Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 113-185.
- El-Sheekh, M. M., Osman, M. E., Dyab, M. A., & Amer, M. S. (2006). Production and characterization of antimicrobial active substance from the cyanobacterium Nostoc muscorum. *Environmental toxicology and pharmacology*, 21(1), 42-50.
- Erdal, P., & Ökmen, G. (2013). Gıdalarda kullanılan mikrobiyal kaynaklı pigmentler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 6(2), 56-68.

- Gargouri, M., Magné, C., & El Feki, A. (2016). Hyperglycemia, oxidative stress, liver damage and dysfunction in alloxan-induced diabetic rat are prevented by Spirulina supplementation. *Nutrition research*, 36(11), 1255-1268.
- Goldman C. and Horn AC., (1983). *Limnology*. Mc Graw International Book Company, 576.
- Goodman, T. K. (1999). Human health aspects. *Toxic Cyanobacteria in Water, A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*.
- Gökpınar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., & Durmaz, Y. (2006). Algal Antioksidanlar. *Su Ürünleri Dergisi*, 23(1), 85-89.
- Graham, J. L., Jones, J. R., Jones, S. B., Downing, J. A., & Clevenger, T. E. (2004). Environmental factors influencing microcystin distribution and concentration in the Midwestern United States. *Water research*, 38(20), 4395-4404.
- Graham, L. E., Graham, J. M., & Wilcox, L. W. (2004). Bitki Biyolojisi (Plant Biology). *Çeviri Editörü: Işık, K., Palme Yayıncılık, Ankara*.
- Guerrero, R. (1999). The Phototrophic Prokaryotes. Günter A. Peschek, Wolfgang Löffelhardt, Georg Schmetterer (eds). *International Microbiology*, 2(4), 279-280.
- Gugger, M., Lyra, C., Suominen, I., Tsitko, I., Humbert, J. F., Salkinoja-Salonen, M. S., & Sivonen, K. (2002). Cellular fatty acids as chemotaxonomic markers of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Nostoc* and *Planktothrix* (cyanobacteria). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(3), 1007-1015.
- Guiry, M. D. (2010). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National university of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org/>.
- Güçlü, K., Sözgen, K., Tütem, E., Özyürek, M., & Apak, R. (2005). Spectrophotometric determination of ascorbic acid using copper (II)–neocuproine reagent in beverages and pharmaceuticals. *Talanta*, 65(5), 1226-1232.
- Güner, H. (2006). *Tohumusuz bitkiler sistematigi: II. cilt: mantarlar ve likenler*. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, Altıncı Baskı, 245 sayfa, 2006.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1990). The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of biochemistry and biophysics*, 280(1), 1-8.
- Hasler, C. M. (2002). Functional foods: benefits, concerns and challenges—a position paper from the American Council on Science and Health. *The Journal of nutrition*, 132(12), 3772-3781.
- Helms, M., Vastrup, P., Gerner-Smidt, P., & Mølbak, K. (2002). Excess mortality associated with antimicrobial drug-resistant *Salmonella* Typhimurium. *Emerging infectious diseases*, 8(5), 490.

- Hermansky, S. J., Wolff, S. N., & Stohs, S. J. (1990). Use of rifampin as an effective chemoprotectant and antidote against microcystin-LR toxicity. *Pharmacology*, 41(4), 231-236.
- Herrero, A., Muro-Pastor, A. M., & Flores, E. (2001). Nitrogen control in cyanobacteria. *Journal of bacteriology*, 183(2), 411-425.
- Hitzfeld, B. C., Höger, S. J., & Dietrich, D. R. (2000). Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment. *Environmental health perspectives*, 108(suppl 1), 113-122.
- Hoffmann, L., Komárek, J., & Kaštovský, J. (2005). System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) state in 2004. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes*, 95-115.
- Holmes, A. H., Moore, L. S., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., ... & Piddock, L. J. (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet*, 387(10014), 176-187.
- Humbert, J. F. (2009). Toxins of cyanobacteria. In *Handbook of toxicology of chemical warfare agents* (pp. 371-379). Academic Press: 371-379.
- Hyde, E. G., & Carmichael, W. W. (1991). Anatoxin - a (s), a naturally occurring organophosphate, is an irreversible active site - directed inhibitor of acetylcholinesterase (EC 3.1. 1.7). *Journal of Biochemical Toxicology*, 6(3), 195-201.
- Iteman, I., Rippka, R., de Marsac, N. T., & Herdman, M. (2002). rDNA analyses of planktonic heterocystous cyanobacteria, including members of the genera *Anabaenopsis* and *Cyanospira*. The GenBank accession numbers of the 16S rDNA gene sequences reported in this paper are AY038032–AY038037. *Microbiology*, 148(2), 481-496.
- Jian-Feng, N. I. U., Guang-Ce, W. A. N. G., Lin, X. Z., & Zhou, B. C. (2007). Large-scale recovery of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* using expanded bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography B*, 850(1-2), 267-276.
- Kaebernick, M., & Neilan, B. A. (2001). Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS microbiology ecology*, 35(1), 1-9.
- Katircioglu, H., Beyatli, Y., Aslim, B., Yüksekdağ, Z., & Atici, T. (2006). Screening for antimicrobial agent production of some freshwater. *Microbiology*, 2(2).
- Kaushik, P., Chauhan, A., Chauhan, G., & Goyal, P. (2008). Evaluation of *Nostoc commune* for potential antibacterial activity and UV-HPLC analysis of methanol extract. *Int J Microbiol*, 5(1), 1-5.
- Kaushik, P., Chauhan, A., Chauhan, G., & Goyal, P. (2009). Antibacterial potential and UV-HPLC analysis of laboratory-grown culture of *Anabaena variabilis*. *International Journal of Food Safety*, 11, 11-18.

- Kolbert, C.P., Paul, N.R., Hopkins, M., Lynch, D.T., Germer, J.J., O'Sullivan C.E., Trampuz, A., Patel, R., 2006. *Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında Bakterilerin İdentifikasyonunda 16S Ribozomal DNA Dizi Analizi. Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamaları*, Bölüm 29, Ed: Persing, D.H., Palme Yayıncılık, Ankara, 361-377.
- Komárek, J. (2010). Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). *Hydrobiologia*, 639(1), 245-259.
- Komárková, J., Jezberová, J., Komárek, O., & Zapomělová, E. (2010). Variability of *Chroococcus* (Cyanobacteria) morphospecies with regard to phylogenetic relationships. *Hydrobiologia*, 639(1), 69-83.
- Krüger, G. H. J., De Wet, H., Kock, J. L. F., & Pieterse, A. J. H. (1995). Fatty acid composition as a taxonomic characteristic for *Microcystis* and other coccoid cyanobacteria (blue-green alga) isolates. *Hydrobiologia*, 308(2), 145-151.
- Kumaran, A. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food chemistry*, 97(1), 109-114.
- Lee, R.E., 2008. Phycology. Cambridge University Press, 547 p, New York, USA.
- Leflaive, J. and Ten-hage, L., 2007. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshwater Biology*. 52, 199–214.
- Lissi, E. A., Pizarro, M., Aspee, A., & Romay, C. (2000). Kinetics of phycocyanine bilin groups destruction by peroxy radicals. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(7), 1051–1055.
- Lyra, C., Suomalainen, S., Gugger, M., Vezie, C., Sundman, P., Paulin, L., & Sivonen, K. (2001). Molecular characterization of planktic cyanobacteria of *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* and *Planktothrix* genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(2), 513-526.
- Mackay, M. A., Norton, R. S., & Borowitzka, L. J. (1983). Marine blue-green algae have a unique osmoregulatory system. *Marine Biology*, 73(3), 301-307.
- Maraşlıoğlu, F. (2001). Ladik Gölü (Ladik-Samsun-Türkiye) Fitoplanktonu ve Kıyı Bölgesi Algleri Üzerinde Bir Araştırma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi. *Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 61.
- Maraşlıoğlu, F., Soylu, E. N., & Gönüloğlu, A. (2005). Seasonal variation of the phytoplankton of Lake Ladik Samsun, Turkey. *Journal of Freshwater Ecology*, 20(3), 549-553.
- Martins R., Ramos M, Herfindal L., Sousa J., Skarven K and Vasconcelos V., 'Antimicrobial and Cytotoxic Assessment of Marine Cyanobacteria - *Synechocystis* and *Synechococcus*', *Marine Drugs*, 6(1): 1-11 (2008).

- Mc Dermott, P. F., Walker, R. D., & White, D. G. (2003). Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. *International journal of toxicology*, 22(2), 135-143.
- Mundt, S., Kreitlow, S., & Jansen, R. (2003). Fatty acids with antibacterial activity from the cyanobacterium *Oscillatoria redekei* HUB 051. *Journal of Applied Phycology*, 15(2), 263-267.
- Murray, RK., Granner, DK., Mayes, PA., (2000). Harper's biochemistry. McGraw-Hill Press, USA, 25.
- Namiki, M. (1990). Antioxidants/antimutagens in food. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 29(4), 273-300.
- Negri, A. P., & Jones, G. J. (1995). Bioaccumulation of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins from the cyanobacterium *Anabaena circinalis* by the freshwater mussel *Alathyria condola*. *Toxicon*, 33(5), 667-678.
- 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., & 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.
- Neilan, B. A., Leigh, D. A., Rapley, E., & McDonald, B. L. (1994). Microsatellite genome screening: rapid non-denaturing, non-isotopic dinucleotide repeat analysis. *Biotechniques*, 17(4), 708-710.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F., & Muyzer, G. (1997). PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and environmental microbiology*, 63(8), 3327-3332.
- Ozdemir, G., Ulku Karabay, N., Dalay, M. C., & Pazarbasi, B. (2004). Antibacterial activity of volatile component and various extracts of *Spirulina platensis*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 18(9), 754-757.
- Öner, M., (2001). Genel Mikrobiyoloji, Ege Üni. Fen Fak. Kitapları Serisi No: 94,55.
- Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., Reina, G. G. B., Herrero, M., Señoráns, F. J., & Ibáñez, E. (2010). Screening for bioactive compounds from algae. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 51(2), 450-455.
- Pradedova, E. V., Isheeva, O. D., & Salyaev, R. K. (2011). Classification of the antioxidant defense system as the ground for reasonable organization of experimental studies of the oxidative stress in plants. *Russian Journal of plant physiology*, 58(2), 210-217.

- Saran, B., & Karahan, Z. C. (2010). Antimikrobiyal ajanlara genel bakış. *Turk Urol Sem*, 1, 216-20.
- Sharma, N., Gruszeński, H. A., Park, S. W., Holm, D. G., & Vivanco, J. M. (2004). Purification of an isoform of patatin with antimicrobial activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(7-8), 647-655.
- Sivonen, K. (1990). Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Applied and environmental microbiology*, 56(9), 2658-2666.
- Sivonen, K., & Jones, G. (2009). Cyanobacterial toxins. *Encyclopedia of microbiology*, 290, 307.
- Bartram, J., Spon Press, London and New York, pp: 26-68.
- Sjors, V. I., & Alessandro, F. (2010). Algae based biofuels, Applications and coproducts. *Environment and natural resources management working paper. Environment climate change. Bioenergy monitoring and assessment*.
- Skrinjar, M., Kolar, M.H., Jelsek, N., Hras, A.R., Bezjak, M., Knez, Z. 2007. Application of HPLC with electrochemical detection for the determination of low levels of antioxidants. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 539–545.
- Sompong, U., Hawkins, P. R., Besley, C., & Peerapornpisal, Y. (2005). The distribution of cyanobacteria across physical and chemical gradients in hot springs in northern Thailand. *FEMS microbiology ecology*, 52(3), 365-376.
- Sousa, I., Gouveia, L., Batista, A. P., Raymundo, A., & Bandarra, N. M. (2008). Microalgae in novel food products. *Food chemistry research developments*, 75-112.
- Sousa, I., Gouveia, L., Batista, A. P., Raymundo, A., & Bandarra, N. M. (2008). Microalgae in novel food products. *Food chemistry research developments*, 75-112.
- Stewart, WDP., Rowell, P., Kerby, NW., Reed, RH.and Machray, GC., (1987). N₂-Fixing Cyanobacteria and Their Potential Applications. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 317, 245-58.
- Talaro, K., Talaro, A. (1993). Chapter 10. Brown, Wm. C. P. Foundations in Microbiology, 296- 310.
- Tarcan, G., Filiz, S., & Gemici, U. (2000, May). Geology and geochemistry of the Salihli geothermal fields, Turkey. In *Proceedings World Geothermal Congress* (pp. 1829-1834).
- Taşkin, E., Çaki, Z., Öztürk, M., Taşkin, E., & Kurt, O. (2010). Antimicrobial and antitumoural activities of marine algae. *Review of Hydrobiology*, 3(1), 37-50.

- Taton, A., Grubisic, S., Balthasart, P., Hodgson, D. A., Laybourn-Parry, J., & Wilmotte, A. (2006). Biogeographical distribution and ecological ranges of benthic cyanobacteria in East Antarctic lakes. *FEMS microbiology ecology*, 57(2), 272-289.
- Taton, A., Grubisic, S., Brambilla, E., De Wit, R., & Wilmotte, A. (2003). Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach. *Applied and environmental microbiology*, 69(9), 5157-5169.
- Tomaselli, L. (1997). Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira* (Spirulina) maxima and *Arthrospira* (Spirulina) platensis. *Spirulina platensis (Arthrospira), Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology*, 1-16.
- Tütem, E., Apak, R., Günaydı, E., & Sözgen, K. (1997). Spectrophotometric determination of vitamin E (α -tocopherol) using copper (II)-neocuproine reagent. *Talanta*, 44(2), 249-255.
- Van der Merwe, D. (2015). Cyanobacterial (blue-green algae) toxins: *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, 2nd, Ed.: Gupta, R.C., Academic Press, Boston, MA, USA, 421-429.
- Ward, O. P., & Singh, A. (2005). Omega-3/6 fatty acids: alternative sources of production. *Process biochemistry*, 40(12), 3627-3652.
- Warr, S. R. C., Reed, R. H., & Stewart, W. D. P. (1984). Physiological responses of *Nodularia harveyana* to osmotic stress. *Marine biology*, 79(1), 21-26.
- Wehr, J. D. (2003). Freshwater habitats of algae. *Freshwater Algae of North America-Ecology and Classification*, 11-57.
- Whitton, A. ve Potts, M. (2000), *The Ecology of Cyanobacteria*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Willame, R., Boutte, C., Grubisic, S., Wilmotte, A., Komárek, J., & Hoffmann, L. (2006). Morphological and molecular characterization of planktonic cyanobacteria from Belgium and Luxembourg 1. *Journal of Phycology*, 42(6), 1312-1332.
- Yılmaz, H. K., ve Duru, M. D. (2011). Syanobakteri *Spirulina platensis*' in besin kimyası ve mikrobiyolojisi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 4(1), 31-43.
- Yılmaz, M., Philips, E. J., Szabo, N. J., & Badylak, S. (2008). A comparative study of Florida strains of *Cylindrospermopsis* and *Aphanizomenon* for cylindrospermopsin production. *Toxicon*, 51(1), 130-139.
- Zgoda, J. R., & Porter, J. R. (2001). A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. *Pharmaceutical Biology*, 39(3), 221-225.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı : Melike Karataş Yıldız

Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet Yılı
Lisans	Amasya Üniversitesi	2013
Yüksek Lisans	Amasya Üniversitesi	-

İş Deneyimi/Yıl	Çalıştığı Yer	Görevi
2019-	Sınav Koleji/ Amasya	Fizik Öğretmeni
2015- 2021	Limit Çocuk Kulübü/ Amasya	Kurucu Müdür
2014- 2015	Özel Sınav Okulları / İstanbul	Fen ve Teknoloji Öğretmeni
2013-2014	Açı Dershanesi/ Amasya	Fen ve Teknoloji Öğretmeni

Bilimsel Faaliyetler

1) Karataş Yıldız, M., İdil, Ö., (2020, 22-23 Ağustos). Lâdik Gölü Siyanobakteri Çeşitliliği Ve Yağ Asit Profillerinin Belirlenmesi. 8. Uluslararası Fen ve Mühendislik Bilimleri Araştırmaları Kongresi (UBAK), Çorum