

T.C  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



AKGÖL GÖLÜNDE (TERME, SAMSUN) TOKSİN ÜRETEN SİYANOBAKTERİ  
KOMÜNİTESİNİN METAGENOMİK ANALİZİ

Yasemin VARLI

YÜKSEK LİSANS TEZİ



T.C  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AKGÖL GÖLÜNDE (TERME, SAMSUN) TOKSİN ÜRETEN SİYANOBAKTERİ  
KOMÜNİTESİNİN METAGENOMİK ANALİZİ

YASEMİN VARLI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SAMSUN  
2017

Her hakkı saklıdır.



## TEZ ONAYI

Yasemin Varlı tarafından hazırlanan “Akgöl Gölünde (Terme, Samsun) Toksin Üreten Siyanobakteri Komünitesinin Metagenomik Analizi” adlı tez çalışması 11/07/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** Doç. Dr. Haydar KARAKAYA  
Biyoloji Anabilim Dalı

### Jüri Üyeleri

**Başkan** Prof. Dr. Kamil IŞIK  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Üye** Doç. Dr. Zeynep KOLÖREN  
Ordu Üniversitesi  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Üye** Doç. Dr. Haydar KARAKAYA  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Yukarıdaki sonucu onaylarım.** ..../..../2017

**Prof. Dr. Bahtiyar ÖZTÜRK**  
**Enstitü Müdürü**



## ETİK BEYAN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

Tarih

İmza

Yasemin Varlı





## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### AKGÖL GÖLÜNDE (TERME, SAMSUN) TOKSİN ÜRETEN SİYANOBAKTERİ KOMÜNİTESİNİN METAGENOMİK ANALİZİ

Yasemin Varlı

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Haydar Karakaya

Bu çalışmada bir tatlısu rezervi olan Akgöl gölündeki toksin üreten siyanobakteri komünitesi metagenomik bir yaklaşımla araştırılmıştır. İndikatör gen bölgeleri çevresel DNA'dan çoğaltılmış, amplikonlar rastgele klonlanarak nükleotit dizileri belirlenmiş ve filogenetik analizleri gerçekleştirilmiştir. Göl su kütlelerinin yüzeyaltı tabakasından örnekler alınmış, süzülerek hasat edilen hücre kütlelerinden çevresel DNA izole edilmiştir. Çevresel DNA hedef DNA bölgelerinin PCR amplifikasyon çalışmalarında kalıp DNA olarak kullanılmıştır. Öncelikle siyanobakteriler için evrensel primerler kullanılarak 16S rDNA bölgesinin amplifikasyonu yapılarak siyanobakteri komünitesi üyelerinin mevcudiyeti taranmıştır. Yaz ayları ve erken güz aylarında siyanobakterilerin mevcut olduğu belirlenmiş diğer aylarda ise belirlenmemiştir. Spesifik 16S rDNA primerleri ile yürütülen PCR amplifikasyonu sonuçları, siyanobakterilerin mevcut olduğu zaman periyodunda *Microcystis* spp. üyelerinin bol olarak temsil edildiğini göstermiştir. *Microcystis* spp. üyelerinin arasında toksin üretenlerin olup olmadığı mikrosistin gen kümesinin iki üyesi olan *mcyB* ve *mcyD* genlerinin belli bölgelerinin amplifikasyon testi ile belirlenmiştir. Siyanobakterilerin temsil edildiği yılın bütün aylarında mikrosistin genlerinin ve dolayısıyla toksigenik bireylerin mevcut olduğu belirlenmiştir. Toksigenik *Microcystis* spp. üyelerinin genotipik çeşitliliğini belirlemek üzere ağustos ve eylül ayları *mcyB* gen amplikonları rastgele klonlanarak belli sayıda klonun baz dizisi belirlenmiştir. Bu dizilerin filogenetik analizleri toksigenik üyelerin oldukça homojen olduğu ve büyük olasılıkla aynı tür veya tür altı grubun üyeleri olduğunu göstermiştir. Ağustos ayı çevresel DNA'sından spesifik primerler kullanılarak elde edilen, rastgele klonlanan ve dizilenen *rpoC1* ve *cpcBA* bölgelerinin filogenetik analizleri genel siyanobakteriyel çeşitliliğin toksigenik *Microcystis* spp. üyelerine göre daha fazla olduğuna işaret etmektedir. Sonuç olarak Akgöl gölünde daha baskın olarak toksigenik *Microcystis* spp. üyeleri yaygındır. Göl suyu, özellikle yaz aylarında herhangi bir şekilde temas eden organizmaları olumsuz olarak etkileme potansiyeline sahiptir.

Haziran 2017, 121 sayfa

Anahtar Kelimeler: Akgöl, Siyanobakteri, *Microcystis*, Mikrosistin, PCR, Metagenomik

## ABSTRACT

Master's Thesis

### METAGENOMIC ANALYSIS OF THE TOXIN PRODUCING CYANOBACTERIAL COMMUNITY IN AKGÖL LAKE IN TERME, SAMSUN

Yasemin Varlı

Ondokuz Mayıs University  
Graduate School of Sciences  
Department of Biology

Supervisor: Assos. Prof. Dr. Haydar Karakaya

In this study, toxin producing cyanobacterial community in a freshwater reservoir Akgöl Lake was investigated with a metagenomics approach. Indicator gene regions were amplified from environmental DNA, amplicons were cloned randomly and individual clones were sequenced and then subjected to phylogenetic analyses. Water samples were collected from subsurface of the lake water column and environmental DNA was isolated from the cell mass yielded by filtration of the samples. Environmental DNA was used as template for PCR amplification of target DNA regions. Firstly, presence of cyanobacterial community members was detected by 16S rDNA amplification using cyanobacterial universal primers. Cyanobacterial presence was found in the months of summer and early autumn but could not found in the other months of the year. The results of PCR amplifications performed with specific 16S rDNA primers showed that *Microcystis* spp. members was also present abundantly during the period in which cyanobacteria were present. Specific parts of *mcyB* and *mcyD* genes which are members of microcystin gene cluster were amplified to find whether toxigenic groups were existed among *Microcystis* spp. members. Microcystin genes and hence toxigenic members were found to be present in all months of the year cyanobacteria were existed. To determine genotypic diversity of toxigenic *Microcystis* spp. members, *mcyB* fragments amplified from August environmental DNA were cloned randomly and certain number of clones were sequenced. Phylogenetic analyses of these sequences were found to be highly homologous and were indicated to the all be in same species or subspecies groups. Phylogenetic analyses conducted on *rpoC1* and *cpcBA*, which were amplified from August environmental DNA, cloned randomly and sequenced, indicated that cyanobacterial diversity in general was greater than toxigenic *Microcystis* spp. members. In conclusion toxigenic *Microcystis* spp. members are predominantly widespread in Akgöl Lake. The water of the lake has a potentially hazardous impacts on the organisms anyhow contacted to the water especially in summer.

June 2017, 121 pages

Keywords: Akgöl, Cyanobacteria, *Microcystis*, Microcystin, PCR, Metagenomics

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım süresince fikir ve tecrübeleriyle çalışmalarımın her aşamasında yanımda olan, her türlü fedakârlığı yapan çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Haydar Karakaya'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında tecrübelerinden faydalandığım, her konuda desteğini benden esirgemeyen değerli Yrd. Doç. Dr. Kübra Özkul'a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince maddi-manevi her türlü fedakârlığı yapan, desteklerini her zaman yanımda hissettiğim annem Emriye Varlı'ya, babam Ali Osman Varlı'ya ve abime sonsuz teşekkür ederim.

Beni destekleyen ve her zaman yanımda olan Hacer Babur, Ayşe Yaşar Taşkın başta olmak üzere tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, PYO.FEN.1904.15.026 nolu Bilimsel Araştırma Projesi olarak Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından desteklenmiştir.

Haziran 2017, Samsun

Yasemin Varlı

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET.....	İ
ABSTRACT .....	İİ
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR .....	İİİ
İÇİNDEKİLER DİZİNİ .....	İV
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VI
SİMGELER.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	X
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ .....	3
2.1 Siyanobakterilerin Genel Özellikleri.....	3
2.2 Siyanobakteriyel Sistematik .....	4
2.3 Siyanobakteriyel Biyoçeşitlilik .....	6
2.4 Toksin Üreten Siyanobakteriler.....	7
2.5 Siyanobakteriyel Toksinler.....	8
2.5.1 Mikrosistin .....	10
2.5.2 Nodularin.....	14
2.5.3 Saksitoksin .....	15
2.5.4 Silindrospermopsin.....	16
2.5.5 Anatoksin .....	18
2.5.6 Lipopolisakkarit endotoksinler.....	20
2.5.7 $\beta$ -N Metil Amino-L-Alanin (BMAA) .....	21
2.6 Diğer Siyanobakteri Toksinleri .....	21
2.7 İnsanların Siyanotoksinler ile Teması ve Sağlığa Etkileri .....	22
2.7.1 Kontamine içme suyunun içilmesi .....	22
2.7.2 Dermal temas ve nefes alma yolu ile maruziyet .....	23
2.7.3 Karasal ve sucül bitkiler yolu ile temas .....	23
2.7.4 Sucül besin ağı yolu ile temas .....	24
2.7.5 Siyanobakteriyel besin takviyeleri yolu ile siyanotoksinlere temas.....	25
2.7.6 İntravenöz yol ile siyanotoksinlere temas .....	26
2.8 Siyanobakteriyel Toksinlerin Tespit Yöntemleri .....	26
2.8.1 Biyolojik analizler .....	27
2.8.2 Analitik metotlar .....	28
2.8.3 Moleküler yöntemler .....	29
2.9 Siyanotoksinlerin Giderim Yöntemleri ve “Bloom” Kontrolü.....	31
2.9.1 Siyanobakterilerin gideriminde kullanılan kimyasal ve fiziksel teknikler .....	31
2.9.2 Siyanobakteriyel “bloomların” biyolojik giderimi.....	32
2.10 Siyanobakterilerde Hepatotoksin Genlerinin Evrimi .....	34
2.11 Metagenomik.....	36
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	39
3.1 Araştırma Alanı .....	39
3.2 Kullanılan Çözeltiler .....	40
3.3 Kültür Ortamları .....	42
3.4 Su Örneklerinin Alınması ve Laboratuvara Getirilmesi.....	42
3.5 Siyanobakteriyel Kültürün Mikroskopik Sayım Yöntemi.....	43
3.6 Siyanobakteriyel Kültürden Kromozomal DNA İzolasyonu .....	43
3.7 Çevresel Örneklerden DNA İzolasyonu .....	44

3.8	PCR Reaksiyonları ve Parametreleri.....	45
3.9	Klonlama İşlemleri.....	46
3.9.1	Alıcı hücre hazırlanması .....	46
3.9.2	Ligasyon.....	47
3.9.3	Transformasyon.....	49
3.9.4	Plazmit izolasyonu .....	49
3.9.5	RE analizi .....	50
3.10	Agaroz Jel Elektroforezi ve PCR Ürünlerinin Yüklenmesi .....	50
3.11	DNA Dizi Analizi.....	51
4.	BULGULAR.....	52
4.1	Araştırma Alanı Örneklerinin Alınması ve Bakteriyel Kommünite Elemanlarının Hasatı .....	52
4.2	Siyanobakteriler için PCR Tarama Gücünün Optimizasyonu.....	54
4.3	Çevresel DNA İzolasyonu.....	57
4.3.1	Su Örneklerinde 16S rDNA Özgül Primerleri Kullanılarak Siyanobakteri ve <i>Microcystis</i> spp Suşlarının Taranması.....	58
4.3.2	Su örneklerinde <i>mcyB</i> ve <i>mcyD</i> özgül primerleri kullanılarak toksigenik <i>Microcystis</i> spp suşlarının taranması .....	61
4.3.3	Diğer siyanoakteriyel gruplara ait toksigenik suşların taranması .....	63
4.3.4	Toksigenik <i>Microcystis</i> spp. üyelerinin biyoçeşitliliğinin moleküler analizi.....	64
4.3.5	<i>mcyB</i> amplikonunun rastgele klonlanması ve dizilenmesi.....	65
4.3.6	<i>cpcBA</i> ve <i>rpoC1</i> gen bölgelerinin amplifikasyonu, rastgele klonlanması ve dizilenmesi .....	73
5.	TARTIŞMA.....	83
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	87
	KAYNAKLAR .....	91
	ÖZGEÇMİŞ .....	103

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### SİMGELER

°C	Santigrat Derece
Bç	Baz Çifti
CaCl <sub>2</sub>	Kalsiyum Klorür
HCl	Hidrojen Klorür
Kb	Kilo baz
KCl	Potasyum Klorür
KOH	Potasyum Hidroksit
Mg <sup>+2</sup>	Magnezyum
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum Klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MnCl <sub>2</sub>	Mangan Klorür
NaCl	Sodyum Klorür
ng	Nanogram
µg	Mikrogram

### KISALTMALAR

ALS	Amiyotrofik Lateral Skleroz
<i>ana</i>	Anatoksin kodlayan gen kümesi
ATX	Anatoksin
BGAS	“Blue Green Algae Supplements”
BMAA	β-N Metilamino-L-Alanin
CE	“Capillary Electrophoresis”
CHAB	“Cyanobacterial harmful algal blooms”
CYN	Silindrospermopsin
<i>cyr</i>	Silindrospermopsin kodlayan gen kümesi
DAB	Diaminobutirik Asit
DAF	Çözünmüş Hava Flotasyonu
D-Glu	D-Glutamik asit
D-MeAsp	D- Metil aspartik asit
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	“Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay”
GC	Gaz Kromatografisi
HPLC	“High performance liquid chromatography”
ICBN	International Code of Botanical Nomenclature
ITS	Intergenic Spacer
L-Ala	L-Alanin
L-Arg	L- Arjinin
LB	Luria-Bertani
LC	Likit Kromatografi
LD50	Letal doz

<b>L-Leu</b>	L-lösin
<b>L-Ser</b>	L-serin
<b>MALDI-TOF-MS</b>	“Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry”
<b>MC</b>	Mikrosistin
<i>mcy</i>	Mikrosistin kodlayan gen kümesi
<b>mRNA</b>	Mesajcı Ribonükleik Asit
<b>MS</b>	Kütle Kromatografisi
<i>nda</i>	Nodularin kodlayan gen kümesi
<b>NMR</b>	Nükleer Manyetik Rezonans
<b>NOD</b>	Nodularin
<b>NRPS</b>	Nonribozomal peptit sentetaz
<b>OECD</b>	Research of the Organization for Economic Co-Operation and Development
<b>ORF</b>	“Open Reading Frame”
<b>PAC</b>	Toz Haline Getirilmiş Aktif Karbon
<b>PCR</b>	Polimeraz ZincirReaksiyonu
<b>PIPES</b>	Piperazine-1.2-bis (2-ethanesulfonic acid)
<b>PKS</b>	Poliketit sentetaz
<b>PLC</b>	Primer Karaciğer Kanseri
<b>PP1</b>	Protein fosfataz 1
<b>PP2A</b>	Protein fosfataz 2A
<b>PPP4</b>	Fosfo Protein Fosfotaz 4
<b>PPP5</b>	Fosfo Protein Fosfotaz 5
<b>RAPD</b>	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
<b>RE</b>	Restriksiyon Endonükleaz
<b>RFLP</b>	“Restriction fragment length polymorphism”
<i>rpoC1</i>	RNA Polimeraz C1
<b>rRNA</b>	Ribozomal Ribonükleik Asit
<b>STX</b>	Saksitoksin
<i>sxt</i>	Saksitoksin kodlayan gen kümesi
<b>TBE</b>	Tris-Borik Asit- Etilendiamin tetraasetik asit
<b>TE</b>	Tris- Etilendiamin tetraasetik asit
<b>UV</b>	Ultraviyole
<b>WHO</b>	“World Health Organization”

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Mikrosistin-LR'nin kimyasal yapısı .....	11
Şekil 2.2. Hepatotoksin üreten siyanobakterilere ait gen kümeleri.....	13
Şekil 2.3. Nodularin kimyasal yapısı .....	14
Şekil 2.4. Saksitoksinlerin genel yapısı ve değişken gruplar (R).....	15
Şekil 2.5. Siyanobakteriyel hepatotoksin silindrospermopsin .....	17
Şekil 2.6. Siyanobakteriyel nörotoksinler .....	19
Şekil 2.7. Anatoksin ve asetil kolinin kimyasal yapısı.....	19
Şekil 2.8. Lipopolisakkarit endotoksinin lipit A bölgesi.....	20
Şekil 2.9. BMAA ve DAB amino asitlerinin kimyasal yapısı .....	21
Şekil 2.10. Apilsiatoksin ve lingibatoksin-a'nın kimyasal yapısı .....	22
Şekil 2.11. <i>mcyA</i> ve <i>mcyB</i> deki bazı bölgelerin silinmesiyle <i>ndaA</i> oluşumu.....	35
Şekil 2.12. <i>mcy</i> ve <i>nda</i> gen kümeleri ve promotor bölgeleri.....	36
Şekil 3.1. Akgöl ve çevresi uydu görüntüsü.....	39
Şekil 4.1. Araştırma alanına ait görüntüler .....	53
Şekil 4.2. Farklı kalıp DNA seyreltme oranlarında gözlenen siyanobakteriyel 16S rDNA çoğaltım ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü .....	56
Şekil 4.3. Farklı aylara ait çevresel örneklerden elde edilen çevresel genomik DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	57
Şekil 4.4. Çevresel DNA kalıp olarak kullanılarak siyanobakteri spesifik 16S rRNA gen bölgesinin PCR amplifikasyonunun agaroz jel elektroforez görüntüsü .....	60
Şekil 4.5. Çevresel DNA kalıp olarak kullanılarak <i>Microcystis</i> spesifik 16S rRNA gen bölgesinin PCR amplifikasyonunun agaroz jel elektroforez görüntüsü .....	61
Şekil 4.6. Çevresel DNA kalıp olarak kullanılarak <i>Microcystis</i> spesifik <i>mcyB</i> gen bölgesinin PCR amplifikasyonunun agaroz jel elektroforez görüntüsü....	62
Şekil 4.7. Çevresel DNA kalıp olarak kullanılarak <i>Microcystis</i> spesifik <i>mcyD</i> gen bölgesinin PCR amplifikasyonunun agaroz jel elektroforez görüntüsü....	63
Şekil 4.8. Transformasyon sonucu oluşan <i>mcyB</i> klonlarının LB agar besiyerindeki görünümü .....	67



Şekil 4.9. <i>mcyB</i> geninin hedef bölgesinin ligasyonu ile oluşan rekombinant plazmitin (pMB) fiziksel haritası .....	68
Şekil 4.10. Ağustos ayı çevresel DNA'sından elde edilen <i>mcyB</i> geninin hedef bölgesini içeren rekombinant plazmitlerin <i>EcoRI</i> kesimi sonucu oluşan fragmentlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü. ....	69
Şekil 4.11. Eylül ayı çevresel DNA'sından elde edilen <i>mcyB</i> geninin hedef bölgesini içeren rekombinant plazmitlerin <i>EcoRI</i> kesimi sonucu oluşan fragmentlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü .....	70
Şekil 4.12. Dizisi belirlenen <i>mcyB</i> fragmentlerinin evrimsel ilişkilerini gösteren filogenetik ağaç .....	72
Şekil 4.13. Ağustos ayı çevresel DNA'sı kalıp olarak kullanılarak elde edilen <i>cpcBA</i> ve <i>rpoCI</i> genlerinin PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü .....	73
Şekil 4.14. <i>rpoCI</i> geninin hedef bölgesinin ligasyonu ile oluşan rekombinant plazmitin (pRPOC) fiziksel haritası .....	75
Şekil 4.15. <i>cpcBA</i> geninin hedef bölgesinin ligasyonu ile oluşan rekombinant plazmitin (pCPC) fiziksel haritası .....	75
Şekil 4.16. Ağustos ayı çevresel DNA'sından elde edilen <i>rpoCI</i> geninin hedef bölgesini içeren rekombinant plazmitlerin <i>EcoRI</i> kesimi sonucu oluşan fragmentlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü .....	76
Şekil 4.17. Ağustos ayı çevresel DNA'sından elde edilen <i>cpcBA</i> geninin hedef bölgesini içeren rekombinant plazmitlerin <i>EcoRI</i> kesimi sonucu oluşan fragmentlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü .....	77
Şekil 4.18. Dizisi belirlenen <i>rpoCI</i> fragmentlerinin evrimsel ilişkilerini gösteren filogenetik ağaç .....	79
Şekil 4.19. Dizisi belirlenen <i>cpcBA</i> fragmentlerinin evrimsel ilişkilerini gösteren filogenetik ağaç .....	82

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Toksin ürettiği bilinen siyanobakteri cinsleri ve ürettikleri toksinlerin listesi.....	7
Çizelge 2.2. Siyanobakteriyel toksinlerin doğası .....	10
Çizelge 3.1. Inoue transformasyon tamponunun içeriği .....	41
Çizelge 3.2. 500 µl'lik lizis tamponunun içeriği .....	44
Çizelge 3.3. Tipik bir 10 reaksiyonluk PCR karışımı .....	45
Çizelge 3.4. PCR ile çoğaltımda kullanılan sıcaklık değerleri ve süreleri.....	46
Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan primerler ve dizileri.....	46
Çizelge 3.6. Ligasyon reaksiyonu .....	49
Çizelge 4.1. Örnek alma zamanlarındaki su sıcaklıkları .....	52
Çizelge 4.2. Yapılan PCR amplikasyon çalışmalarının toplu sonuçları. ....	64
Çizelge 4.3. <i>mcvB</i> gen bölgesinden elde edilmiş klonların yüzde benzerlik ve toplam nükleotit farklılıkları. ....	71
Çizelge 4.4. <i>rpoC1</i> gen bölgesinden elde edilmiş klonların yüzde benzerlik ve toplam nükleotit farklılıkları.. ....	78
Çizelge 4.5 <i>cpcBA</i> gen bölgesinden elde edilmiş klonların yüzde benzerlik ve toplam nükleotit farklılıkları.. ....	81

## 1. GİRİŞ

Siyanobakteriler fotosentetik organizmalar olmaları nedeniyle biyosferde güneşten gelen foton enerjisini diğer organizmalar için kullanılabilir enerji formuna dönüştürerek birincil üretici olarak rol oynarlar. Sucul ortamlarda ve özellikle açık deniz ve okyanuslarda çoğu durumda baskın birincil üreticilerdir. Bu başarılarının sırlarından bir de azot fikse etme yeteneklerinden dolayı bu ortamların kullanılabilir azot kıtlığı ile başedebilmeleridir. Kullanılabilir fosfat ve ışık bulunan hemen hemen bütün habitatlarda başarılı bir şekilde yayılmışlardır.

Siyanobakteriyel suşlar daha yoğun olarak sığ ve hareketsiz veya az hareketli sulara yoğun bir şekilde üreyip populasyon patlamaları yaparlar. Büyük su kütlelerinde sözgelimi bir içme suyu baraj gölünde, populasyon patlamaları şeklinde üremeleri beklenmez. Ancak gerek küresel ısınma, gerek inorganik besin maddeleriyle kontaminasyon ve gerekse aşırı tüketime bağlı su kütesinin azalması sonucunda bir populasyon patlaması riski daima mevcuttur.

Siyanobakteriler tarafından üretilen ve siyanotoksin olarak adlandırılan sekonder metabolitler doğal su kaynaklarında ve içme sularında bir tehdit olarak kabul edilmektedir. Siyanotoksinlerin, yaygın hayvan ölümlerine neden olarak hayvancılık üzerine olumsuz etkileri bulunmaktadır, son zamanlarda ise insan üzerinde de olumsuz etkileri tespit edilmiştir. Ayrıca patlama oluşumu hipoksiye ve sonuç olarak ekosistemdeki besin ağının bozulmasına neden olur

Geçmişten bugüne siyanobakteriyel toksinlerin sucul ortamlarda mevcudiyetinin belirlenmesi için farklı teknikler uygulanmıştır. Geleneksel olarak kromatografik ve immünolojik yöntemlerle sucul ortamlardaki belli bir siyanotoksinin miktarı belirlenmeye çalışılmıştır. Bu gün için bu yöntemlerin hala yaygın olmasına rağmen ilave moleküler yöntemlerle daha duyarlı ve etkili tarama yöntemleri uygulanmaya başlanmıştır. Metagenomik yaklaşımlar bugün etkili bir şekilde siyanobakteriyel suşların taranmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Birçok gelişmiş ülkede, sucul ortamların özellikle tarımsal gübre atıklarıyla kirlenmesinin ve küresel ısınmanın bir sonucu olarak siyanobakteriyel populasyonların gelişimindeki değişiklikler yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Ülkemizde bu tip çalışmalar nadirdir.

Bu çalışmada araştırma alanı olarak Samsun, Terme Akgöl gölü seçilmiştir. Akgöl'de fitoplankton üzerine yapılan bir çalışmada bazı siyanobakteri suşlarının varlığı mikroskopik olarak belirlenmeye çalışılmış olup siyanobakteri komünitesi hakkında yeterli bilgi sunmamaktadır.

Yıl içinde toksijenik siyanobakteri üyelerinin yoğun ürediği zaman aralığında daha yoğun olmak üzere belli aralıklarla alınan su örneklerinde PCR çoğaltımı yöntemiyle toksin üreten ve üretmeyen gruplar nitel olarak tespit edilmeye çalışılmıştır. Toksin üreten grupların mevcudiyetinin belirlenmesi durumunda çoğaltılan DNA molekülleri rastgele klonlanarak genotipik çeşitlilikleri analiz edilmesi mümkündür.

Bu çalışmada, Samsun çevresindeki bir doğal tatlı su kaynağı olan Akgöl'de toksin üreten siyanobakteri suşlarının mevcudiyeti ve eğer mevcutsa hangi çeşitlilikte ve sıklıkta meydana geldiğinin metagenomik bir yaklaşımla belirlenmesi amaçlanmıştır. Siyanobakterilerin yoğun olduğu aylarda su örnekleri alınarak çevresel genomik DNA izolasyonu yapılmış, siyanobakteri spesifik 16S rDNA ve toksin üreten suşlara ait spesifik primerler kullanılarak hedef gen bölgelerinin PCR ile çoğaltılması gerçekleştirilmiş, ardından toksin genlerine ait PCR ürünleri klonlanmış ve dizilenmiştir. Elde edilen diziler kullanılarak filogenetik analizler gerçekleştirilmiştir. Bu tezde bu kapsamda yürütülmüş çalışmaların sonuçları sunulmaktadır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1 Siyanobakterilerin Genel Özellikleri

Siyanobakteriler, azot fikse edebilen, fotosentez yapan, organik karbon ve oksijen üretebilen tek prokaryotik organizma grubudur. Siyanobakteriler; kaplıcalar, çöller ve buzullar gibi aşırı ortamlar dâhil olmak üzere çok geniş habitatlarda bulunabilirler. Morfolojik, fizyolojik ve metabolik olarak diğer prokaryotik gruplardan çok farklıdırlar (Mankiewicz vd, 2003). Siyanobakterilerin, tek hücreli, çok hücreli koloni oluşturan, filamentli gibi pek çok formu bulunmaktadır, hücre büyüklüğü ise 0,2-40 µm aralığında değişmektedir (Metcalf ve Codd, 2014).

Siyanobakteriler, klorofil-a, karoten, ksantofil, fikosiyanın ve fikoeritrin içerirler. Bu pigmentlerden fikosiyanın ve fikoeritrin sadece siyanobakterilerde bulunabilir. Siyanobakterilerin fotosentez mekanizması algelere benzemektedir, ancak ökaryotik mikroalglerin aksine siyanobakteriler kloroplast gibi hücre içi zarla çevrili organellere sahip değildir. Siyanobakterilerde fotosentetik pigmentler, sitoplâzmadaki serbest olarak bulunan, hücrenin periferine yakın tilakoid denilen zar sistemlerinde yer alır. Siyanobakterilerin temel metabolik işlemlerinden biri azot fiksasyonudur. Nitrogenaz enzimini kullanarak, aerobik çevresel koşullarda azotu doğrudan amonyuma (NH<sub>4</sub>) dönüştürürler. Siyanobakterilerde azot fiksasyonu, *Anabaena*, *Nostoc* ve *Aphanizomenon* gibi iplikli, heterosist oluşturan cinsler arasında yaygındır. *Trichodesmium* gibi heterosist oluşturmeyen bazı türler de azot fiske edebilirler (Mankiewicz vd, 2003).

Son zamanlarda değişen iklim koşulları ve artan insan faaliyetleri, tüm dünyada zararlı siyanobakteriyel “bloom” (aşırı populasyon çoğalması) oluşumuna neden olmaktadır. Sucul ekosistemlerdeki biyolojik üretimin zenginleştirilmesindeki bu doğal sürece, besin seviyesindeki artışlar genellikle de fosfor ve azotlu bileşikler neden olur. Koşullar iyi olduğunda, suyun berrak görüntüsü birkaç gün içerisinde siyanobakteri çoğalması nedeniyle yeşil, mavi-yeşil ya da kırmızımtırak-kahverengi gibi bulanık olabilir. Siyanobakteri “scum”u birkaç santim kalınlığında ince yağlı bir film görünümüne neden olur. Siyanobakteriler bu anormal populasyon artışını uzun süre koruyamaz ve hızla ölümlerle 1-2 hafta sonra kaybolurlar. Siyanobakteriyel “bloom”lar, genellikle ilkbaharda (*Planktotrix rubescens*, *Limnotrix redekei*) veya

geç yaz aylarında (*Microcystis aeruginosa*, *Aphanizomenon flosaquae*, *Planktotrix agardhii*) görülmektedir (Mankiewicz vd, 2003). Bloom oluşumuna bazı toksin üretebilen gruplar da dâhil olabilmektedir. Ancak “bloom”ların tümü zehirli değildir. Toksin üretme yeteneği olduğu bilinen gruplar tarafından oluşturulan “bloom”lar toksin üretmeyebilir veya toksin seviyesi saptanamayacak kadar düşük olabilir. Ayrıca “bloom” oluşumu hipoksiye neden olarak ekosistemdeki besin ağının bozulmasına neden olabilir (Cheung vd, 2013; Boopathi ve Ki, 2014). Ötrofikasyon, gölün besleyici elementler yönünden zenginleşmesi ve bunun sonucunda da ortamdaki organik madde miktarının çoğalması olayıdır. Research of the Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD) ötrofikasyonu sulardaki besleyici elementlerin zenginleştirilmesi sonucu siyanobakteri ve alg üremesinin artması, su kalitesinin bozulması olarak tanımlamaktadır (Yağcı, 2010).

## 2.2 Siyanobakteriyel Sistematik

Siyanobakteriler bitkilere benzer bir şekilde fotosentez yapmalarından dolayı prokaryotik bir hücre organizasyonuna sahip olmalarına rağmen uzun yıllar Botanik Kod’a göre sınıflandırılmış ve “mavi-yeşil alg” olarak isimlendirilmişlerdir. Düşük seviyede de olsa halen devam eden tartışmalar arasında 1978 yılında Stanier ve diğerleri tarafından bu organizmaların Uluslararası Bakteriyolojik Kod’a göre isimlendirilmesi teklif edilmiştir (Stanier vd, 1978) ve teklif Uluslararası Sistematik Bakteriyoloji Komitesinin Fototrofik Bakteri Taksonomisi alt komitesi tarafından 1 Ocak 1979 tarihi itibarıyla kabul edilmiştir (Oren, 2004). Bu iki kod arasındaki temel fark bakteriyel taksonominin dayanağı tip suşların, bitki taksonomisindeki ise herbaryum örnekleri, tanımlama ve resimler gibi cansız tip örnekleridir. Dolayısıyla botanik koda göre morfolojik özellikler esas alınarak çok sayıda tür ve cins tanımlanmıştır. Gerçekte habitatın fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre siyanobakterilerin morfolojik özelliklerinin oldukça değişken olduğu bilinmektedir. Saf kültür esasına göre yapılan çalışmalar gerçekte siyanobakterilerin morfolojiye göre tanımlanan tür sayısının çok altında türe sahip olması gerektiğini göstermektedir. Bu durum çok sayıda sinonim grupların oluşmasına neden olmuştur.

Rippka ve arkadaşları siyanobakterilerin ilk bakteriyolojik sınıflandırmasını gerçekleştirmişlerdir (Rippka vd, 1979). Bu ekölü takibeden araştırmacılar sadece klonal (aksenik) kültürleri ve bu kültürlerin morfolojik, sitolojik, genetik, kimyasal

ve fizyolojik özelliklerini esas almışlardır. Diğer yandan botanik ekolün temsilcileri de kendi bakış açılarıyla çalışmalarına devam etmişlerdir (Komarek, 2006, 2014). Bu iki ekol arasındaki birliği sağlamak ve siyanobakteri sistematüğini ortak bir zemine taşıma çabalarına rağmen bugün için farklılıklar az çok devam etmektedir.

Yakın zamanda Bergey's Manual of Systematic Bacteriology sistematik bakteriyoloji el kitabının iki baskısında (Castenholz ve Waterbury, 1989; Castenholz, 2001) siyanobakterilerin adlandırma işleminde önerilen ilkeler büyük çoğunlukla kabul görmektedir. Bununla birlikte oksijenik fotosentetik prokaryotlar için "International Code of Botanical Nomenclature" (ICBN) halen bazı araştırmacılar tarafından kullanılmaktadır (Palinska ve Surosz, 2014).

Siyanobakteriyel grupların hiyerarşik bir düzene göre yerleştirilmesi bu gün için gerçekleştirilebilmiş değildir. Bunun sağlanabilmesi için geleneksel sınıflandırma yöntemlerinin yanında filogenetik ilişkilerin belirleyici olacağı anlaşılmaktadır. Siyanobakteriler arasındaki filogenetik ilişkilerin belirlenmesine yönelik ilk çalışmalar Giovannoni ve arkadaşları (1988) tarafından gerçekleştirilmiş olup akselik kültürlerde muhafaza edilen organizmaların 16S rRNA bölgesinin dizi analizlerine dayanmaktadır. 16S rRNA ve 23S rRNA genleri arasındaki ITS bölgesinin ve diğer evrimsel kronometre olarak kullanılabilir diğer gen bölgelerinin dizileri karşılaştırılarak daha yakın filogenetik ilişkiler ortaya çıkarılabilir (Itehan vd, 2000; Palinska ve Surosz, 2014). Yine de siyanobakteri sistematüğünün sorunlarının çözümünün daha fazla siyanobakteriyel tam genom dizilerinin belirlenmesine bağlı olduğu açıktır.

Bugünkü mevcut verilerle Bakteriyolojik Kod'a göre siyanobakteriyel türlerin tanımlanması mümkün olmayıp gruplar suş numaralarıyla tanımlanmaktadır. Hatta siyanobakteriyel cinsler dahi formcins olarak tanımlanmaktadır. "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"ye (2001) göre siyanobakteriler bir filum (Cyanobacteria), bir sınıf (Cyanobacteria) ve beş alt bölüm (subselection) olarak sınıflandırılmıştır. Alt Bölüm I, tek hücreli veya koloni oluşturan, ikili bölünme (binary fission) veya tomurcuklanma ile üreyenler. Alt Bölüm II, tek hücreli veya koloni oluşturan, çoklu bölünme (multiple fission) ile üreyenler. Alt Bölüm III, filamentli, heterosistsiz, sadece bir düzlemde bölünebilen siyanobakteriler. Alt Bölüm IV, filamentli heterosistli, dallanmayan ve sadece bir düzlemde bölünebilen

siyanobakteriler, Alt Bölüm V, filamentli, heterosistli, dallanan ve çok fazla düzlemde bölünebilen siyanobakteriler (Castenholz, 2001).

### **2.3 Siyanobakteriyel Biyoçeşitlilik**

Bilinen organizmaların en eski gruplarından biri olan siyanobakteriler, fotosentetik prokaryottur. Prekambriyan dönemde yaklaşık 3.5 milyar yıl önce var olmuşlardır. Dünyanın erken atmosferinde oksijen birikiminde önemli rol oynamışlardır. Böylece aerobik yaşam formlarının hayatta kalmasını uygun hale getirmişlerdir (Chaurasia, 2015). Uzun evrimsel geçmişi boyunca, her zaman siyanobakteriler antropojenik etkilerin yanı sıra jeokimyasal ve iklimsel değişikliklere adapte olmuşlardır (Paerl ve Otten, 2013).

Siyanobakteriler, tek hücreliden çok hücreliye, kokoidden dallı filamentliye, ototrofikten heterotrofiğe, psikrofilikten termofiliğe, asidofilikten alkalofiliğe geniş bir çeşitlilik gösterirler, tatlı sudan denizlere çok çeşitli habitatlarda bulunurlar. Hem serbest hem de endosimbiont olarak bulunurlar. Siyanobakterilerin oksik ve anoksik ortamlarda oluştuğu bilinmektedir. (Thajuddin ve Subramanian, 2005).

Siyanobakteriler muhtemelen tüm fotosentetik organizmaların habitatlarındaki en geniş çeşitliliği göstermektedirler. Küresel olarak  $3 \times 10^{14}$  g C veya  $10^{15}$  g yaş biyokütle ile siyanobakteriler dünyadaki biyokütle katkıda bulunan en önemli organizmalarından biridir (Garcia-Pichel vd, 2003). Bu ölçekte bir biyokütlenin oluşumundan sorumlu olan yeni siyanobakteri suşları keşfedilmeye devam etmektedir (Nabout vd, 2013; Chaurasia, 2015).

Siyanobakteriler ekstrem ortamlarda hayatta kalabilir. Hipersalin ortamlarda yaşayanların biyoçeşitliliği ve bunların adaptasyon mekanizmaları ve ekosisteme katkıları Oren (2015) tarafından incelenmiştir. Kutup bölgelerinin (Antartika ve arktik) canlıların hayatta kalabilmesi için aşırı sert ve ekstrem çevre koşulları olduğu bilinmektedir. Makhalanyane vd (2015) bu bölgelerin siyanobakteriyel biyolojik çeşitliliğini bunların adaptasyon mekanizmalarını ve sağladıkları temel ekosistem rollerini gözden geçirmişlerdir.

Siyanobakteriyel bloom ve siyanotoksin üretimi, bu organizma grubunun diğer bir yönünü temsil eder. Bu organizmalar trofik basamaklar ve jeokimyasal döngüler yoluyla ekosistemi etkileyebilirler. Ayrıca Caroppo (2015), kıyı bölgelerinde yerleşik olanların ve planktonik pikosiyanoobakterilerin ekosistem sürdürülebilirliği için önemini açıklamaktadır. Likenler, siyanobakteriler ve mantarlar arasında zorunlu



mutualistik simbiyoz ilişkidir, karasal ekosistemin önemli bir biyoçeşitlilik bileşenini temsil eder. Azotun kullanılabilir hale getirilmesine önemli katkıları vardır. Serbest yaşayan ve simbiyotik azot fiske eden siyanobakteriler, deniz ve karasal ekosistemlerde ki küresel doğal azotun kullanılabilir forma dönüşmesine önemli katkılarda bulunmaktadır. Pirinç tarlalarında azot fiske eden siyanobakteriyel suşlar azot açığının kapatılması için kullanılmaktadır. Bu en eski organizma grubunun, biyoçeşitliliği henüz tam olarak anlaşılmış değildir.

## 2.4 Toksin Üreten Siyanobakteriler

Siyanobakterilerin pek çok cins ve türünün biyolojik aktif bileşik ürettiği bilinmektedir. Şaşırtıcı olmayan bir şekilde bu bileşiklerin çoğunun, insan dâhil çeşitli organizmalarda son derece toksik olduğu kanıtlanmıştır. Siyanobakterilerin bazı türlerinin çeşitli toksik bileşikler üretmesine rağmen bazı toksinlerin belli siyanobakterilerde sınırlı olduğu görülmüştür (Pearson vd, 2010). Çizelge 2.1’de toksin ürettiği bilinen siyanobakteri cinsleri ve bu cinslerin ürettikleri toksinler gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. Toksin ürettiği bilinen siyanobakteri cinsleri ve ürettikleri toksinlerin listesi (Anonymus-1)

Cins	Üretilen Toksinler
<i>Anabaena</i>	Anatoksin, mikrosistin, saksitoksin
<i>Anabaenopsis</i>	Mikrosistin
<i>Aphanizomenon</i>	Saksitoksin, silindrospermopsin
<i>Cylindrospermopsis</i>	Silindrospermopsin, saksitoksin
<i>Hapalosiphon</i>	Mikrosistin
<i>Lyngbya</i>	Aplysiatoksin, lyngbyatoksin-a
<i>Microcystis</i>	Mikrosistin
<i>Nodularia</i>	Nodularin
<i>Nostoc</i>	Mikrosistin
<i>Oscillatoria</i>	Anatoksin
<i>Planktotrix</i>	Anatoksin, Aplysiatoksin, mikrosistin, Saksitoksin
<i>Schizothrix</i>	Aplysiatoksin
<i>Trichodesmium</i>	Henüz tanımlanmamış
<i>Umezakia</i>	<i>Silindrospermopsin</i>

## 2.5 Siyanobakteriyel Toksinler

Siyanobakterilerin çeşitli cinsleri tarafından üretilen siyanotoksin adı verilen sekonder metabolitler, algler, bitkiler, büyükbaş hayvanlar ve insan dâhil olmak üzere ökaryotik organizmalar için son derece zehirlidir. Bu toksinler, doğal su kaynaklarında ve içme sularında bir tehdit olarak kabul edilmektedir (Kaushik ve Balasubramanian, 2013).

Araştırmacıların siyanobakteri sekonder metabolitlerinin üzerinde çalışmalarının nedenleri, toksik siyanobakterilerin ürettiği toksinlerin canlılar ve insan sağlığına olumsuz etkileri ve bu metabolitlerin tedavi edici özellikleridir. Şu ana kadar siyanobakterilerden izole edilen 800'den fazla sekonder metabolitin; antibakteriyel, antifungal, antitümör, antiviral, antiprotozoal, sitotoksik ve toksik etkileri yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir (Vijayakumar ve Menakha, 2015).

Siyanotoksinler gelişmenin tüm aşamalarında üretilmektedir. Stres veya hücrenin yaşı nedeniyle parçalanma sonucu toksin suya salınmaktadır (Kaushik ve Balasubramanian, 2013).

İnsan ve hayvanların siyanotoksinler ile kontamine olmuş suları tüketimi sonucu zehirlenme vakaları 1800'lerden beri bildirilmektedir. Avustralya'nın tropik ve subtropik sularında *Cylindrospermopsis raciborskii* tarafından üretilen yapısal olarak farklı bir toksin olan silindrospermopsinin su kaynaklarında sorunlara neden olduğu tespit edilmiştir (Hawkins vd, 1985). Silindrospermopsinin protein sentezini engelleyebilen ve karaciğer gibi hayati organlara etkileri olan siklik guanidin alkaloid yapısında olduğu belirlenmiştir. Ayrıca genotoksik olup kromozom kaybına ve DNA'da zincir kırılmasına neden olduğu belirlenmiştir. Birçok ülkede siyanobakteri oluşumu araştırılmakta ve sürekli izleme altındadır. Siyanobakteri toksinlerinin neden olduğu etkiler, ilk kez 1878 yılında Güney Avustralya Alexandrina gölünün Milang kıyısında hayvan ölümlerini siyanobakterilerle ilişkilendiren George Francis tarafından rapor edilmiştir. 1931 yılında Ohio nehri etrafında düşük yağış nedeniyle "bloom" görüldüğü ve buna bağlı olarak gastroenterit rahatsızlığının olduğu rapor edilmiştir. Zimbabwe'de de siyanobakteriyel "bloom" nedeniyle benzer sağlık sorunlarının görüldüğü bildirilmiştir (Kaushik ve Balasubramanian, 2013). Itaparica barajında *Anabaena* ve *Microcystis* "bloomu" nedeniyle 2000 gastroenterit vakadan, 88 çocuğun öldüğü rapor edilmiştir (Hitzfeld vd, 2000). Ayrıca Brezilya'da bir diyaliz merkezinde

kullanılan sudaki siyanotoksin nedeniyle 130 hastadan 56'sının öldüğü bildirilmiştir. Siyanotoksin ile kontamine olmuş suyun içilmesi ile çok sayıda gastroenterit ve karaciğer hasarı vakaları olduğu rapor edilmiştir. Mikrosistin ile Çin'de yapılan uzun süreli bir çalışmada toksinin karaciğer kanserine neden olduğu tespit edilmiştir (Kaushik ve Balasubramanian, 2013).

Siyanotoksinler genel olarak hepatotoksinler, nörotoksinler ve dermatotoksinler (Apilsiatoksin, lingibyatoksin) şeklinde sınıflandırılır. Siyanobakteriyel hepatotoksinlere, mikrosistin, nodularin ve silindrospermopsin dâhildir. Bununla birlikte, silindrospermopsin hem sitotoksik hem de nörotoksik potansiyele sahiptir (Kaebernick vd, 2001; Kaplan vd, 2012; Corbel vd, 2014; Boopathi ve Ki, 2104) . Çeşitli siyanobakteri türleri tarafından üretilen nörotoksinler; anatoksin ve saksitoksindir (Neilan vd, 2013; Boopathi ve Ki, 2014). Kimyasal pozisyonuna bağlı olarak siyanotoksinler, siklik peptitler (mikrosistin ve nodularin), alkaloitler (anatoksin, saksitoksin, silindrospermopsin, apilsiatoksin, lingibyatoksin-a) ve lipopolisakkaritler olarak gruplandırılmaktadır (Kaebernick vd, 2001; Pearson vd, 2010; Boopathi ve Ki, 2014).

Siyanotoksinlerin çoğu, (silindrospermopsin hariç) hücre dışı değildir, ancak siyanobakteriyel hücrelerin lizisiyle bu toksinler serbest bırakılarak çevredeki konsantrasyonları yükselir (Kaplan vd, 2012; Boopathi ve Ki, 2014). Ayrıca çeşitli siyanotoksinler çevrelerindeki diğer bakteri ve fitoplankton komüniteleri üzerine olumsuz etkileri olabilmekte, allelopatik özellikler gösterebilmektedir (Leao vd, 2009; Boopathi ve Ki, 2014). Çizelge 2.2'de siyanobakteriyel toksinler, varyantları, hangi cinsler tarafından üretildikleri, toksin etki mekanizması ve sağlığa etkileri gösterilmektedir.

Çizelge 2.2. Siyanobakteriyel toksinlerin doğası (Pearson vd, 2010; Boopathi ve Ki, 2014). MC: Mikrosistin, NOD: Nodularin, CYN: Silindrospermopsin, ATX: Anatoksin, STX; Saksitoksin

Toksin	Varyant	Cins	Toksik Mekanizma	Etkileri
MC	85'in üzerinde varyant	<i>Anabaena, Anabaenopsis, Aphanizomenon, Merismopedia, Microcystis, Oscillatoria, Phormodium, Synechococcus ve Planktotrix</i>	Hepatotoksik, Ökaryotik protein fosfataz inhibisyonu	Gastrointestinal, karaciğer iltihabı ve kanaması, ölüme yol açan karaciğer yetmezliği, deri iltihabı
NOD	8 varyant	<i>Nodularia ve Nostoc</i>	Hepatotoksik, Ökaryotik protein fosfataz inhibisyonu	Gastrointestinal, karaciğer iltihabı ve kanaması, ölüme yol açan karaciğer yetmezliği, deri iltihabı
CYN	3 varyant	<i>Cylindrospermopsis, Anabaena, Aphanizomenon, Oscillatoria, Raphidiopsis, Umezakia</i>	Hepatotoksik, sitotoksik, nörotoksik; glutathione sentezi, protein sentezi ve sitokrom P450 inhibisyonu	Gastrointestinal, karaciğer iltihabı ve kanaması, deri iltihabı
ATX	3 varyant	<i>Anabaena, Aphanizomenon ve Oscillatoria</i>	Nörotoksik, nörotransmitter asetilkolini taklit yeteneği	Karınca lanma, ateş, uyuşukluk, baş dönmesi, anlaşılmayan konuşma, ölüme neden olan solunum felci
STX	20 varyant	<i>Anabaena, Aphanizomenon, Cylindrospermopsis, Lyngbya, Planktotrix, Raphidiopsis ve Sctonema</i>	Nörotoksik, voltaj duyarlı sodyum kanallarının bloke edilmesi	Karınca lanma, ateş, uyuşukluk, baş dönmesi, Anlaşılmayan konuşma, ölüme neden olan solunum felci

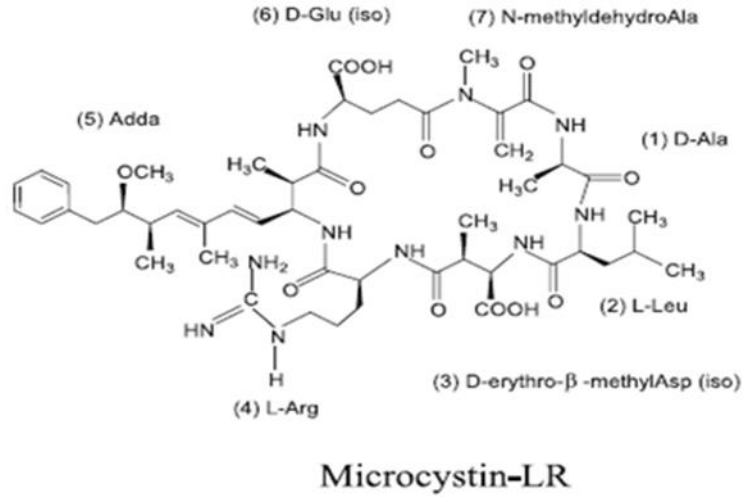
Sıcaklık, ışık şiddeti, pH, besin, tuzluluk, UV, rüzgâr, iz metaller gibi çevresel faktörler ve kirliliğe yol açan maddeler siyanobakteri türlerinin gelişmesini ve onların siyanotoksin üretimini etkileyebilir (Neilan vd, 2013; Boopathi ve Ki, 2014).

### 2.5.1 Mikrosistin

Mikrosistin; *Microcystis, Anabaena, Oscillatoria, Planktotrix, Anabaenopsis, Aphanizomenon, Merismopedia, Phormodium, Chroococcus* ve *Nostoc* dâhil olmak üzere çok sayıda siyanobakteri cinsi tarafından üretilen siklik heptapeptit yapısında hepatotoksindir. İlk olarak tatlı sularda yaygın olarak bulunan *Microcystis aequirostris*'de tanımlandığı için toksin mikrosistin olarak adlandırılmıştır (Pearson vd, 2010).

Metilasyon, toksisite, hidroksilasyon, epimerizasyon derecesi ve peptit dizisindeki farklılıklara göre yaklaşık 85'in üzerinde mikrosistin izoformu tanımlanmıştır (Welker ve von Dohren, 2006; Pearson vd, 2010). Mikrosistin, siklik

heptapeptit yapısında olup genel yapısı siklo (D-Ala-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-Glu-Mdha) şeklindedir. D-MeAsp; D-eritrometilaspark asit, Mdha; N-metildehidroalanine ve Adda ise (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoik asittir (Adda: siyanobakteri toksinlerine özel, nadir görülen aminoasittir). X ve Z ise değişken aminoasitler olup bu pozisyonlarda taşıdıkları amino asitlere göre adlandırılırlar: -leu- ve -arg- (LR), -tyr- ve -arg- (YR), -arg- ve -arg- (RR), -leu- ve -trp- (LW), -leu- ve -phe- (LF) olarak adlandırılmaktadır. Mikrosistin (LR) en yaygın olarak oluşan ve en toksik mikrosistinlerden biridir ve siklik yapının ikinci pozisyonunda L-leucine (L) ve dördüncü pozisyonunda ise L-arginine (R) içermektedir (Kaushik ve Balasubramanian, 2013). Şekil 2.1’de Mikrosistin-LR’nin kimyasal yapısı görülmektedir.



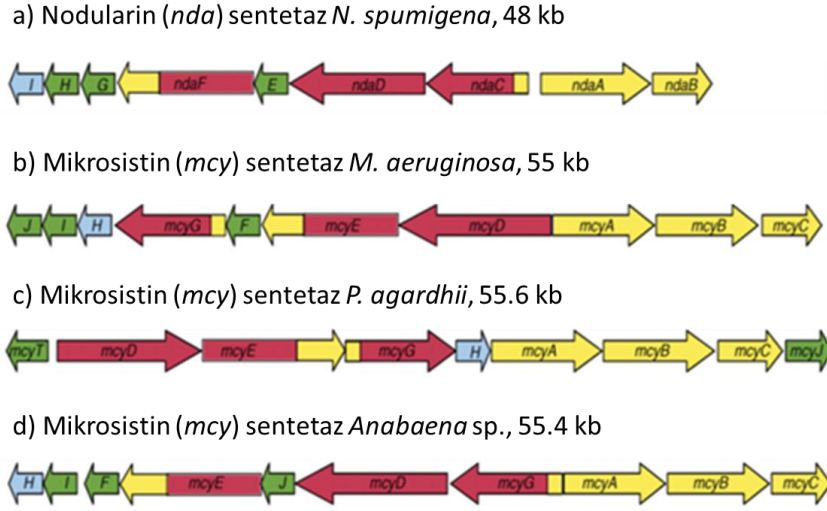
Şekil 2.1. Mikrosistin-LR’nin kimyasal yapısı (Pearson vd, 2010)

Mikrosistinler moleküler düzeyde PP1, PP2A, PPP4 ve PPP5 kapsayan protein fosfataz ve fosfoprotein fosfataz enzimlerinin geri dönüşümsüz inhibitörleridir (Hastie vd, 2005). Bu enzimler; insan, hayvan ve bitki hücrelerinde enerji ve fizyolojik işlemlerde rol alan yaşamsal faaliyetlerin düzenlenmesinde görevlidir ve tüm canlılarda korunmuştur. Mikrosistin halkasına bağlı bir aminoasit olan metildehidroalanin, protein fosfataza bağlanarak enzimi devre dışı bırakmaktadır. Ayrıca hayvan hücrelerinde mikrosistinler; böbrek hasarına, erkek üreme hücresi hasarına, kognitif (zihinsel) fonksiyon bozukluğuna ve tümörlerin gelişmesiyle de primer karaciğer kanserine neden olmaktadır (Metcalf ve Codd, 2014).

Yüksek dozda mikrosistin, memeli karaciğerinde geri dönüşümsüz hasara neden olur. Akut mikrosistin zehirlenmelerinin ölüm nedenleri; kanın karaciğerde birikmesinden dolayı karaciğerin iki katı ağırlığa ulaşması, hipovolemik şok ya da kan akışındaki yetersizliktir (Metcalf ve Codd, 2014).

Mikrosistin, tümör indükleyici özelliğe sahip olduğu rapor edilmiştir (Kuiper-Goodman vd, 1999; Boopathi ve Ki, 2014). Son zamanlarda, *Planktotrix rubescens* Strain No80'den izole edilen mikrosistin nano molar düzeyde dahi protein fosfatazı engellediği gösterilmiştir (Niedermeyer vd, 2014). Mikrosistin tüm izoformları için değişen toksisite düzeyleri bildirilmiştir. Örneğin, en yaygın form olan mikrosistin-LR'nin farelerde letal doz 50 (LD<sub>50</sub>) değeri 50 µg/kg (Krishnamurthy vd, 1986) iken nadir görülen mikrosistin-RR için öldürücü doz 600 µg/kg'dan daha fazladır (Watanabe vd, 1988; Pearson vd, 2010).

Mikrosistin, non ribosomal peptid sentetaz (NRPS) ve poliketit sentaz (PKS) içeren büyük çok fonksiyonlu enzim kompleksi tarafından non-ribosomal olarak sentezlenir. Bu biyosentetik enzimleri kodlayan gen kümesinin (*mcy*) dizisi *Microcystis*, *Anabaena* ve *Planktotrix* dâhil olmak üzere çeşitli siyanobakteriyel türlerde belirlenmiştir (Tillett vd, 2000; Rouhiainen vd, 2004). Mikrosistin biyosentez gen kümesi, siyanobakterilerde dizisi tamamen belirlenen ilk kompleks metabolit gen kümesidir. *Microcystis aeruginosa* PCC7806'da *mcy* gen kümesi 55 kb büyüklüğündedir (Şekil 2.2). Bu küme; *mcyA-mcyD* arasında yerleşik iki yönlü promotor içeren, *mcyABCDEFGHIJ*'den oluşan (*mcyABC* ve *mcyDEFGHIJ*) 10 gen (10 açık okuma çerçevesi; ORFs) ile 2 polisistronik operonu (*mcyA-C* ve *mcyD-J* arasında) kapsamaktadır. Bu iki operondan geniş olan *mcyD-J*, PKS enzimi (*mcyD*), NRPS ve PKS iki hibrit enzimi içeren (*mcyE* ve *mcyG*), "tailoring" enzimleri (*mcyJ*, *F* ve *I*) ve toksin taşınmasında görev alan enzimleri kodlamaktadır. Daha küçük bir operon olan, *mcyA-C* ise, üç NRPS (*mcyA-C*) enzimlerini kodlamaktadır (Tillett vd, 2000; Pearson vd, 2010). Şekil 2.2'de hepatotoksin üreten siyanobakterilere ait gen kümeleri gösterilmektedir.



Şekil 2.2. Hepatotoksin üreten siyanobakterilere ait gen kümeleri gösterilmektedir. Poliketit sentetaz enzimini kodlayan genler kırmızı, non-ribosomal peptit sentetaz enzimini kodlayan genler sarı, tailoring enzimini kodlayan genler yeşil, ABC transport sistemini kodlayan genler mavi olarak gösterilmektedir (Pearson ve Neilan, 2008)

Adda oluşumu, *mcyD-G* ve *J* tarafından kodlanır. Hibrit NRPS/PKS enzimi (*mcyG*), Adda biyosentezinde ilk adımı oluşturmaktadır. Başlangıçta, *mcyG* bölgesinin fenilasetat ile aktive olduğu düşünülmüş ancak daha sonra yapılan biyokimyasal karakterizasyon ile fenilpropanoid ile aktive edildiği ortaya çıkarılmıştır. Aktivasyondan sonra, fenilpropanoid başlangıç ünitesi çeşitli malonil-CoA uzama aşamaları ve daha sonra C-metilasyon, redüksiyon ve dehidratasyon ile uzatılır. Tüm aşamalar *mcyD*, *E* ve *G*'nin PKS modülleri ile katalizlenir (Pearson vd, 2010).

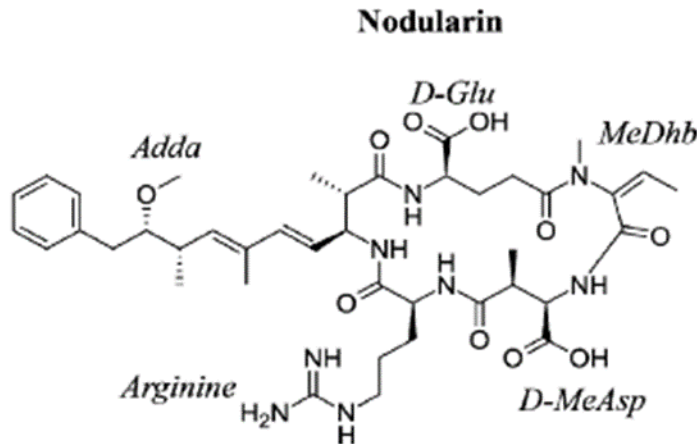
*Microcystis aeruginosa*, *Planktotrix agardhii* ve *Anabaena* sp.'nin *mcy* genleri karşılaştırıldığında toksin biyosentez aşamalarının benzer olduğu ancak genlerin düzenlenmelerinin farklı olduğu bulunmuştur. *Planktotrix agardhii*'nin *mcy* kümesi farklı bir düzenlemeye sahiptir ve *mcyF* ve *mcyI* genleri mevcut değildir (bakınız Şekil 2.2). Ayrıca, *Planktotrix agardhii* *mcy* kümesi promotör bölgesinin yukarısında, ilave bir gen olan *mcyT* geni bulunur. Bu genin tip II tiyosteraz enzimini kodladığı düşünülmektedir (Pearson vd, 2010).

Siyanobakterilerde hepatotoksin üretimini, nitrojen, fosfor, iz metaller, büyüme sıcaklığı, ışık ve pH dâhil olmak üzere çevresel ve farklı fiziksel parametrelerin etkilediği düşünülmektedir (Pearson vd, 2010). Besin miktarı ve sıcaklık gibi faktörlerin *mcy* ekspresyonunu ve toksin biyosentezini etkilediği gösterilmiştir.

Örneğin Sevilla vd (2008) *Microcystis aeruginosa* PCC7806’da *mcy* ekspresyonu ve toksin biyosentezine demirin etkilerini araştırmışlar ve demir açlığının *mcyD* transkripsiyonunda artışa neden olduğunu rapor etmişlerdir.

## 2.5.2 Nodularin

Siklik pentapeptit yapısındaki nodularin planktonik filamentli siyanobakteri *Nodularia spumigena*’dan izole edilmiştir. Bu tür genellikle acı su ve estuarin ortamlarda toksik “bloom” oluşturur. Nodularin ve mikrosistin yapısı ve toksik etkileri benzerdir (Pearson vd, 2010). Nodularin, siklik pentapeptit yapısında olup genel yapısı siklo (-D-erythro-methylAsp (iso-linkage)-L-Z-Adda-DGlu-2-(methylamino)-2(Z)-dehydrobutyric acid) şeklindedir. 2(Z) ise L-Arjinin aminoasitidir, Nod-R izoformunu oluşturur. Nodularin, mikrosistin gibi Adda aminoasidi içeren siklik peptit yapısındadır ve beş amino asitten oluşur (Kaushik ve Balasubramanian, 2013). Mikrosistin ikiden fazla siyanobakteriyel cins tarafından üretilirken nodularin üreten sadece iki cins tespit edilmiştir: Acı sularda yaşayan *Nodularia spumigena* ve eğreltilerle simbiyotik olarak yaşayan *Nostoc* üyeleri tarafından üretilmektedir (Metcalf ve Codd, 2014). Şekil 2.3’ de nodularinin kimyasal yapısı gösterilmektedir. Laboratuvar hayvanlarında yapılan çalışmalarda, nodularinin hem kanserojen hem de tümör uyarıcısı olduğu görülmüştür. Nodularin de karaciğerdeki kanamaya bağlı ölüme neden olmaktadır. Nodularin için letal doz 50 (LD<sub>50</sub>) farelerde 50 µg/kg’dır (Pearson vd, 2010).



Şekil 2.3. Nodularin kimyasal yapısı (Metcalf ve Codd, 2014)

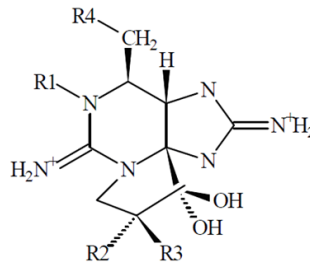


Ayrıca nodularin, metil dehidro alanin içermemesine rağmen protein fosfatızı inhibe yeteneğine sahiptir ve mikrosistin gibi hepatotoksiktir. Bu inhibe yeteneği enzime bağlanma ile değil, uzun süreli temas sonucunda olmaktadır (Metcalf ve Codd, 2014).

Nodularin, PKS ve NRPS enzimleri tarafından sentezlenir. *nda* gen kümesi, çift yönlü düzenleyici promotor ile dokuz açık okuma çerçevesinden (ORFs) (*ndaA-ndaI*) oluşur; *ndaAB*, ORF1, ORF2 ve *ndaC*, iki polisistronik mRNA ile transkribe edilir (bakınız Şekil 2.2) (Moffitt ve Neilan, 2004; Boopathi ve Ki, 2014). *nda* kümesinin, *mcyA-A2* ve *mcyB-C2* alanı arasındaki silinme oluşmuş olduğu öngörülmektedir. Bugüne kadar, nodularinin 8 varyantı rapor edilmiştir (Gehringer ve Wannicke, 2014; Boopathi ve Ki, 2014). *Nodularia spumigena* “bloom”larının, orta dereceli tuz konsantrasyonu, düşük N:P oranı ve yüksek fosfor koşullarında baskın olduğu bildirilmiştir (Boopathi ve Ki, 2014).

### 2.5.3 Saksitoksin

Saksitoksinler ve bunların varyantları güçlü nörotoksinlerdir ve parolitik deniz kabuklularında zehirlenmelere neden olurlar (Wiese vd, 2010; Boopathi ve Ki, 2014). Çeşitli tatlı su siyanobakterileri ve deniz dinoflagellatlarının da saksitoksin ürettiği bilinmektedir. Tatlı sularda *Anabaena circinalis*, *Aphanizomenon* sp., *Aphanizomenon gracile*, *Cylindrospermopsis raciborskii* ve *Lyngbya wollei* bilinen saksitoksin üreticileridir. Saksitoksinler, yapısal olarak ilişkili 20'nin üzerinde bileşik grubu içermektedir (Pearson vd, 2010). Saksitoksin, farklı yan gruplarıyla birlikte trisiklik omurgayı paylaşan alkaloit sınıfında bir toksindir, trisiklik bileşikler ailesi altında bulunur ve moleküler ağırlığı 241-491 Dalton arasında değişmektedir (Boopathi ve Ki, 2014). Şekil 2.4' de saksitoksinin genel yapısı gösterilmektedir.



Şekil 2.4. Saksitoksinlerin genel yapısı ve değişken gruplar (R) gösterilmektedir (Metcalf ve Codd, 2014)

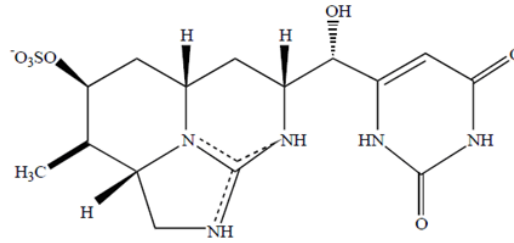
Saksitoksinler nörotoksiktir ve omurgalılarda voltaja duyarlı kanalların fonksiyonunu inhibe ettiği bilinmektedir. Omurgalıların, sodyum iyon kanallarını inhibe ettiği ve sinir fonksiyonlarını etkilediği bulunmuştur (Wang vd, 2003; Su vd, 2004; Boopathi ve Ki, 2014). Solunum yetmezliği ile ağır felce neden olur ve sonuçta ölüme yol açar (van Apeldoorn vd, 2007; Boopathi ve Ki, 2014). Saksitoksinin LD<sub>50</sub> değeri farelerde yapılan çalışmalar ile 10 µg/kg olarak belirlenmiştir (Boopathi ve Ki, 2014).

Bugüne kadar saksitoksin genlerinin düzenlenişi ile ilgili olarak çok az çalışma yapılmıştır. Kellman vd, (2008) bioinformatik analizlerinde saksitoksin üretiminin başlamasında multifonksiyonel poliketit biyosentez enziminin (*stxA*) rol aldığını göstermişlerdir. Sadece birkaç çalışmada saksitoksin genleri hakkında açıkça bilgi verilmiştir. Saksitoksin biyosentetik gen kümesi ile ilgili olarak siyanobakterilerin beş cinsinden, saksitoksin biyosentezi, transportu ve düzenlenmesi dâhil olmak üzere 33 gen rapor edilmiştir. Bu gen kümesinin büyüklüğü 25,7 kb (*Raphidiopsis brookii*) ile 36 kb (*Lyngbya wolleis*) kadardır. *C. raciborskii* T3 ile yapılan bir çalışma saksitoksin regülasyonuna (düzenlenmesine) katılan *ompR*, *sxtZ*, *sxtY* genlerinin varlığını ortaya çıkarmıştır. Saksitoksin sentezi, çevresel faktörlerle değiştirilebilir; besin, ışık, büyüme sıcaklığı ve tuz konsantrasyonları saksitoksin üretimini etkilemektedir (Boopathi ve Ki, 2014).

#### 2.5.4 Silindrospermopsin

Silindrospermopsin, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Anabaena bergii*, *Aphanizomenon ovalisporum*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Oscillatoria* sp. PCC6506, *Raphidiopsis curvata*, *Sphaerospermopsis* ve *Umezakia natans* dâhil olmak üzere çeşitli filamentli siyanobakteriler tarafından üretilen, trisiklik guanidin birimi ve urasil parçası içeren bir alkaloiddir (Kaebernick ve Neilan, 2001; Schembri vd, 2001; Bittencourt-Oliveira vd, 2011; Boopathi ve Ki, 2014). Ayrıca bu toksinin iki varyantı daha tanımlanmıştır: 7-episilindrospermopsin yapısı sadece urasil parçası yakınındaki hidroksil grubunun oryantasyonu bakımından farklıdır, deoxysilindrospermopsin ise urasil parçasının yakınındaki başlangıç hidroksil grubunda bir oksijen atomu eksikliği ile karakterize edilir. Deoxysilindrospermopsin non-toksik olarak görünmektedir. Silindrospermopsin toksin üretimi poliketit sentez ve peptid sentetaz kodlayan genler tarafından düzenlenir ve mikrosistin sentezine

benzemektedir (Boopathi ve Ki, 2014). Şekil 2.5'de silindrospermopsinin yapısı görülmektedir.



Şekil 2.5. Siyanobakteriyel hepatotoksin silindrospermopsin (Metcalf ve Codd, 2014)

Silindrospermopsinin protein sentezini engelleyebilen ve karaciğer gibi diğer hayati organlara etkileri olan bir toksin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca genotoksik olup, kromozom kaybına ve DNA'da zincir kırılmasına neden olduğu belirlenmiştir (Kaushik ve Balasubramanian, 2013).

Silindrospermopsin, hepatotoksik, nefrotoksik ve genel sitotoksik özelliklere ve aynı zamanda kanser oluşturma potansiyeline sahiptir (Runnegar vd, 2002; Froscio vd, 2003; Boopathi ve Ki, 2014). Silindrospermopsin, protein sentezi, sitokrom P450 ve glutatyon sentezinin inhibisyonu ile hücrelerin ölümüne yol açabilir (Runnegar vd, 1995; Boopathi ve Ki, 2014). Silindrospermopsin ile yapılan fare deneylerinde karaciğer, böbrek, akciğer ve bağırsağın etkilendiği görülmüştür (Boopathi ve Ki, 2014).

Silindrospermopsinin diğer etkileri; mikronukleus indüksiyonu, kromozom kaybı, tümör başlatılması ve fetal toksisitedir (Humpage vd, 2005; Falconer ve Humpage, 2001; Rogers vd, 2007; Boopathi ve Ki, 2014). Avustralya Palm adasında 1979 yılında 139 çocuk ve 10 yetişkinin, siyanobakterileri ortadan kaldırmak için algesid ile muamele edilen içme suyunun tüketiminden sonra hepato-enterit şikâyetiyle hastaneye başvurduğu ve bu salgına, siyanobakteriyel hücre ölümü sonrasında su içine silindrospermopsin salınmasının neden olduğu bildirilmiştir (Byth, 1980; Boopathi ve Ki, 2014).

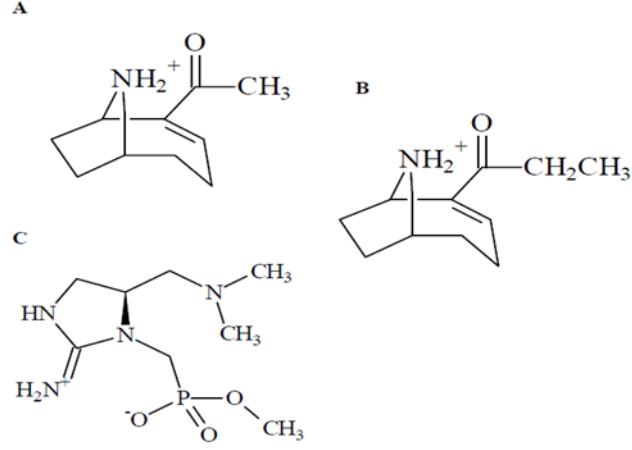
Silindrospermopsin biyosentezi *cyr* gen kümesi ile yapılmaktadır. Bu gen kümesi hakkında bilgi sağlamak için *Cylindrospermopsis raciborskii* suşları, *Aphanizomenon* sp. 10E6 ve *Oscillatoria* sp. PCC 6506 dâhil çeşitli siyanobakterilerle çalışılmıştır. Bu gen kümesi, silindrospermopsin eksport, regülasyon ve biyosentezi için fonksiyonel genleri kodlayan 15 ORF (*cyr* A-O) içerir

ve yaklaşık 42 kb' dır (Boopathi ve Ki, 2014). Diğer bir çalışmada toksik ve non-toksik suşların genomları karşılaştırılmış, *cyr* gen kümesinin non-toksik suşlarda tamamının olmadığı ve toksik suşlarda mutasyonların ve değişimlerin *cyr* kümesinin toksin sentezini etkilemediği gösterilmiştir (Sinha vd, 2014). Bu gen kümesi silindrospermopsin, üreten siyanobakteriyel cinsler arasında son derece korunmuştur. Ancak *cyr* gen kümesinin düzenlenmesi farklı cinsler arasında değişmektedir. *Oscillatoria* PCC6506'da *cyr* kümesindeki *cyrO* geni yok olmuştur. Ayrıca *cyr* kümesinin horizontal gen transferiyle sağlanmış olabilebileceği ileri sürülmüştür (Stüken ve Jakobsen, 2010). Silindrospermopsin biyosentezi, NRPS/PKS tip enzimler, amidino transferaz ve diğer "tailoring" enzimler dahil olmak üzere çok sayıda kompleks enzimi içerir (Boopathi ve Ki, 2014).

### 2.5.5 Anatoksin

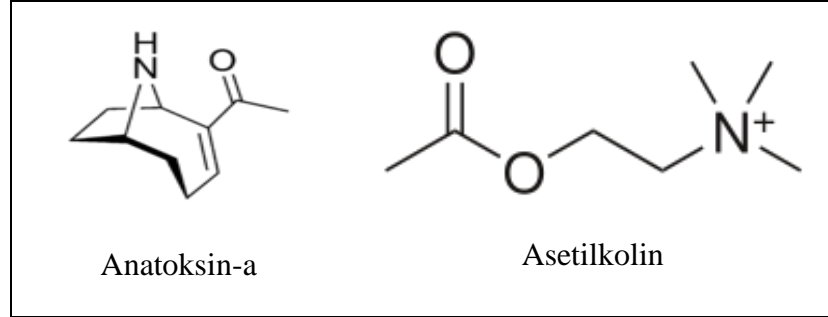
Anatoksin, *Anabaena*, *Oscillatoria* ve *Aphanizomenon* dâhil olmak üzere çeşitli siyanobakteri cinsleri tarafından üretilen alkaloitlerdir. Anatoksin, anatoksin-a, homoanatoksin-a ve anatoksin-a(s) olmak üzere yapısal olarak üç gruba ayrılmaktadır. Anatoksin-a, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Planktotrix*, *Microcystis*, *Oscillatoria* ve *Cylindrospermum* dâhil olmak üzere çeşitli siyanobakteri cinsleri tarafından üretilirken, Anatoksin-a(s) sadece *Anabaena* sp. tarafından üretilmektedir (Boopathi ve Ki, 2014).

Anatoksin-a tatlı su siyanobakterilerinde kimyasal ve fonksiyonel olarak tanımlanmış ilk toksindir. Bugüne kadar, anatoksin-a (ATX-a), homoanatoksin-a (hATX-a) ve anatoksin-a(s) (ATX-a(s)) siyanobakterilerden tanımlanan en yaygın anatoksin varyantlarıdır. Anatoksin-a (165 Dalton) ve homoanatoksin-a (179 Dalton) sekonder aminlerdir. hATX-a keton yapısındaki metilasyon bakımından anatoksin-a'dan farklıdır. Anatoksin-a(s)'nin moleküler ağırlığı 252 Daltondur ve siklik n-hydroxyguanidine fosfo ester yapısı farklıdır (van Apeldoorn vd, 2007; Sivonen ve Jones, 1999; Boopathi ve Ki, 2014). Şekil 2.6'da anatoksin ve varyantlarının yapısı görülmektedir.



Şekil 2.6. Siyanobakteriyel nörotoksinler. (A) anatoxin-a, (B) homoanatoxin-a ve (C) anatoxin-a(s) (Metcalf ve Codd, 2014)

Bu toksinlerin nörotoksitesisi, ortak bir memeli nörotransmitteri olan asetilkolini taklit etme yeteneğinden kaynaklanır. Bu taklit yeteneğinden dolayı anatoxin-a asetilkolin reseptörüne bağlanabilmektedir. Yüksek dozda anatoxin, solunum yolu işlev bozukluğuna yol açar, kas fonksiyonlarını etkiler ve ölüme neden olur (Boopathi ve Ki, 2014). Şekil 2.7’de anatoxin ve asetil kolinin kimyasal yapıları gösterilmiştir.



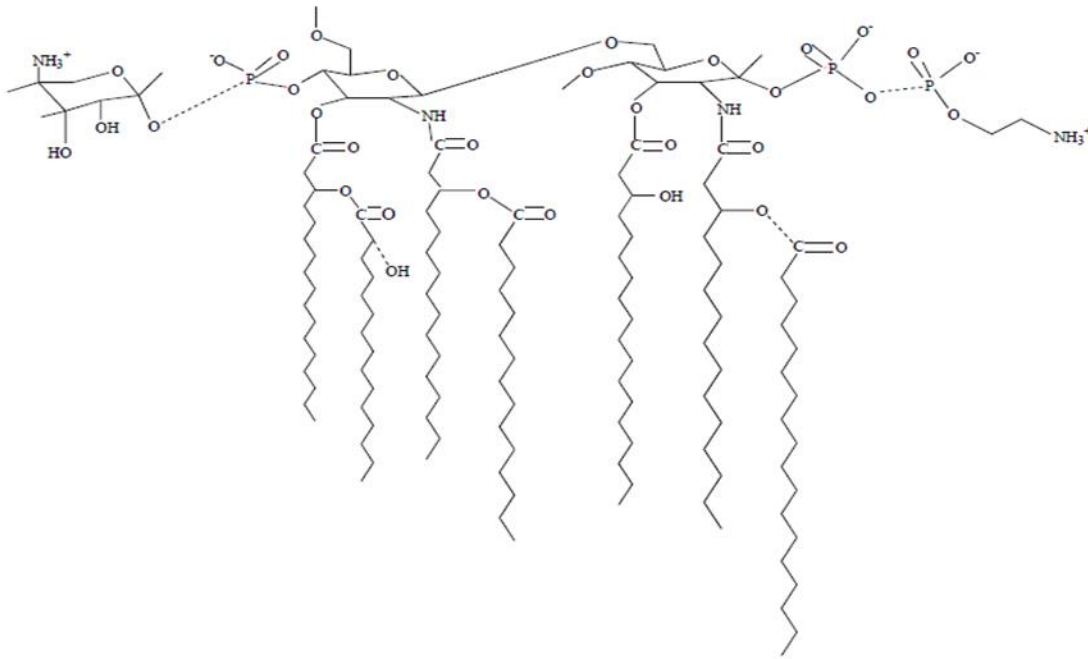
Şekil 2.7. Anatoxin ve asetil kolinin kimyasal yapısı (Anonymus-2)

Anatoxin-a ve varyantlarının farklı hayvan zehirlenmelerine neden olduğu rapor edilmiştir. Anatoxin-a(s)’nin hipersalivasyona (tükürük artışına) neden olduğu bildirilmiştir. Anatoxin-a(s), anatoxin-a’dan daha etkili bir toksindir. Hayvanlarla yapılan deneylerde oral yolla verilen anatoxin-a’nın LD<sub>50</sub> değeri 375 µg/kg, anatoxin-a(s)’nin ise 20 µg/kg olduğu bildirilmiştir (Boopathi ve Ki, 2014). Anatoxin-a’nın paration ve malation gibi sentetik organofosfat insektisit etkisi de vardır (Metcalf ve Codd, 2014).

Anatoksin-a ve varyantları, NRPS tarafından prolinin eklenmesiyle sentezlenmektedir. Zincir uzatma ve siklizasyon PKS tarafından yapılmaktadır. Besin sınırlaması, ışık, sıcaklık ve farklı büyüme fazlarının anatoksin sentezinde, değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir. Azot açlığında diğer siyanobakteri toksinlerinde olduğu gibi anatoksin üretimi de artabilir (Boopathi ve Ki, 2014).

## 2.5.6 Lipopolisakkarit endotoksinler

Gram negatif bakteriler standart bir özellik olarak lipopolisakkarit toksin üretme potansiyeline sahiptir. Gram negatif bakteriler ve siyanobakteriler, hücre duvarının temel bir bileşeni olarak lipopolisakkarit üretirler. Lipopolisakkarit üç ana bölümden oluşmaktadır: O antijenleri, öz lipopolisakkarit ve lipit A kısmı. Bakteriye lipopolisakkaritlerin ısıya dayanıklı ve memelilerde toksisiteye neden olduğu görülmüştür. Lipit-A bölgesi, memelilerde ateş, kusma, ishal ve hipotansiyona neden olan toksik etkilerden sorumludur. Lipopolisakkarite maruz kalma sonucunda ateşe bağlı olarak vücut içinde pirojenik bileşikler serbest bırakılır (Metcalf ve Codd, 2014). Şekil 2.8’de lipopolisakkarit endotoksinin lipit A bölgesi görülmektedir.

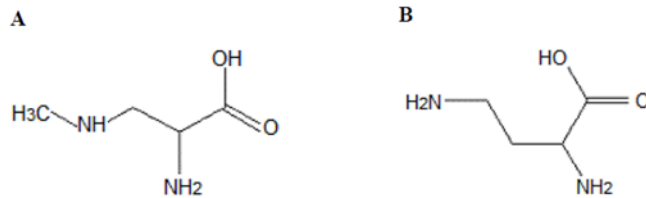


Şekil 2.8. Lipopolisakkarit endotoksinin lipit A bölgesi (Metcalf ve Codd, 2014)

### 2.5.7 $\beta$ -N Metil Amino-L-Alanin (BMAA)

Bitkiler, algler ve funguslar gibi siyanobakteriler de 20 standart amino asitten farklı aminoasitler de üretmektedir. 1960'lerde simbiyotik siyanobakterilerde keşfedilen  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine (BMAA) amino asitinin, serbest yaşayan siyanobakteriler tarafından da üretildiği tespit edilmiştir. In vitro ve in vivo'da gerçekleştirilen deneyler ile bu amino asitlerin nörotoksik olduğu belirlenmiştir (Weiss vd, 1989; Metcalf ve Codd, 2014). BMAA alımıyla insan nörolojik hastalığı olan motor nöron hastalığı olarak da bilinen amiyotrofik lateral sklerozun (ALS) ilişkili olduğu bulunmuştur. BMAA'nın, protozoa, tuzlu su karidesi ve balık larvalarında akut toksisiteye neden olduğu bilindiğinden doğal ve içme sularındaki BMAA konsantrasyonunun incelenmesi önerilmektedir (Purdie vd, 2009; Metcalf ve Codd, 2014).

İkinci bir nörotoksik amino asit 2,4-diaminobutirik asit (DAB), BMAA ile aynı moleküler ağırlığa ve elementel kompozisyona sahiptir fakat farklı yapısal düzenleme ile BMAA'dan farklılık göstermektedir. Ayrıca DAB'ın siyanobakterilerde de mevcut olduğu gösterilmiştir. DAB, siyanobakterilerle sınırlı olmamasına rağmen BMAA genellikle siyanobakteriler tarafından üretilen bir nörotoksindir (Metcalf ve Codd, 2014). Şekil 2.9'da BMAA ve DAB'ın kimyasal yapıları görülmektedir.

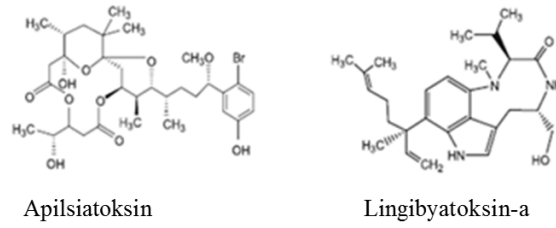


Şekil 2.9. BMAA ve DAB amino asitlerinin kimyasal yapısı. A) BMAA, B) DAB (Metcalf ve Codd, 2014)

### 2.6 Diğer Siyanobakteri Toksinleri

Siyanobakteriler, biyolojik olarak aktif başka bileşikler de üretme potansiyeline sahiptir. Bu tür aktivite ile deri ve gastrointestinal sistem tahrişi ve enzim inhibisyonu toksik etkiler arasında yer almaktadır. Aplysiatoksin ve lyngbya toksinleri içeren bazı denizel siyanotoksinler deride tahrişe neden olmakta ve protein kinaz enzimini inhibe etmektedir (Rohrlack vd, 2004; Metcalf ve Codd, 2014).

Siyanobakteriler tarafından üretilen biyoaktif ürünlerin içinde anabaenopeptinler, cyanobacterinler, fischerellinler ve nostocyclomide bulunmaktadır. Yapılacak olan araştırmalarla siyanobakteriyel hücrelerde, toksik potansiyeli olan başka bileşiklerin keşfedilmesi ve tanımlanması muhtemeldir. Örneğin; siyanobakterilerden terotojenik potansiyeli olan retinoik asit benzeri bileşikler üretenler dâhil yeni siyanotoksinler ortaya çıkmıştır (Metcalf ve Codd, 2014). Şekil 2.10’da apilsiatoksin ve lingibyatoksin-a kimyasal yapıları görülmektedir.



Şekil 2.10. Apilsiatoksin ve lingibyatoksin-a'nın kimyasal yapısı (Anonymus-2)

## 2.7 İnsanların Siyanotoksinler ile Teması ve Sağlığa Etkileri

İnsanların siyanotoksinlere teması başlıca şu yollarla olmaktadır: kontamine olmuş içme suyunun yanlışlıkla vücuda alımı, soluk alma (inhalasyon) veya burun mukoza membranı ile temas, banyo, yüzme ve kano gibi eğlence aktiviteleri sırasında toksinler ile dermal temas, siyanotoksin içeren su ile sulanmış meyve ve kontamine olmuş sebzelerin tüketimi, kontamine sularda yaşayan akuatik (sucul) organizmaların tüketimi (balık, kabuklu deniz ürünleri v.s), siyanobakteri diyet takviyelerinin oral yolla alımı (siyanotoksin düzeyleri kontrol edilemez ise), diyaliz ile spesifik intravenöz yol (damar içi yol) ile alınımıdır (Drobac vd, 2013).

### 2.7.1 Kontamine içme suyunun içilmesi

Kontamine içme suyunun içilmesi siyanotoksin alımının sık karşılaşılan bir yoludur. Su, siyanobakteriyel “bloom” sırasında su kaynağının yüzeyinden elde edilirse, hücrelerin parçalanması esnasında toksin salınımı ile suyun kontaminasyonu mümkündür. Sudan siyanotoksinlerin büyük miktarda alınımı veya uzun süreli küçük dozlarda alınımı yani kronik maruziyet sonucu insan sağlığı riskini arttırmaktadır. İçme suyundaki hepatotoksinler, primer karaciğer kanseri (PLC) için bir risk faktörü olabilir, sınırlı sayıdaki epidemiyolojik çalışmalar bu sorun ile karşı karşıya



kalmıştır. Mikrosistin, PLC gelişiminde önemli bir kimyasal ve dış faktör olabilir (Drobac vd, 2013).

### **2.7.2 Dermal temas ve nefes alma yolu ile maruziyet**

Dermal temas, siyanobakteriyel bloomun var olduğu eğlence sularında oluşur. Eğlenme amaçlı sularda siyanobakteriyel toksin ile temas sonucunda şu semptomlar görülmektedir: derinin pul pul dökülmesi, deri döküntüsü, astım, zatürre, kuru öksürük, kusma ve diğer gastrointestinal semptomlar, saman nezlesi, konjuktivit, kulak ve gözde tahriş, alerjik reaksiyonlar, şiddetli baş ağrısı, baş dönmesi, kas ağrısı, ağızda kabarcıktır. Japonya, Hawaii, Avustralya ve Florida'nın kıyı sularında bu belirtiler rapor edilmiştir.

Rekreasyon sırasında, bir potansiyel temas yolu da inhalasyondur. Belirli deniz ve tatlı su "bloom"larına maruz kaldıktan sonra solunum zorluğu rapor edilmiştir. Mikrosistin-LR farelere intranazal uygulaması; karaciğer hasarına, burunda nekroza neden olmuştur (Drobac vd, 2013).

### **2.7.3 Karasal ve sucul bitkiler yolu ile temas**

Bitkileri sulamada siyanobakteri içeren su kullanılması ile ya da sucul bitkiler doğrudan siyanotoksin ile temas edebilir. Dolayısıyla hem bitki verimi hem de kalitesi etkilenir. Ayrıca mikrosistin absorpsiyonu tavsiye edilen tolere edilebilir sınırını aşarsa, toksinden etkilenen bitkiler, insan ve hayvan sağlığı için risk oluşturabilir.

Daha önce yapılan araştırmalar siyanotoksinlerin bitkiler üzerine olumsuz etkileri olabileceğini ortaya koymuştur. Fidelerin siyanotoksinlere maruz kalması, çeşitli karasal bitkilerin büyümesini inhibe etmektedir. Mikrosistin-LR gibi siyanobakteriyel ekstraktlarının buğday (*Triticum durum*), mısır (*Zea mays*), bezelye (*Pisum sativum*) ve mercimek (*Lens esculenta*) gibi kültür bitkilerinin mineral besin alımı, verimlilik, fotosentez faaliyeti, büyüme ve gelişimini etkilediği bulunmuştur. Sucul bitkilerin (hem su altı hem su üstü bitkileri), mikrosistin-LR'nin düşük dış konsantrasyonlarını absorbe ettiği ve toksini sürgün dokusunda biriktirdiği rapor edilmiştir. Sucul bitkiler MC-LR'ye maruz bırakıldığında, klorofil pigmentleri hasar gördüğünden, büyüme ve fotosentetik oksijen üretiminin inhibe edildiği görülmüştür (Drobac vd, 2013). Peuthert vd (2007), onbir tarım bitkisinin fidelerinin kökleri

tarafından MC-LR ve MC-LF alımı olduğunu rapor etmişlerdir. Sulama yoluyla mikrosistine maruz kalan kara bitkilerinin insan sağlığı üzerinde toksik etki gösterdiği ileri sürülmüştür. (Peuthert vd, 2007). Pirinç tarlalarındaki siyanobakteriler atmosferden azot fiksasyonu ve pirinç bitkileri için önemli bir azot kaynağı sağlayabilir. Ancak bu bitkilerin mikrosistin alımı mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Drobac vd, 2013).

#### **2.7.4 Sucul besin ağı yolu ile temas**

İnsan tüketimi için kullanılan sucul hayvanlarda siyanotoksinlerin biyolojik birikimi meydana gelebilir. Mikrosistin, tatlı su karidesi (*Palemon modestus*, *Macrobrachium nipponensis*) ve kırmızı bataklık kerevitinde (*Procambarus clarkii*) tespit edilmiştir. Deniz ortamlarında ise saksitoksin inci istiridyede (*Pinctada maxima*) tespit edilmiştir. Ayrıca, silindrospermopsin iki kabukluların hemolenfinde, iç organlarında, gonadlarında ve ayaklarında tespit edilmiştir. Siyanotoksinlerin biyolojik birikimi ve insanlara ulaşması akuatik besin zinciri ile sağlanır. Sucul besin zincirinin en tepesinde olan balık muhtemelen siyanotoksinlere en çok maruz olandır. Toksin balığın karaciğer, kas, solungaç, bağırsak ve böbreklerinde birikebilir. Balıklar beslenme veya solunum yoluyla siyanotoksinlere maruz kalmaktadır.

Mikrosistin, karaciğer tarafından alınır, protein fosfatazları inhibe eder, normal hücrel aktiviteyi bozar. Hayatın erken dönemlerinde (embriyonik) mikrosistine maruz kalma, normal embriyonik gelişmeyi bozabilir, hayatta kalma ve büyüme oranını düşürebilir ve bazı histopatolojik etkilere neden olabilir (genişlemiş ve opak vitellüs kesesi, küçükbaş, kavisli gövde ve kuyruk, hepatobiliyer anormallikler, hepatositlerde ultra yapısal değişiklikler, kalp atış hızı düzensizlikleri gibi). Genç ve yetişkin balıklarda, mikrosistin teması büyüme oranı ve osmotik regülasyonu etkileyebilir, kalp hızını ve serumdaki karaciğer enzim aktivitesini arttırabilir; karaciğer, bağırsak, böbrek, kalp, dalak ya da solungaçlarda histopatolojik değişmelere neden olur; davranışlarını değiştirebilir. Bu anormallikler siyanotoksinin dozuna ve temas yoluna bağlı olarak değişir. Düşük mikrosistin konsantrasyonuna maruziyet sonucu (10 µg-100 µg) sazan hepatositleri apoptoz yoluyla ölürken, daha yüksek konsantrasyonlarda (1000 µg) ise nekroz yoluyla öldüğü tespit edilmiştir. Histopatolojik incelemeler, siyanobakteriyel toksinlerin balıkları öldürme yeteneğine

sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu toksinlerin; balıkların karaciğeri, iç organları ve kaslarında biriktiği tespit edilmiştir (Drobac vd, 2013).

Romo vd (2012), ticari *Liza* sp. (kefal) türlerinde balık dokularında toksin birikimini araştırmışlar ve karaciğer, bağırsak, solungaç ve kaslarda yüksek mikrosistin konsantrasyonlarını bulmuşlardır. Ayrıca farklı balık türlerinde farklı miktarlarda mikrosistin birikimi olduğu bulunmuştur. Xie vd (2005), yaptıkları bir çalışmada mikrosistin içeriğinin karnivor balıkların kas ve karaciğerinde en yüksek olduğu ve bunu omnivor balıklar takip ederken, en düşük mikrosistin konsantrasyonunun ise herbivor balıklarda olduğu bulunmuştur. Bu sonuç mikrosistin balıklarda besin zincirinde yukarı doğru artan bir birikim yapıyor olabileceğini göstermektedir (Xie vd, 2005; Drobac vd, 2013).

### **2.7.5 Siyanobakteriyel besin takviyeleri yolu ile siyanotoksine temas**

Siyanobakterilerin besin olarak tüketimi, zengin protein içeriği nedeniyle tercihen kullanılmaktadır (örneğin *Spirulina*, *Nostoc*, *Aphanizomenon flos-aquae*). Mavi-yeşil alg takviyeleri (BGAS), detoksifikasyon, kilo kaybı, yüksek enerji gibi yararlı sağlık etkilerinden dolayı sanayileşmiş ülkelerde satılmaktadır. Ayrıca bu ürünlerin çoğu dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu olan çocuklarda farmakolojik tedavi olarak kullanılmaktadır. Bu ürünler hap, kapsül ve toz haline getirilmekte ve herhangi bir tıbbi konsültasyon olmadan tüketilebilmektedir. Bu ürünler doğal olduğu için güvenli olduğu kabul edilmekte ve dolayısıyla BGAS yüksek dozlarda ve uzun süre alınabilmektedir. Ancak bunların bulantı, kusma ve ishal gibi belirtiler dâhil olmak üzere sağlığa olumsuz etkileri olabilir. Bununla birlikte BGAS ürünlerinde iz miktarda siyanotoksin bulunmuştur. *Spirulina* toksik değildir, ancak *Spirulina* tabanlı BGAS'larda epoksiyanotoksin-a ve dihydrohomoanatoksin-a tespit edilmiştir. Ayrıca *Spirulina* tabanlı BGAS tüketiminin orta yaşlı Japonlarda karaciğer hasarına neden olduğu düşünülmüştür. *Aphanizomenon flos-aquae* türünün anatoksin-a ve saksitoksinin yanı sıra BMAA da ürettiği tespit edilmiştir. *Aphanizomenon flos-aquae* genellikle doğal göllerde *Microcystis* gibi diğer siyanobakteriyel türlerle bir arada bulunur. Bu da BGAS tüketicilerinin, mikrosistin ve diğer toksinlere maruz kalabileceği anlamına gelmektedir (Drobac vd, 2013).

### **2.7.6 İntravenöz yol ile siyanotoksinlere temas**

1996 yılında Brezilya Caruaru'daki hemodiyaliz merkezinde bir olay gerçekleşmiştir. Rutin hemodiyaliz tedavisinden sonra hastaların çoğu (131 hastadan 116'sı) görme bozukluğu, bulantı, kusma ve kas güçsüzlüğü yaşamıştı. Belirli bir süre sonra, 100 hastada akut karaciğer yetmezliği gelişmiş ve Caruaru sendromu adı verilen bu vaka nedeniyle hastaların 52'si ölmüştür. Mikrosistin tüm hasta serumlarında ve karaciğer doku örneklerinde tespit edilmiştir. Silindrospermopsin, kliniğin su arıtma sistemindeki karbon ve reçinelerde de tespit edilmiştir. Dahası, siyanobakterilerin yerel su rezervuarlarında önemli bir oranda mevcut olduğu ortaya çıkmıştır. Sonuçta bu hastaların ölüm nedeninin mikrosistin (MC-YR, MC-LR, MC-AR) ile intravenöz maruziyet olduğu sonucuna varılmıştır (Drobac vd, 2013).

### **2.8 Siyanobakteriyel Toksinlerin Tespit Yöntemleri**

Toksik siyanobakteriler ürettikleri toksik maddeler nedeniyle insanlar, hayvanlar ve sucul çevrelerle ilişkili diğer organizmalar için önemli bir tehlike oluşturmaktadır. Siyanotoksin içeren suları iyileştirmek ve siyanotoksinlere maruz kalma yoluyla insan sağlığına riskini en aza indirmek için siyanotoksinlerin tespitinde hassas ve güvenilir yöntemler gereklidir. Siyanobakterilerin analizi için bugüne kadar çok sayıda tarama yöntemi ve analitik teknikler geliştirilmiştir. Ancak kapsamlı olarak siyanobakterilerin tüm varyantlarının belirlenmesi için uygun olan tek bir analitik yöntem henüz mevcut değildir. Literatürde bildirilen yöntemlerin bazıları doğrudan su örneklerindeki siyanotoksin varlığını tespit etmeye yönelik iken diğerleri toksik siyanobakteri gruplarını tespit ederek toksin varlığını dolaylı olarak belirleme esasına yöneliktir. Uygulanmakta olan direkt metotlar başlıca iki grup altında incelenir: Biyolojik veya biyokimyasal tarama yöntemleri ve fizikokimyasal yöntemler (Kaushik ve Balasubramanian, 2013).

Yakın zamanlarda, çevresel örneklerden siyanotoksin tespiti için farklı yaklaşımlar ve metotlar geliştirilmiştir. Araştırmaların çoğu, hepatotoksinler, özellikle de mikrosistin üzerine odaklanmıştır. Mikrosistinler diğer siyanotoksinlere göre su kaynaklarında daha yaygın olarak bulunmaktadır. Son zamanlarda geliştirilen moleküler yöntemler ve biyosensörler, duyarlı, spesifik ve basit olması yanında siyanotoksinlerin uygun maliyetle, farklı çevresel örneklerden tespiti ve ölçümü için büyük umut vaat etmektedir (Kaushik ve Balasubramanian, 2013).

### 2.8.1 Biyolojik analizler

Biyolojik deneyler ve toksisite testleri, biyolojik ve genel olarak toksik etkilere göre örneklerin basit ve hızlı taranmasını sağlar. Mikrosistin için en popüler tarama yöntemi üç geniş kategoriye ayrılabilir: Tam organizma biyoanalizleri, biyokimyasal analizler ve immünolojik analizler (Kaushik ve Balasubramanian, 2013).

#### Tam organizma biyoanalizleri

Bu kategoriler altındaki basit bir tarama yöntemi fare deneyleridir, spesifiktir ancak düşük duyarlılığa sahiptir. Bundan dolayı, su örnekleri için uygulanamaz. Fare biyodeneğinde toksin ekstraktları, fareye intraperitoneal enjeksiyon yolu ile tatbik edilir. Bu deney, temel olarak "bloom" materyalinin toksisitesini belirlemek için kullanılmıştır ve verilen yanıtta göre toksinin sınıfı belirlenebilmiştir. Bu yöntem genel olarak "bloom"ların toksik veya non-toksik olduğunun kalitatif olarak tespitinde kullanılmaktadır. Sadece örneklerin genel toksisitesini gösterir, toksisiteden sorumlu toksin hakkında bilgi sağlayamaz (Kaushik ve Balasubramanian, 2013).

Yine de yakın zamana kadar örneklerdeki hepatotoksin varlığını tespit etmek için çoğu laboratuvarında fare biyodeneği kullanılmıştır. Bu testte, MC-LR standart olarak kullanılmış ve sonuçlar, MC-LR toksisitesinin eşdeğeri cinsinden ifade edilmiştir. Düşük duyarlılık ve spesifiklik sınırlamalarının yanı sıra, deneylerde ayrıca, çok sayıda fare kullanılması gerekmekte, toksisite testlerinde hayvanların kullanılmasına karşı toplum tepkisi de artmaktadır. Fare biyodeneği için en cazip alternatif ve mikrosistin için en yaygın kullanılan omurgasız biyodeneği, tuzlu su karidesi (*Artemia salina*) deneyidir. Ancak fare biyoanalizlerinde olduğu gibi tuzlu su karidesi deneyi de mikrosistin için spesifik değildir (Kaushik ve Balasubramanian, 2013).

#### Biyokimyasal analizler

Mikrosistin ve nodularin gibi siyanotoksinler, fosfoproteinlerin hücre içinde defosforilasyonundan sorumlu serin ve treonin fosfataz enzimlerini inhibe ederek etkisini gösterir. Bu toksinler tarafından reaksiyonun inhibisyonu, toksin konsantrasyonunun ölçülmesinde kullanılabilir. Protein fosfataz deneyleri, fosforlanmış protein substratlarından, mikrosistin fosfat salınımı üzerine inhibitör etkisinin ölçümünü kapsar. Mikrosistin ve nodularin tarafından fosfatazların

inhibisyonu radyoaktif işaretli fosfat ( $^{32}\text{P}$ ) kullanılarak belirlenebilir. Bu yöntem hassas olmasına rağmen önemli bir dezavantaja sahiptir:  $^{32}\text{P}$  izotopunun yarılanma ömrünün kısa olmasıdır (yaklaşık 14 gün). Bir diğer sınırlama, bu proteinlerin ticari olarak kullanımının olmaması ve bunların hazırlanması için, oldukça gelişmiş prosedürlerin gerekliliğidir. Ayrıca bu enzimlerin pahalılığı nedeniyle test kullanışlı değildir. Protein fosfataz deneyindeki sınırlamalardan biri, calyculin A ve okadaik asit gibi çevredeki diğer ilgisi olmayan protein fosfataz inhibitörleri ve mikrosistinlerin etkisi arasındaki farkın ayırt edilmesinin zor olmasıdır (Kaushik ve Balasubramanian, 2013).

### İmmünolojik analizler

İmmünolojik analiz, antijen-antikor reaksiyonu kullanılarak bir numunedeki bir maddenin konsantrasyonunu ölçen bir biyokimyasal testtir. İmmünolojik deneyler WHO kılavuzundaki seviyelerin ( $4 \mu\text{g/L}$ - $1 \mu\text{g/L}$ ) mikrosistin izlenmesi için yeterlidir, spesifiktir ve gerçekleştirilmesi basittir. Peptit siyanotoksinler için ELISA gibi tarama yöntemleri geliştirilmiş ve hassaslığı kanıtlanmıştır. Çeşitli diagnostik ELISA kitleri piyasada bulunmaktadır (örneğin; Abraxis LLC, Philadelphia, PA; Wako Chemicals, Osaka, Japan) (Kaushik ve Balasubramanian, 2013).

### **2.8.2 Analitik metotlar**

Yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC), kapiller elektroforez (CE), nükleer manyetik rezonans (NMR), kütle spektrofotometrisi (MS) ile birlikte likit kromatografi (LC) veya gaz kromatografisi (GC), MALDI-TOF-MS (Matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry) gibi analitik teknikler, siyanotoksinlerin tespitinde kullanılmaktadır. Bu teknikler, arttırılmış hassasiyetleri ile bilinen toksinlerin tespiti için kullanılmaktadır. Biyolojik ve çevresel matrislerdeki anatoksin gibi nörotoksinlerin tespiti, hepatotoksinlere kıyasla daha az ilgi görmüştür. Nörotoksinlerin hızlı bozulması, analitik standartların ticari kullanılabilirliğini azaltması gibi bazı sorunlar oluşturur (Kaushik ve Balasubramanian, 2013).

### Kromatografik yöntemler

Siyanotoksinlerin rutin analizinde HPLC kullanılır. Ters faz C18 kolonu, amid C16 kolonu, iç yüzü ters faz kolonu veya iyon değişim kolonu dâhil olmak üzere farklı hareketsiz fazlar kullanılmaktadır. Mobil faz (hareketli faz) olarak, metanol veya

asetonitril içeren sulu fazlar kullanılmaktadır. Mobil fazda uygun bir seçim yapıldığında analitlerin iyi çözülmesine yol açar ve bu doğru bir tespit için ön koşuldur. Örneğin, MC-LR ve MC-YR için en uygun mobil faz asetonitril/amonyum asetatıdır, ancak metanol tabanlı mobil fazlarda da çözülebilir (Kaushik ve Balasubramanian, 2013).

#### Kapiller elektroforez (CE)

Mikrosistin, kapiller elektroforez kullanılarak da ayrılabilir. Bu teknikte, toksinler moleküler büyüklüklerine ve yüklerindeki farklılıklara göre ayrılır. Bu teknik, HPLC ile karşılaştırıldığında çok küçük örnek hacimleri kullanılabilir (Kaushik ve Balasubramanian, 2013).

#### MALDI-TOF-MS tekniği

MALDI-TOF-MS tekniği, tek *Microcystis* kolonisi gibi çok küçük örneklerdeki mikrosistin varyantlarının belirlenmesi ve tespiti için güvenilir ve hızlı bir araç olarak ortaya çıkmıştır. Analiz için gerekli olan numunenin az miktarlarda ve siyanotoksinler saflaştırılmaksızın kullanılabilirdiği için avantajlı bir tekniktir. Sayısal verilerdeki yetersizliği ve bu nedenle toksin içeriğini belirlemede kullanılamaması ise dezavantajdır (Kaushik ve Balasubramanian, 2013).

### **2.8.3 Moleküler yöntemler**

Analitik ve biyokimyasal yöntemler, düşük hassasiyet, etik sorunlar ve yüksek maliyetleri nedeniyle alternatif test yöntemlerinin geliştirilmesini gerektirmiştir. HPLC ve MALDI-TOF-MS gibi hassas fizikokimyasal tanımlama yöntemleri siyanotoksinler için kullanılabilir ancak bu teknikler pahalı makineler ve saflaştırılmış toksin standartları ve karmaşık laboratuvar örnek hazırlama protokolleri nedeniyle oldukça zordur (Kaushik ve Balasubramanian, 2013).

DNA tabanlı tespit metotları; duyarlı, hızlı ve spesifik (toksin biyosentezinde rol alan hedef genler için) olması nedeniyle popüler hale gelmiştir. Böylece bu yöntemler toksin üreten siyanobakterilerin tespitinde doğrudan kullanılmaktadır. Moleküler metotlar söz konusu organizmanın kültürüne gerek kalmadan veri üretilebildiğinden, mikrobiyal çeşitlilik ve aktivite çalışmalarında yaygın bir popülerlik kazanmıştır. Toksik siyanobakterilerin tespiti için moleküler yöntemler kullanarak yapılan yayınların sayısı hızla artmaktadır (Neilan, 2002; Moffitt vd,

2001; Kurmayer vd, 2002; Tillett vd, 2001; Vaitomaa vd, 2003; Mikalsen vd, 2003; Castiglioni vd, 2004; Pearson ve Neilan, 2008).

#### Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR: Polymerase chain reaction)

PCR, siyanotoksin biyosentez genlerini hedef alan, su kaynağında bulunan siyanobakterilerin toksik popülasyonlarının belirlenebilmesi için hızlı ve duyarlı bir araçtır. PCR teknolojisi, DNA dizilemesi ve/veya restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP) analizi ile bağlantılı olarak özellikle *Microcystis* türlerinde filogenetik ağaçların yapımını sağlar. Bu teknik ayrıca belli suşların taranması ve çevresel örneklerde diğer genlerin kodladığı metabolitlerin varlığının belirlenmesi için kullanılmaktadır. DNA dizileme, *Anabaena*, *Microcystis* ve *Planktotrix* gibi başlıca üç büyük toksin üreticisinin *mcy* gen dizilerinin belirlenmesini sağlamıştır. *mcy* genlerinin dizisinin bilinmesi, primerlerin tasarımını ve spesifik algılama için problemlerin geliştirilmesini ve miktarları düşük bile olsa doğal örneklerdeki toksin üreten grupların tanımlanmasını sağlamıştır. Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) ve (RFLP)-PCR, siyanobakteriyel komünitelerdeki genotiplerin ayrımı için kullanışlıdır (Kaushik ve Balasubramanian, 2013).

#### Real-Time PCR (qPCR)

Hepatotoksin üreten siyanobakteriler arasında mikrosistin üreticileri, Real-time PCR kullanılarak detaylı olarak çalışılmıştır. Bunun nedeni, mikrosistin üreten siyanobakterilerin birçok ülkede su kalitesinde sorunlara neden olması ve yaygın olarak dağılımıdır. Real-time PCR ile mikrosistin üreten siyanobakterilerin tespiti hızlı ve hassastır. Bu teknik mikrosistin üreten hücreler için önerilmiştir. Real-Time PCR, toksin genlerinin çeşitli çevresel koşullara cevaben transkripsiyon seviyelerinin (artma/azalma) belirlenmesine yardım eder. Transkripsiyonel çalışmalar *mcy* genlerinin; kimyasal stres, büyüme fazı ve ışığa farklı tepkiler ortaya koyduğunu göstermektedir. qPCR, toksigenik suşların çoğalmasını inhibe/teşvik eden çevresel faktörlere bağlı olarak siyanotoksin üretimini düzenleyen fizyolojik ve ekolojik parametrelerin anlaşılmasını sağlar (Kaushik ve Balasubramanian, 2013).

#### Mikroarray teknolojisi

Oligonükleotit mikrodizileri (mikroçip), moleküler biyoloji çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. DNA mikroarray teknolojisi, mikrobiyal çeşitliliğin tespiti için yaygın olarak uygulanmaktadır. Mikroarrayler, nitrifikasyon bakterilerinin



kültürel analizi için ve saflaştırılmamış toprak ekstraktlarında 16S rRNA'nın doğrudan saptanması için kullanılmaktadır. Özellikle siyanobakteriyel çeşitliliği karakterize etmek için mikrodizilerin kullanılması oldukça yenidir. Bu yöntem çok hassastır ve PCR ile amplifiye edilmiş 16S rDNA'yı 1 femtomol (fmol) gibi düşük miktarlarda dahi algılayabilmektedir. Mikroarray tekniği, karışık çevresel örneklerdeki tüm potansiyel mikrosistin ve nodularin üreticilerini aynı anda tespit edebilen spesifik ve hassas bir yöntemdir (Kaushik ve Balasubramanian, 2013).

## **2.9 Siyanotoksinlerin Giderim Yöntemleri ve “Bloom” Kontrolü**

### **2.9.1 Siyanobakterilerin gideriminde kullanılan kimyasal ve fiziksel teknikler**

Siyanobakteriler ve bunların toksinlerinin iyileştirilmesi, bunları etkisiz hale getirmek veya ortadan kaldırmaktır. Bazı iyileştirme yöntemleri bazı siyanobakteriler için etkili diğerleri için etkili değildir.

Bakır sülfat ve ozonlama siyanobakteri “bloom”unu ortadan kaldırır ancak siyanobakteriyel hücrelerin lizisine neden olduğu için önerilmez. Klorlama, hücrelerin parçalanmasına ve dezenfeksiyon sırasında başka zararlı yan ürünlerin üretilmesi potansiyeline sahiptir. Potasyum permanganatın (KMnO<sub>4</sub>), toksin salınmasına neden olmadan *Microcystis* hücrelerinin giderilmesinde etkili olduğu görülmüştür. Toz haline getirilmiş aktif karbon (PAC), siyanobakteriyel hücrelerden toksin salınmasına neden olmadığından kullanılması tavsiye edilmektedir (Anonymus-3).

Standart içme suyu arıtma proseslerinin (koagülasyon, flokülasyon, sedimentasyon ve filtrasyon), hücre içi siyanotoksin giderilmesinde etkili olduğu görülmüştür. Koagülasyon, flokülasyon ve çözünmüş hava flotasyonu (DAF), sedimentasyondan daha etkilidir. Mikrofiltrasyon ve ultrafiltrasyon sağlam siyanobakteriyel hücrelerin kaldırılmasında son derece etkilidir. İçme suyundan hücre dışı toksinlerin uzaklaştırılması için, aktif karbon, membran filtrasyon ve kimyasal inaktivasyon (UV, dezenfektan ve oksidantlar) kullanılabilir.

Nanofiltrasyon ve ters osmoz, silindrospermopsin ve mikrosistin gideriminde etkilidir. UV ile iyileştirme, silindrospermopsin, anatoksin-a ve mikrosistini yok etmede etkilidir. UV, toksinlerin oksidatif ayrıştırılması için katalizör (titanyum dioksit) ile birlikte kullanılmıştır.

Klor, ozon ve  $KMnO_4$  gibi oksidantlar, mikrosistin inaktivasyonu için etkili bir mekanizmadır, fakat klorun etkinliği pH'ya bağlıdır. Farklı siyanotoksinleri klor farklı şekilde etkilemektedir, örneğin anatoksin-a inaktivasyonu için etkili bir yöntem olmadığı kanıtlanmıştır. Bununla birlikte pH 8'in altında ise klorlama mikrosistin ve silindrospermopsin inaktivasyonu için etkilidir (Anonymus-3).

Ozonlama, mikrosistin, anatoksin-a ve silindrospermopsin için iyi bir oksidanttır. Ancak etkisi pH'ya bağlıdır ve organik madde mevcudiyetinden etkilenebilir. Kloramin ve klor dioksit, mikrosistin, anatoksin-a ve silindrospermopsin için etkili değildir. Ozonlama, klorlama ve bakır sülfat kullanımıyla oluşan dezenfeksiyon yan ürünleri oluşumu başka bir potansiyel probleme neden olur. Siyanobakteri toksinlerinin su kaynaklarında önlenmesinin en etkili yolu "bloom"un önlenmesidir. Bunun içinde suya giren besin maddelerinin (azot, fosfor gibi) kontrolü esastır (Anonymus-3).

### **2.9.2 Siyanobakteriyel "bloomların" biyolojik giderimi**

Remediasyon için kullanılan biyolojik teknikler, güvenli olarak kabul edilir çünkü düşük çevresel etkilere neden olur, balık ölümleri ve bitki yaşamının bozulması gibi yan etkileri yoktur. Virüsler, bakteriler, aktinomisetler, atık biyomas, akuatik makrofitler, karasal bitkiler ve protozoa, siyanobakteriyel bloomların kontrolünde kullanılan potansiyel biyoajanlardır (Nandini, 2015).

#### Bakteriyel ajanlar

Siyanobakteriyel hücrelerin lizisine neden olarak siyanobakteriyel bloomları hızla azaltan çok sayıda bakteri bulunmaktadır. Bakterilerin, siyanobakterileri parçalaması üç şekilde gerçekleşebilir: kontakt lizis, hücre dışı bileşiklerin üretilmesi, entrapment (tuzak) lizis. Reim vd (1974), *Bacillus* spp.'nin yedi siyanobakteri cinsini parçalayabildiğini bulmuşlardır (*Anabaena* ve *Microcystis* dâhil) (Nandini, 2015). Wang vd. 2012 yılında yaptıkları benzer bir çalışmada *Rhodococcus* sp. strain p52'nin 4 günlük inkübasyon sonrası *Microcystis aeruginosa*'yı %93 oranında inhibe ettiğini bulunmuştur (Wang vd, 2013). Birçok bakteri test edilmiş ve siyanobakteri hücrelerini lizize etme yetenekleri gösterilmiştir. Bakteriyel ajanların kullanımı, pahalıdır ve uzman personel gerektirdiği için yaygın olarak kullanılan bir yöntem değildir (Nandini, 2015).

### Fungal ajanlar

Fungal ajanlar, siyanobakteriyel “bloom” kontrolündeki rolleri çok az incelenmiştir (paylaştıkları allelopatik ilişki nedeniyle). Çok az sayıda fungus denenmiştir. Wang vd 2010 yılında, beyaz rot fungus *Lopharia spadicea*'nın *Microcystis aeruginosa* ve *Microcystis flos-aquae*'yi inhibe edebildiğini bulmuşlardır. Jiao vd, (2010) tarafından *Trichaptum abietinum* 1302BG fungal suşun, yukarıda belirtilen siyanobakteri türleri ile birlikte kültüre edildiğinde benzer sonuçlara neden olduğunu gözlemişlerdir. Aynı ekip, göl kıyısındaki topraktan *Penicillium* izolasyonu yapmış ve *Penicillium*'un *Microcystis aeruginosa*'yı inhibe ettiğini gözlemiştir (Nandini, 2015).

### Siyanobakterilerin gideriminde kullanılan bitkiler

Makrofitler, su yakınında veya suda büyüyen sucul bitkilerdir. Makrofitler, su yüzeyinde yüzen halde veya suya batık bir şekilde bulunabilir. Makrofitler ve siyanobakteriler arasındaki allelopatik ilişki “bloom” kontrolü için oldukça faydalıdır. Makrofitler siyanobakteriyel bloomun biyokontrolü için en çok çalışılan ajanlardır çünkü bu bitkiler siyanobakteriler ile bir arada bulunurlar. Makrofit kullanılarak siyanobakterilerin inhibisyonu üzerine ilk çalışma 1949'a kadar uzanır, bu tarihte Hasler vd, *Elodea canadensis*'in (daha sonra *Anacharis canadensis* adı verilmiştir) ve *Potamogeton perfoliatus*'un siyanobakteri inhibisyon yeteneğini keşfetmişlerdir. *Ceratophyllum demersum* ve *Brasenia schreberi* ekstraktları, *Anabaena*'nın oluşturduğu “bloom”a eklendiğinde benzer inhibisyon etkileri gözlenmiştir. İlk çalışmalarda, makrofitlerin ve siyanobakteriler arasındaki ilişkinin anlaşılması için allelopatik etki üzerinde durulmuştur. Allelopatiden sorumlu metabolitlere genel olarak allelokimyasal denir. Makrofitler ile ilişkili ortak allelokimyasal, organik polifenollerdir. Makrofitler ve bunların allelokimyasalları; siyanobakteriyel yapıyı yok ederek, hücrelerin respirasyonunu etkileyerek, siyanobakteriyel hücrelerin fotosentezini bozarak veya hücrelerin enzimatik aktivitesini etkileyerek siyanobakteriyel “bloom” oluşumunu yok edebilir. Birçok çalışma, türe özgü makrofit olduğunu göstermiştir. Örneğin *Myriophyllum spicatum*, *Anabaena*'yı inhibe edemez fakat *Microcystis aeruginosa*, *Oscillatoria* ve *Scenedesmus*'u inhibe edebilir (Nandini, 2015).

### Karasal bitkiler

Karasal bitkilerin anti-siyanoakteriyel potansiyeli, sucul makrofitler ile karşılaştırıldığında daha az kullanılabilir. Karasal bitkiler arasında Çin tıbbında

kullanılan bitkiler en çok test edilmiştir. Cantrell vd, 2005 yılında *Haplophyllum sieversii*'nin üst kısımlarından anti-siyanobakteriyel bileşiklerin izolasyon ve tanımlanmasını başarmışlardır. Aynı yıl, Meepagala vd, (2005) *Ruta graveolens* köklerinde antialgal ve antisianobakteriyel bileşikler tespit etmişlerdir. 2007 yılında Jancula vd, siyanobakteriler üzerine Papaveraceae'nin beş türünün etkilerini değerlendirmişlerdir ve *Chelidonium majus*'un siyanobakterilerde önemli derecede toksik olduğu belirlenmiştir. 2009 yılında Purcaro vd, *Swinglea glutinosa* köklerinin ekstraktlarında görülen etil asetatın *Oscillatoria perornata*'yı inhibe ettiğini bildirilmişlerdir. Wang vd, 2015 yılında greyfurt kabuğu, nar kabuğu ve nar tohumlarının anti-siyanobakteriyel aktivite yeteneğini ortaya çıkartmış ayrıca bunlarda üç allelokimyasal tespit etmişlerdir. 2013 yılında Zhang vd, *Salvia miltiorrhiza*'dan izole ettikleri bileşiğin *Microcystis aeruginosa*'yı inhibe ettiğini gözlemişlerdir (Nandini, 2015).

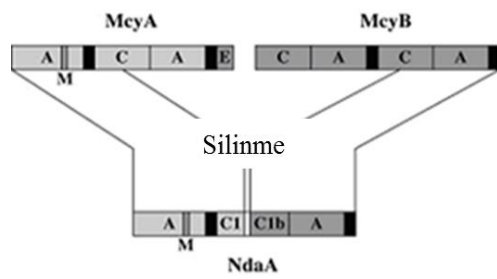
## 2.10 Siyanobakterilerde Hepatotoksin Genlerinin Evrimi

Siyanotoksin sentezini yöneten *mcy* ve *nda* gen kümeleri oldukça benzerdir. Yine de farklı siyanobakteriyel cinslerde bu biyosentetik gen kümelerinin dağılımı farklılık göstermektedir. Moffitt ve Neilan (2004) *Planktotrix agardhii*, *Microcystis aeruginosa* ve *Nodularia spumigena*'nın *nda* ve *mcy* gen kümelerinin karşılaştırmalı filogenetik analiz sonuçlarına göre siyanobakterilerdeki hepatotoksinin evrimi ile ilgili bir hipotez önermişlerdir. Çalışmalarının sonucunda, nodularin sentetazın, mikrosistin sentetazın ilkel atasından (progenitör) evrimleştiğini öne sürmüşlerdir. Nodularin sentezi tek bir türle sınırlı olsa da, mikrosistin, tek hücreli *Microcystis*, filamentli *Planktotrix*, filamentli heterosistli *Anabaena* dâhil olmak üzere siyanobakterilerin çeşitli cinsleri tarafından üretilir. Önceki çalışmalarda, *nda* gen kümesine *mcyA* ve *mcyB* genlerinin *Planktotrix* ve *Microcystis*'e eklenmesiyle mikrosistin nodularinden evrimleşmiş olabileceği önerilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda mikrosistin gen kümesindeki bazı genlerin silinmesiyle bu olayın gerçekleştirildiği varsayılmıştır. Hipoteze göre nodularin sentetaz, *mcyB* (1. NRPS) ve *mcyA*'nın (2. NRPS) silinmesiyle mikrosistin sentetazdan evrimleşmiştir. Hepatotoksin biyosentezinin evriminin karakterizasyonu için, *mcyH* ve *ndaI* (ABC transporter) genlerinin filogenetik analizi yapılmış ve sonuçlar 16S rDNA filogenisiyle karşılaştırılmıştır. 16S rDNA ve ABC transporter genlerinin filogenilerinin dal uzunluklarının karşılaştırmalı analizinde, *Planktotrix agardhii*

CYA 126/8 ve *Microcystis aeruginosa* PCC7806 arasındaki *mcy* gen kümelerinin transferinden önce *mcy* hattından ayrılarak *nda* hattının oluştuğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu bulgu, bir transpozon aracılığıyla suşlar arasındaki olası bir transferi desteklemektedir (Moffitt ve Neilan, 2004).

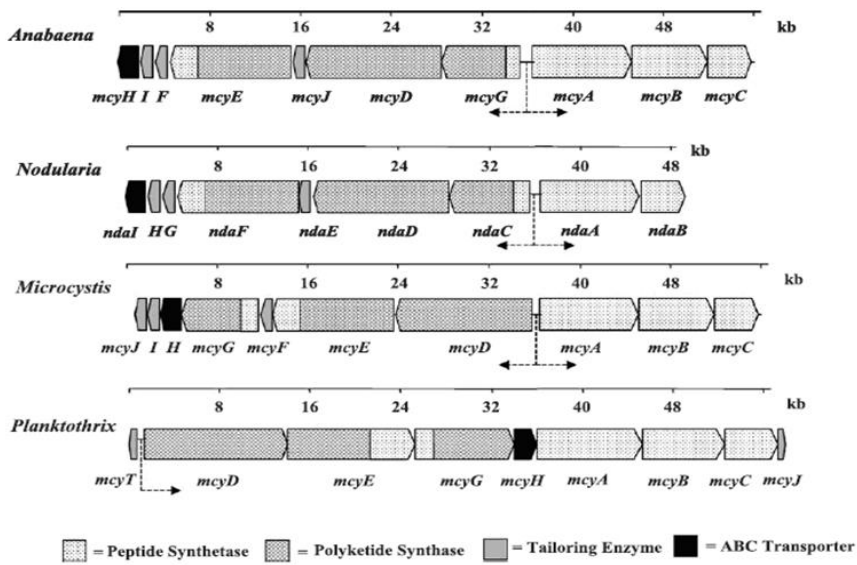
*Nodularia* genomuna transpozon aracılığıyla *myc* gen kümelerinin transferi sırasında veya daha sonraki bir silinme olayı ile *ndaA* geni meydana gelmiş olabilir ve iki NRPS modülünün kaybı [*mcyB* (1. NRPS) ve *mcyA* (2. NRPS)] ile sonuçlanır. Mikrosistin pek çok suş tarafından üretilmektedir ve 80’den fazla izoformu bulunmaktadır. Nodularin ise sadece *Nodularia spumigena*’da üretilmektedir (*Nodularia spumigena*’nın tüm suşları üretir). Çok sayıda varyantının mevcut olması nedeniyle mikrosistin daha erken ortaya çıkmış olduğu varsayılmaktadır. Daha önceleri mikrosistin biyosentez genlerinin horizontal transfer ile oluştuğu hipotezi ortaya koyulmuştur. Fakat daha sonra mikrosistin biyosentez genlerinin oldukça eski olduğu belirlenmiştir. Bu uzun zaman boyunca bazı siyanobakteriler *mcy* genlerini kaybetmiş olabilir, diğerleri farklı seçici güçler yaşamış (rekombinasyon, mutasyon, genetik sürüklenme gibi) ve sonuçta farklı suşlarda çok çeşitli mikrosistin varyantlarının sentezine neden olmuş olabilir (Moffitt ve Neilan, 2004). Şekil 2.11’de *mcyA* ve *mcyB* deki bazı bölgelerin silinmesiyle *ndaA* oluşumu gösterilmektedir.

Dittmann ve Börner (2005) yaptıkları bir çalışmada, farklı cinslere ait *mcyA*, *mcyD* ve *mcyE* nükleotid dizilerinin ve aynı suşların “housekeeping” genlerinin dizilerinin filogenetik analiz sonuçlarını karşılaştırmışlardır. Bu sonuçlar, *Anabaena*, *Microcystis*, *Nostoc* ve *Planktotrix*’deki *mcy* genleri ve hatta *Nodularia*’daki *nda* genlerinin ortak atadan geldiği fikrini desteklemektedir.



Şekil 2.11. *mcyA* ve *mcyB* deki bazı bölgelerin silinmesiyle *ndaA* oluşumu gösterilmektedir. A; adenilasyon, C; kondenzasyon, E; epimerizasyon; M; N-metil transferaz (Moffitt ve Neilan, 2004)

16S rDNA ve RNA polimeraz C1 geninin (*rpoC1*) analiz sonuçları, mikrosistin sentetaz genleri ve “housekeeping” genlerinin, uzun zaman önce birlikte evrimleştiğini ve mikrosistin sentetaz genlerinin siyanobakterinin son ortak atasında da mevcut olduğunu göstermektedir. Toksin üretim yeteneği birçok grupta zamanla kaybedilmiştir. Mikrosistin genlerinin uzun evrimsel süreç boyunca, sıklıkla mutasyon ve rekombinasyon olaylarına maruz kaldığından yüksek oranda değişkenlik gösterdiği ileri sürülmüştür (Dittmann ve Börner, 2005). Şekil 2.12’de bazı cinslere ait *mcy* gen kümeleri, *nda* gen kümesi ve promotor bölgeleri görülmektedir.



Şekil 2.12. *mcy* ve *nda* gen kümeleri ve promotor bölgeleri ve yönü kesik çizgili oklar ile gösterilmiştir (Dittmann ve Börner, 2005)

## 2.11 Metagenomik

Metagenomik, çevresel örneklerin içerdiği genomların doğrudan genetik analizi olarak tanımlanır (Thomas vd, 2012). Son 20 yılda mikrobiyal ekoloji, evolusyon ve biyoçeşitlilik araştırmalarındaki büyük ilerlemelerin sorumlusudur ve çok sayıda araştırma laboratuvarı bu tip çalışmaları yaygın bir şekilde yürütmektedir. Bu tip çalışmalar, bir komünitedeki organizmaların kültürü yapılmaksızın genomlarının klonlanarak veya klonlanmadan analizini kapsamaktadır. Böylece kültüre edilemeyen mikrobiyal çeşitliliğin tanımlanmasına yardım eder. Kültüre alınmış prokaryotlar, gezegenimizdeki en fazla fizyolojik çeşitliliğe ve değişken metabolizmaya sahip organizmalardır. Fakat bu varyasyonlar mikrobiyal buzdağının

sadece bir ucudur. Mikroorganizmaların büyük çoğunluğunun laboratuvarında kültürü yapılamamakta ve mikrobiyal yaşam ile ilgili bilgilerimizin hemen hemen tamamı oransal olarak mikroorganizmaların küçük bir kısmını oluşturan saf kültürler şeklinde gelişen organizmalara dayanmaktadır. Kültüre alınamayan mikrobiyal dünyadaki çeşitlilik ise olağanüstü derecede büyüktür (Sabree vd, 2009).

Metagenomik, bu kültüre alınamayan türlerin de çalışılmasına imkân sağlamaktadır. Böyle bir çalışma, teorik olarak bir komünitedeki tüm organizmaların genomlarını kapsadığından komünitenin tamamını kapsayacak şekilde DNA ekstraksiyonunu yapmayı gerektirir. Bu şekilde elde edilmiş DNA stokları çoğu zaman çevresel DNA olarak adlandırılır. Çevresel DNA kullanılarak bir komüniteye ait genomlar, klonlanarak metagenom kütüphaneleri oluşturulur. Bu kütüphaneler daha sonra geleneksel dizileme yöntemleriyle dizilenerek biyoinformatik analizlere tabi tutulur ve değerlendirilir. DNA dizileme teknolojisindeki gelişmeler metagenomların klonlanmaksızın da doğrudan dizilenmesini uygulanabilir hale getirmiştir. Metagenomik mikrobiyolojide yeni olmasına rağmen yapılan keşifler mevcut olan paradigmalara meydan okumaktadır ve biyologların yaşamdaki bilinmeyenleri biraraya getirme arayışına önemli katkılar sağlamaya devam etmektedir (Sabree vd, 2009).

Metagenomik, mikrobiyal komünitelerin yapısını ve işleyişini (fonksiyonunu) belirlemek için son zamanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır ve komünitelerin doğal ortamlarında mikrobiyal fonksiyonel genlerinin daha kapsamlı araştırılmasına imkân sağlamaktadır. Bu teknik, kültür tabanlı analiz ihtiyacını ortadan kaldırarak, doğal komünite yapısının ve potansiyel fonksiyonlarının daha iyi anlaşılmasını sağlar. Komüniteden elde edilen DNA veya spesifik primerler kullanılarak elde edilmiş belli bir gruba ait PCR çoğaltım ürünleri dizilenirler ve elde edilen diziler daha ileri analizlere tabii tutulurlar. Dizileme için klasik ve modern yöntemler kullanılır. Dizileme teknolojileri birinci nesil (Sanger gibi) dizilemeden ikinci nesil (pirodizileme) ve üçüncü nesil dizileme yöntemlerine (Illumina gibi) doğru evrildikçe daha büyük genomları daha ucuz ve daha hızlı dizileme kapasitesini olağanüstü miktarda artırmaktadır (Heather ve Chain, 2016)

Siyanobakteriyel araştırmaların çeşitli alanlarında metagenomik yaklaşımlar yaygın şekilde yürütülmektedir. Siyanobakteriyel biyoçeşitliliğinin belirlenmesinde etkili bir yöntem olarak metagenomik yöntemler diğer yöntemlerle birlikte

uygulanmaktadır (Dadheech vd, 2013; Davison vd, 2015). Toksik siyanobakterilerin biyoçeşitliliği ve komünite analizlerinde de metagenomik sıklıkla başvurulan araştırma tekniklerinden biri durumundadır (Pope ve Patel, 2007; Steffen vd, 2012).



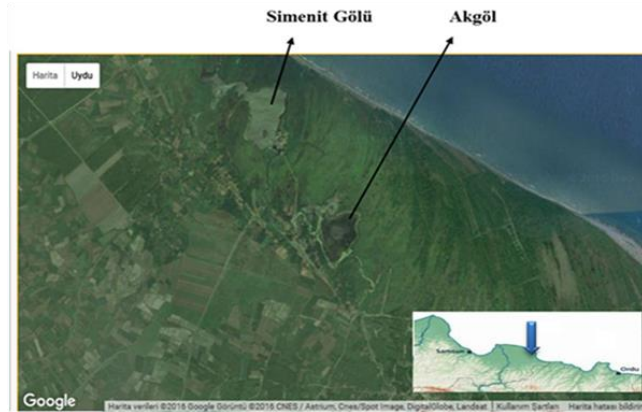
### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Araştırma Alanı

Araştırma alanı olarak Samsun ili Terme ilçesi Aybeder mahallesinde yer alan 41°16'43.56" Kuzey ve 36°56'28.98" Doğu koordinatlarına sahip Akgöl gölü seçilmiştir. Şekil 3.1'de Akgöl ve Simenit göllerine ait uydu görüntüsü gösterilmektedir.

Araştırma alanı olarak seçilen Akgöl Samsun'un Terme ilçesinde yer almaktadır. Yeşilirmak Deltasının Doğu'sunda yer alan ve kısmen doğal özelliğini koruyabilmiş Simenit Gölü-Akgöl sulak alan kompleksi, kumul alanlar ve geniş bir ağaçlandırma sahasından oluşmaktadır. Simenit Gölü-Akgöl'ün 1900 hektarlık yüzölçümünün 200 hektarı açık su alanı, gerisi sazlık ve bataklık alandan meydana gelmektedir. Simenit Gölü-Akgöl sulak alan kompleksi ve çevresindeki 16042,0 hektarlık alan 1975 yılında Yaban Hayatı Koruma Sahası statüsüne alınmıştır. 2005 yılında ise 2005/9453 sayılı karar ile Samsun Terme Gölardı Simenit Gölü Yaban Hayatı Geliştirme Sahası 3355 hektar olarak resmî gazetede yayınlanmıştır (Anonim-URL-4).

Simenit Gölü ve Akgöl denize yakın ve birbirlerine ise doğal kanallar ile bağlıdır. Simenit Gölü ve Akgöl, Terme çayının yatağının değişmesi sonucu oluşmuştur. Gölde balıkçılık yapılmaktadır. İki gölün de balık varlığı açısından zengin oluşlarının nedeni deniz suyunun yükselmesidir. Göllerin çevresi sazlık ve bataklıktır. İlçede çeltik ve fındık tarımı yapılmaktadır.



Şekil 3.1. Akgöl ve çevresi uydu görüntüsü

### 3.2 Kullanılan Çözeltiler

Kullanılan çözeltiler Sambrook ve Russel (2001) önerdiği gibi hazırlandı.

#### 250 mM KCl Çözeltisinin Hazırlanması

1.86 gr KCl (Sigma-Aldrich) 100 ml ultra saf suda çözüldü. Otoklavda 121°C'de 1.2 atm basınçta 20 dakika steril edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı.

#### 2 M Mg<sup>+2</sup> Stok Çözeltisinin Hazırlanması

20.33 gr MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (Merck) 100 ml ultra saf su eklendi ve filtreden geçirilerek steril edildi.

#### 1 M Glukoz Çözeltisinin Hazırlanması

18 gr glukoz (Sigma-Aldrich) 90 ml ultra saf suda çözüldü. Daha sonra son hacim 100 ml'ye tamamlandı. Filtreden geçirilerek steril edildi.

#### 1 M NaCl Stok Çözeltisinin Hazırlanması

5.844 gr NaCl (Sigma-Aldrich) 100 ml saf suda çözüldü ve otoklavda 121°C'de 20 dakika steril edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı.

#### 10 mg/ml Ampisilin Stokunun Hazırlanması

100 mg ampisilin (Applichem) 10 ml deiyonize suda çözüldükten sonra 0.20 µm por çaplı filtreden (Minisart) geçirilerek steril edildi ve 1 ml halinde ependorfa koyularak -20°C'de saklandı.

#### 0.5 M Tris-HCl (PH 8.0) Çözeltisinin Hazırlanması

12.11 gr Tris (Sigma-Aldrich) 150 ml saf suda çözüldü. pH HCl ile 8.0'a ayarlandı. Son hacim saf su ile 200 ml'ye tamamlandı ve otoklavda 121°C'de 20 dakika steril edildi.

#### 10X TBE (Tris-Borik Asit-EDTA) Stok Çözeltisinin Hazırlanması

27 gr Tris (Sigma-Aldrich), 13.75 gr Borik Asit (Sigma-Aldrich) ve 10 ml 0.5 M EDTA (Applichem) 180 ml saf suda çözüldükten sonra HCl ile pH 8.0'a ayarlandı ve toplam hacim 250 ml'ye tamamlandı. Otoklavda 121°C'de 20 dakika steril edildi.

#### 0.5 M EDTA (pH 8.0) Stok Çözeltisinin Hazırlanması

186.1 gr disodyum etilen diamin tetraasetat 2H<sub>2</sub>O (Applichem) 800 ml saf suda çözüldü. pH NaOH ile 8.0'a ayarlandı. Saf su ile toplam hacim 1 litreye tamamlandı. Otoklavda 121°C'de 20 dakika steril edildi.

### 1X TE (Tris-EDTA) Stok Çözeltisinin Hazırlanması

250 mM Tris-HCl stok çözeltisinden 2 ml alındı (son konsantrasyon 10 mM) ve 500 mM EDTA stok çözeltisinden 200 µl alındı (son konsantrasyonu 1 mM), 90 ml ultra saf su eklendikten sonra pH 8.0'a ayarlandı. Son hacim ultra saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak 121°C'de 20 dakika otoklavlandı.

### 3 M Sodyum Asetat (pH 5.6) Stok Çözeltisinin Hazırlanması

246.09 gr sodyum asetat (Sigma-Aldrich) 800 ml saf suda çözüldükten sonra glasiyel asetik asit ile pH 5.6'ya ayarlandı. Saf su ile hacim 1 litreye tamamlandıktan sonra 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi.

### 2 M Sükroz Çözeltisinin Hazırlanması

6.846 gr sükroz (Sigma-Aldrich) 5 ml ultra saf suda çözüldükten sonra son hacim 10 ml'ye tamamlandı. Filtreden geçirilerek steril edildi ve +4°C'de saklandı.

### Inoue Transformasyon Tamponunun Hazırlanması

0.5 Molar PIPES (pH 6.7) (piperazine-1.2-bis (2-ethanesulfonic acid) hazırlamak için 15.1 gr PIPES saf suda çözüldü. 5 M KOH ile pH 6.7'ye ayarlandı ve saf su ile son hacim 100 ml'ye tamamlandı. 0.45 µm por çaplı filtreden (Nalgene) geçirilerek steril edildikten sonra -20°C'de saklandı.

Inoue transformasyon tamponunun hazırlanması için Çizelge 3.1'de verilen tüm solüsyonlar 800 ml saf suda çözüldü. Sonra 20 ml 0.5 M PIPES (pH 6.7) eklendi. Inoue transformasyon tamponu son hacmi saf su ile 1 litreye tamamlandı.

Çizelge 3.1. Inoue transformasyon tamponunun içeriği

<b>Çözeltiler</b>	<b>Litredeki miktar</b>	<b>Final konsantrasyon</b>
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	10.88 g	55 mM
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2.20 g	15 mM
KCl	18.65 g	250 mM
PIPES (0.5 M pH 6.7)	20 ml	10 mM
H <sub>2</sub> O	1 litre	-

### 10 mg/ml Etidyum Bromür Stokunun Hazırlanması:

100 mg etidyum bromür 10 ml saf suda 2-3 saat çözüldükten sonra ışık almayan cam şişede +4°C'de saklandı.

### 3.3 Kültür Ortamları

#### LB (Luria-Bertani) Besiyeri

Tripton (pepton)	: 10 gr
Yeast extract	: 5 gr
NaCl	: 10 gr

1000 ml saf suda çözüldükten sonra, 5 Normal NaOH çözeltisi ile pH 7.0'a ayarlandı. Katı besiyeri için ise % 1.5 agar ilave edildi. 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi.

#### SOB Besiyeri

Tripton	: 20 gr
Yeast extract	: 5 gr
NaCl	: 0.5 gr

950 ml ultra saf suda eriyene kadar çözüldü. Ardından 10 ml 250 mM KCl çözeltisi ilave edildi ve pH 5 N NaOH ile 7.0'a ayarlandı. Son hacim 1 litreye tamamlandıktan sonra 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi. Besiyerini kullanmadan önce 2 M MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O steril stok çözeltisinden 5 ml ilave edildi.

#### SOC Besiyeri (100 ml)

Tripton	: 2 gr
Yeast extract	: 0.5 gr
1 M NaCl	: 1 ml
250 mM KCl	: 1 ml
1 M glukoz	: 2 ml
2 M Mg <sup>+2</sup>	: 1 ml

Tripton, yeast extract, NaCl, KCl ve 97 ml ultra saf su karıştırıldı. 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra besiyeri oda sıcaklığında bekletildi. Kullanımdan hemen önce steril Mg<sup>+2</sup> ve glukoz stoklarından belirtilen miktarlarda eklendi.

### 3.4 Su Örneklerinin Alınması ve Laboratuvara Getirilmesi

Akgöl gölünden 2015 temmuz, ağustos, eylül, ekim, kasım ve 2016 ocak, mart, nisan, mayıs, haziran aylarında gölün kıyı bölgesinden belirlenen istasyondan (41°16'43.56" Kuzey ve 36°56'28.98" Doğu) 10-20 cm derinlikten 500 ml plastik

şişeler ile su örnekleri alındı. Örnekler aynı gün laboratuvara getirildi. Araziden alınan yaklaşık 500 ml su örneği süzme sistemi (Sartorius Stedim, type:16692) kullanılarak 0.45 µm gözenek açıklığına sahip supor filtreden (Pall Corporation) süzüldü ve DNA izolasyonu yapıncaya kadar -20°C’de saklandı.

### 3.5 Siyanobakteriyel Kültürün Mikroskopik Sayım Yöntemi

Moleküler tarama gücünün optimizasyonu için gelişmiş saf *Synechocystis* PCC6803 kültürünün 1 ml’indeki hücre sayısı, Thoma lamı sayım yöntemi ile belirlendi. Gelişmiş kültürden 1 ml alınarak  $10^{-1}$  ve  $10^{-2}$  oranında seyreltilti. Thoma lamının oyukları dolana kadar seyreltilen kültürden eklendi. Thoma lamının esası  $0.1 \text{ mm}^3$  hacminde sayım yapılmasıdır. Thoma lamında 16 büyük kare, her büyük karede 25 küçük kare olmak üzere toplam 400 küçük kare vardır. Thoma lamında sayım mikroskopta dört farklı büyük karedeki siyanobakteri hücreleri sayılmıştır. Daha sonra bir büyük kare için ortalama sayı belirlenmiştir. Bu ortalama sayı kullanılarak 16 büyük karedeki siyanobakteri sayısı, bu sayı kullanılarak da 1 ml’de ki bakteri sayısı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

1 ml hücre sayısı= 16 büyük karedeki bakteri sayısı x seyreltme faktörü x 10000 ( $0.1 \text{ mm}^3$ ’de ki sayım sonucunu 1 ml’de ki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılan bir değişmezdir).

### 3.6 Siyanobakteriyel Kültürden Kromozomal DNA İzolasyonu

20 ml iyi gelişmiş *Synechocystis* PCC6803 kültürü 10000xg’de 10 dakika çöktürüldü. Sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra 1 dakika daha döndürüldü ve sıvı kısım tekrar pipetle uzaklaştırıldı. 1 ml liziz çözeltisi (400 µl distile su, 500 µl % 40 sükröz çözeltisi [son konsantrasyonu % 20 sükröz çözeltisi], 100 µl 0.5 M Tris-HCl [son konsantrasyonu 0.05 M]) hazırlandı ve 10 mg lizozim eklendi. Hücreler, liziz çözeltisi içerisinde süspanse edildi. Bu hücre süspanسیونu 37°C’de 1 saat inbübe edildi. Daha sonra %30’luk N-luril sarkosin çözeltisinden 16 µl ve 5 mg/ml Proteinaz K<sup>+</sup> çözeltisinden 20 µl eklendi ve 65°C’de 3 saat inkübe edildi. Daha sonra eşit hacimde Fenol:Kloroform:İzoamil alkol (25:24:1) eklendi, hafifçe birkaç defa alt-üst edildi ve sonra 12000xg’de 5 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvı dikkatlice yeni ependorfa alındı. Eşit hacimde Kloroform:İzoamil alkol (24:1) eklendi ve alt üst edildikten sonra 12000xg’de 5 dakika santrifüj edildi. Üst tabaka yeni ependorfa

alındı ve 0.1 hacim 3 M sodyum asetat ve 2 hacim soğuk etanol eklendi. Alt üst edilerek karışması sağlanan tüpler -20 °C’de gece boyu bekletildi. Ertesi gün 12000xg’de 20 dakika santrifüj edildi ve sıvı faz uzaklaştırıldı. Çökelti halindeki DNA %70’lik 500 µl alkol ile yıkandı. 12000xg’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra alkol uzaklaştırıldı. Alkolün tamamen uzaklaştırılması için desikatörde 45 dakika bekletildi. Sonra çökelti 50 µl 1X TE (Tris-EDTA) tamponu içerisinde çözüldü, 5 µl 10 mg/ml RNAaz ilave edildikten sonra PCR işlemleri için -20°C’de saklandı.

### 3.7 Çevresel Örneklerden DNA İzolasyonu

Çevresel örneklerden DNA izolasyonu, Giovanni vd (1990) metoduna göre yapıldı. 47 mm, 0.45 µm supor filtreden süzülen su örnekleri DNA izolasyonu yapıncaya kadar -20°C’de saklandı. -20°C’den çıkartılan filtreler steril petri içerisinde makas yardımı ile kesilerek oldukça küçük parçalara ayrıldıktan sonra ependorf içerisine aktarılarak 500 µl lizis tamponu içerisinde süspanse edildi. Çizelge 3.2’de lizis tamponunun içeriği verilmiştir.

Çizelge 3.2. 500 µl’lik lizis tamponunun içeriği

Çözeltiler	500 µl’ deki Miktar	Son Konsantrasyon
0.5 M EDTA	40 µl	40 mM
0.5 M Tris-HCl	50 µl	50 Mm
1 M NaCl	200 µl	400 mM
2 M Sükroz	190 µl	0.75 M
Distile Su	20 µl	-
Lizozim	0.5 mg	1 mg/ml

Hücreler, süspanse edildikten sonra 37°C’de 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 27 µl 5 mg/ml Proteinaz K<sup>+</sup> (son konsantrasyonu 270 µg/ml) ve 16 µl N-luril sarkosin eklenerek, 55°C’de 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında eşit hacimde Fenol:Kloroform:İzoamil alkol (25:24:1) eklenerek hafifçe alt-üst edildi. Ardından 12000xg’de 5 dakika santrifüj edilerek, üst faz yeni bir ependorfa alındı. Daha sonra eşit hacimde Kloroform: İzoamil alkol (24:1) eklendi, tekrar hafifçe alt-üst edilerek karıştırıldı. 12000xg’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst faz yeni bir tüpe alınarak üzerine 0,1 hacim 3 M

sodyum asetat (ependorftaki miktarın 10'da 1'i kadar) ve 2 hacim soğuk etanol (ependorftaki miktarın 2 katı kadar) eklendikten sonra -20°C'de gece boyu bekletildi. Ertesi gün 12000xg'de 25 dakika santrifüj edildikten sonra üst faz uzaklaştırıldı. DNA'yı taşıyan çökelti %70'lik alkol ile yıkandı, 5 dakika 12000xg'de tekrar çöktürüldü ve sıvı faz uzaklaştırıldı. Kalıntı alkolün uzaklaştırılması için desikatörde 1 saat bekletildi. Daha sonra DNA 40 µl steril 1X Tris-EDTA (TE) tampon çözeltisinde çözülerek PCR işlemlerinde kalıp DNA olarak kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

### 3.8 PCR Reaksiyonları ve Parametreleri

PCR amplifikasyonu için öncelikle pipetleme hatalarını en aza indirmek için primerler, tampon ve dNTP'leri içeren bir PCR karışımı hazırlandı (Çizelge 3.3 ). Bu PCR karışımından her bir 25 µl reaksiyon hacmi için reaksiyon tüpüne 19 µl alındı. Bu tüpe ayrıca kalıp DNA olarak belli miktarda çevresel DNA, enzim çözeltisi ve istenilen miktarda MgCl<sub>2</sub> eklendi. Son hacim, saf su ile 25 µl'ye tamamlandı. Kalıp DNA, MgCl<sub>2</sub> ve enzim miktarları her deney grubu için optimize edildi. Çevresel DNA 10<sup>-1</sup>-10<sup>-3</sup> oranlarında sulandırılarak optimize edildi. MgCl<sub>2</sub> miktarını optimize etmek için 1-4 mM konsantrasyon aralığı test edildi. Yüksek ısıya dayanıklı enzim olarak *Taq* DNA polimeraz (Invitrogen) kullanıldı. Enzimin hacmi tüplere eklenmeden önce pipetleme hatasını önlemek için 1X PCR tamponu ile artırılarak bir enzim karışımı hazırlandı. İlk denatürasyondan sonra her bir tüpte 0.5 ünite enzim içeren 2 µl enzim karışımı eklendi. PCR döngüleri Thermalhybaid "termal cycler" (ThermoHybaid) kullanılarak yürütüldü. PCR parametreleri çizelge 3.4'de verilmektedir. Kullanılan primerler ve dizileri Çizelge 3.5'de verilmektedir.

Çizelge 3.3. Tipik bir 10 reaksiyonluk PCR karışımı (25 µl x10)

PCR Karışımı	Bir Tüpün İçeriği (µl)	10 Tüp İçin Miktar (µl)	Son Konsantrasyon (mM)
5 µM Primer F	2.5 µl	25 µl	0.5 mM
5 µM Primer R	2.5 µl	25 µl	0.5 mM
10X PCR Tamponu, -Mg	2.5 µl	25 µl	1X
10 mM dNTP Karışımı	0.5 µl	5 µl	0.2 mM
Distile Su	11 µl	55 µl	-

Çizelge 3.4. PCR ile çoğaltımda kullanılan sıcaklık değerleri ve süreleri

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95°C	3 dk	1
Denatürasyon	95°C	30 sn	35
Hibridizasyon (Anneling)	50-60°C	30 sn	
Sentez (Ekstension)	72°C	1 dk	
Son Sentez	72°C	5 dk	1

Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan primerler ve dizileri

Hedef Grup/Gen	Primer Adı	Primer Dizisi (5'-3')	T <sub>m</sub> Değerleri (°C)	Kaynak
Siyanobakteriyel 16S rDNA	CYA106F: CYA781R:	CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA GACTAC(T/A)GGGGTATCTAATCCC(A/T)TT	67.7 64.2	Nübel vd, 1997
<i>Microcystis</i> 16S rDNA	16S F1: 16S R1:	CGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGC GCGTGCCTACTCCCCAGGCGGGATAC	74.2 75.8	Nonneman ve Zimba, 2002
Mikrosistin B	mcyB 2959F: mcyB 3278R:	TGGGAAGATGTTCTTCAGGTATCCAA AGAGTGGAAACAATATGATAAGCTAC	64.7 61.6	Rinta-Kanto vd, 2005
Mikrosistin D	mcyD F2: mcyD R2:	GGTTCGCCTGGTCAAAGTAA CCTCGCTAAAGAAGGGTTGA	58.4 58.4	Rinta-Kanto vd, 2005
<i>Anabaena mcyE</i>	AnamcyE-424F: AnamcyE-583R:	GCTCATCGCTCTCAAGCC CAGAGAGTGTCCGCCGAT	58.4 58.4	Ngwa vd, 2014
<i>Planktotrix mcyTD</i>	McyTD F: McyTD R:	ATCCGCCCATACTGTGACC GATTTTGCCCGGTTTACTCC	59.5 58.4	Mbedi vd, 2005
<i>Anabaena</i> Anatoksin-a C geni	5802 F: 6064 R:	GCCCGATATTGAAACAAGT CACCTCTGGAGATTGTTTA	53 56.4	Rantala vd, 2011
<i>Oscillatoria</i> Anatoksin-a C geni	5604 F: 5819 R:	CTCTATTCTCACAAGTTTGGTCT GTTAGTTCAATATCAAGTGGTGA	59.3 60.1	Rantala vd, 2011
Saksitoksin	sxt F sxt R	GGAGTGGATTTC AACACCAGAA GTTTCCCAGACTCGTTTCAGG	60.3 61.3	Al-Tebrineh, 2012
RNA Polimeraz C1 ( <i>rpoC1</i> )	RpoC1 F RpoC1 R	TGG GGH GAA AGN ACA YTN CCT AA GCA AAN CGT CCN CCA TCY AAY TGB A	59.3 62.5	Rantala vd, 2004
Fikosiyanin βα alt üniitesi ( <i>cpcβα</i> )	PCβ F PCα R	GGCTGCTTGTTCACGCGACA CCAGTACCACCAGCAACTAA	60.5 58.4	Neilan, 2002

### 3.9 Klonlama İşlemleri

#### 3.9.1 Alıcı hücre hazırlanması

Alıcı (kompotent) hücreler Inoue metodunda anlatıldığı gibi hazırlandı (Sambrook ve Russell, 2001). Bunun için -80°C'de stoklanmış olan *E.coli* DH5-α hücreleri LB agar besiyerine çizgi ekim yöntemi ile ekildi ve gece boyu 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Ertesi sabah petriden tek bir koloni alınarak 25 ml LB sıvı besiyerine aktarıldı. 200



rpm hızla çalkalanan bir inkübatörde 37°C’de 8 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda bu kültürden, 3 farklı 250 ml SOB besiyerine (1 litrelik erlen içerisinde) sırasıyla 2 ml, 4 ml ve 10 ml aktarıldı. Bu yeni kültürler 80 rpm hızda çalkalanan bir inkübatörde 18°C gece boyu (16-20 saat) inkübasyona bırakıldı. Ertesi sabah herbir kültürün yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçüldü (600 nm absorbans). Absorbans 0.55’e ulaşmaya kadar her 45 dakika da bir kültür yoğunlukları ölçüldü. Kültür yoğunluğu 0.55’e ulaşan kültür hemen buza alındı. Diğer 2 kültür iptal edildi. Bu aşamadan sonraki bütün çözeltiler soğutulmuş ve bütün basamaklar +4°C’de yürütülmüştür. İstenen düzeyde gelişmiş olan bu kültür 2500xg’de +4°C’de 10 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü ve besiyeri fazı uzaklaştırıldı. Çökelti halindeki hücreler bir miktar Inoue tamponunda hafifçe çalkalanarak süspansiyon edildi ve iki steril tüpe paylaştırıldı. Her iki tüpün hacmi Inoue tamponu ile 40 ml’ye tamamlandı. Tüpler 2500xg’de +4°C’de 10 dk. santrifüj edildi, Inoue tamponu uzaklaştırıldı. Bir miktar Inoue tamponunda hücreler çalkalanarak süspansiyon edildi, tek tüpte toplandı ve Inoue tamponu ile hacim 20 ml’ye tamamlandı. Alıcı hücre süspansiyonuna 1.5 ml dimetil sülfoksit (DMSO-Serva) eklenerek 10 dakika buzda bekletildi. Süspansiyon her birinde 1 ml olacak şekilde steril eppendorf tüplere paylaştırıldı, sıvı azotta donduruldu ve -80°C’de saklandı.

### 3.9.2 Ligasyon

Ligasyon reaksiyonları için “pGEM-T Easy Vector Systems” (Promega) kullanıldı ve ligasyon işlemleri üretici firma tarafından önerilen prosedüre göre yapıldı (Anonymus-5: [www.promega.com/protocols/](http://www.promega.com/protocols/)).

Ligasyonu yapılacak olan DNA bölgesi *Pfu* DNA polimeraz kullanılarak çoğaltıldı. PCR ürünleri %2.5’lik agaroz jelde 1 saat yürütüldü. Ligasyonda kullanılacak *mcyB* gen bölgesini çoğaltım işlemleri Bölüm 3.8’de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

#### PCR ürünlerinin saflaştırması

PCR ürünlerinin saflaştırma işleminde jel ekstraksiyon kiti (Sigma-Aldrich) kullanıldı ve üretici firma tarafından önerilen prosedüre göre yapıldı. GenElute Binding kolon, 2 ml’lik toplama tüpüne yerleştirildi. 500 µl colon preparation çözeltisi eklendi ve 1 dakika santrifüj edildi. Altaki sıvı döküldü. PCR ürünü kolona aktarıldı ve 1 dk santrifüj edildi. Altaki sıvı döküldü. 700 µl yıkama çözeltisi

eklendi. Tekrar 1 dakika santrifüj edildi. Alttaki sıvı döküldü. Kalıntı etanolün uzaklaştırılması için tekrar 1 dakika santrifüj edildi. Kolon yeni bir ependorfa aktarıldı. 50 µl Elution çözeltisi kolon membranının merkezine eklendi, 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve 1 dakika santrifüj edildi. Tüp içine geçen DNA çözeltisi -20°C’de saklandı.

#### DNA miktar tayini

Saflaştırılan PCR ürünü ve 100 baz çifti DNA markerdan (Bioline) 1’er µl alındı, 1 µl 5X yükleme tamponu ile 3 µl saf su DNA örneklerine eklendi. %2,5’lik agaroz jele yüklendi, 70 mA’de 1 saat yürütüldü. Ardından UV ışık altında görüntülenerek yoğunluğu bilinmeyen saflaştırılan PCR ürününün miktarı, DNA markırındaki yoğunlukları bilinen fragment bandları ile karşılaştırılarak belirlendi.

#### Kör uçlu DNA fragmentinin yapışkan uçlu DNA fragmentine dönüştürülmesi

Saflaştırılan PCR ürünü, *Pfu* DNA polimeraz kullanılarak çoğatıldığından ve kör uçlu olduğundan dolayı, fragmentlerin 3’ ucuna Adenin nükleotiti eklenerek A yapışkan uçları oluşturuldu. Yapışkan uç oluşturma işlemi, “pGEM-T Easy Vector Systems” (Promega) (Anonymus-5: [www.promega.com/protocols/](http://www.promega.com/protocols/)) üretici firma tarafından önerilen prosedüre göre yapıldı.

Saflaştırılan PCR ürününden 1-7 µl alındı. 1 µl Taq DNA polimeraz 10X reaksiyon tamponu ile MgCl<sub>2</sub> eklendi (Sigma-Aldrich). Son konsantrasyonu 0.2 mM olacak şekilde dATP ilave edildi. 5 unite *Taq* DNA polimeraz enzimi eklendi. Son hacim 10 µl’ye tamamlandı ve 70°C’de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Bu işlemle 3’ uçlarına A eklenmiş fragment karışımının 1-2 µl’si, ligasyon reaksiyonu için kullanıldı.

#### Ligasyon reaksiyonu

Ligasyon reaksiyonunda kullanılacak DNA fragment miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Anonymus-5: [www.promega.com/protocols/](http://www.promega.com/protocols/)).

$$\text{insert (ng)} = \frac{\text{vektör (ng)} \times \text{insert büyüklüğü (kb)}}{\text{vektör büyüklüğü (kb)}} \times \frac{\text{insert}}{\text{vektör}} \text{ molar oranı}$$

Vektörden 50 ng kullanıldı. Ligasyon reaksiyonları için 1:1, 1:3, ve 3:1 insert/vektör molar oranları kullanılarak üç farklı ligasyon karışımı hazırlandı. Her tüpe 3 unite T4 DNA Ligaz, 5 µl T4 DNA ligaz tamponu, 1 µl pGEM-T Easy vektör, değişen oranlarda PCR ürünü eklendi. Son hacim deiyonize su ile 10 µl’ye

tamamlandı. Reaksiyon karışımı pipetle karıştırıldı ve +4°C’de gece boyu ligasyona bırakıldı. Tipik bir ligasyon işleminde kullanılan reaksiyon karışımları Çizelge 3.6’da verilmektedir.

Çizelge 3.6. Ligasyon reaksiyonu

Reaksiyon Bileşenleri	Standart Reaksiyon (insert:vektör)			Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol
	3:1	1:1	1:3		
2X Rapid Ligasyon Buffer	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
pGEM®-T Easy Vector (50 ng)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
PCR ürünü (insert)	x µl	x µl	x µl	-	-
Kontrol İnsert DNA	-	-	-	2 µl	-
T4 DNA Ligaz (3 unite/µl)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Son hacmi 10 µl’ye tamamlamak için deiyonize su	x µl	x µl	x µl	1 µl	3 µl

### 3.9.3 Transformasyon

Transformasyon işlemi, “pGEM-T Easy Vector Systems” üretici firmasının (Promega) önerdiği prosedüre göre yapıldı. Alıcı hücrenin buz üzerinde çözünmesi beklendi. Gece boyu +4°C’de bekletilen ligasyon karışımı santrifüj edildi. 100 µl alıcı hücre (*E.coli* DH5-α) ve 5 µl ligasyon karışımı, buz üzerinde 1.5 ml’lik steril ependorflara transfer edildi. Hafifçe el ile vurularak karıştırıldı. 20 dk buz üzerinde inkübasyona bırakıldı. 42°C’de 45-50 sn ısı şokuna maruz bırakıldı. Ardından 2 dk buzda bekletildi. Steril SOC besiyerinden 900 µl eklendi. Ligasyon karışımları 1,5 saat boyunca 37°C’de 150 rpm hızda çalkalanan bir inkübatöre yerleştirildi. Bu sürenin sonunda transformasyon kültüründen 100 µl alınarak, 100 µg/ml ampisilin içeren katı LB besiyerine yayma ekim yöntemi ile ekildi, geceboyu 37°C’de inkübasyona bırakıldı.

### 3.9.4 Plazmit izolasyonu

Plazmit izolasyonu için belli sayıda izole transformant koloniler (klonlar), steril kürdan ile alınarak 50 µg/ml ampisilin içeren LB broth besiyerine inoküle edildi. Klon seçimi rastgele yapıldı. Kültür çalkalayıcı inkübatörde 250 rpm hızda 37°C’de geceboyu inkübasyona bırakıldı. Plazmit izolasyonunda GenElute HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) kullanıldı ve işlemler üretici firma tarafından önerilen prosedüre göre yapıldı.

3 ml hücre kültürü 12000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. 200 µl RNAaz ilaveli resüspanسیون çözeltisi içinde süspanse edildi. Pipetleme ve vorteks ile karışım homojen hale getirildi. 200 µl lizis tamponu eklendi, 6-8 defa altüst edildi. 350 µl nötralizasyon/binding tamponu eklendi, 4-6 defa hafifçe altüst edildikten sonra 12000xg'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant plazmit DNA'sı taşımaktadır. Diğer yandan kolon preparasyonu için bir eppendorf tüpe yerleştirilmiş kolona 500 µl kolon preparasyon çözeltisi eklenip 12000xg'de 1 dk. santrifüj edildi ve tüpe geçen sıvı uzaklaştırıldı. Sonra plazmit DNA'sını içeren süpernetant kolona transfer edildi, 12000xg'de 1 dk. santrifüj edildi ve tüpe geçen sıvı uzaklaştırıldı. Yıkama solüsyonu I'den 500 µl alınarak kolona eklendi. 12000xg'de 1 dk. santrifüj edildi. Alttaki sıvı uzaklaştırıldı. Yıkama solüsyonu II'den 750 µl alınarak kolona eklendi ve 12000xg'de 1 dk santrifüj edildi. Alttaki sıvı uzaklaştırıldı. Kolon tekrar 12000xg'de 1 dk santrifüj edildi. Yıkama işlemi tamamlanmış kolanlar steril bir ependorf tüpe transfer edildi, 50 µl ultra saf su eklendi ve oda sıcaklığında 1 dk bekletildi. Sonra kolon içerisindeki DNA'nın su ile birlikte tüpe geçmesi için 12000xg'de 1 dk. santrifüj edildi. Kolon uzaklaştırıldı ve tüp içindeki plazmit DNA'sı -20°C'de saklandı.

### **3.9.5 RE analizi**

5 µl plazmit DNA'sı, 2 µl 10X *EcoR*I tamponu (Thermo Scientific), 1 µl *EcoR*I enzimi ependorf tüpe eklendi. Son hacim ultra saf su ile 20 µl'ye tamamlandı. 37°C'de 2 saat inkübe edildi. Ardından %2,5'lik agaroz jele yüklenerek 70 mA'de fragmentler yeterince ayrılana kadar yürütüldü. Jel içerisindeki DNA fragmentleri UV ışık (Vilber Lourmat) altında görüntülendi.

### **3.10 Agaroz Jel Elektforezi ve PCR Ürünlerinin Yüklenmesi**

PCR ürünlerini ayırmak için %2.5'lik agaroz (Sigma-Aldrich) jel kullanıldı. Agaroz jel elektforez çalışmalarında 1X TBE tamponu kullanıldı.

%2,5'lik jel hazırlanırken, 1.25 gr agaroz, 50 ml 1X TBE tamponu içerisinde alev üzerinde hafifçe çalkalanarak homojen bir görüntü alınmaya kadar ısıtılarak eritildi. Erimiş agarozun sıcaklığı 50-55°C'ye düştüğünde 2.5 µl etidyum bromür (stok konsantrasyonu 10 mg/ml, son konsantrasyonu ise 0.5 µg/ml) ilave edildi.

Temiz ve kuru jel kabına yükleme kuyucuklarının oluşması için uygun tarak yerleştirildi. Ardından jel, jel kabına döküldü ve soğumaya bırakıldı.

Soğumuş ve katılaşmış jel, tarak ve tıkaçları çıkarılarak 1XTBE içeren elektroforez tankı içine yerleştirildi. Sonra 4 µl PCR ürünü 1 µl 5X yükleme tamponu (BioLine) ile karıştırıldı ve kuyucuklara yüklendi. PCR ürünlerinin büyüklüğünün tespiti için ise 3 µl 100 bp marker ilk kuyucuğa yüklendi. DNA, 70 mA'de yaklaşık 1 saat veya fragmentler yeterince ayrılıncaya kadar yürütüldü.

Elektroforez esnasında jel içinde bulunan etidyum bromür ile boyanan DNA, transillüminatör (Vilber Lourmat) kullanılarak UV ışık altında gözlemlendi ve fotoğrafları çekildi.

### **3.11 DNA Dizi Analizi**

Ağustos ayı ve Eylül ayına ait elde edilen *mcyB* klonlardan toplam 25 klon seçilerek ticari servis sağlayıcıya (Macrogen Europa) dizilettiirildi. Ayrıca Ağustos ayına ait *rpoCI* ve *cpcBA* (fikosiyanın) genleri rastgele klonlandı. Bu klonlardan, 15 klon *rpoCI*'den 15 klon ise *cpcBA*'dan seçilerek toplam 30 klon Macrogen Europa dizilettiirildi. Dizilettiirilen bu DNA dizileri Mega6 paket programı (Tamura vd, 2013) kullanılarak filogenetik analizlere tabi tutuldu. Dizilerin benzerlik ve farklılıkları PHYDIT paket programı (Anonymus-6: <http://plaza.snu.ac.kr/jchun/phydit>) kullanılarak belirlendi.

## 4. BULGULAR

### 4.1 Araştırma Alanı Örneklerinin Alınması ve Bakteriyel Kommünite Elemanlarının Hasatı

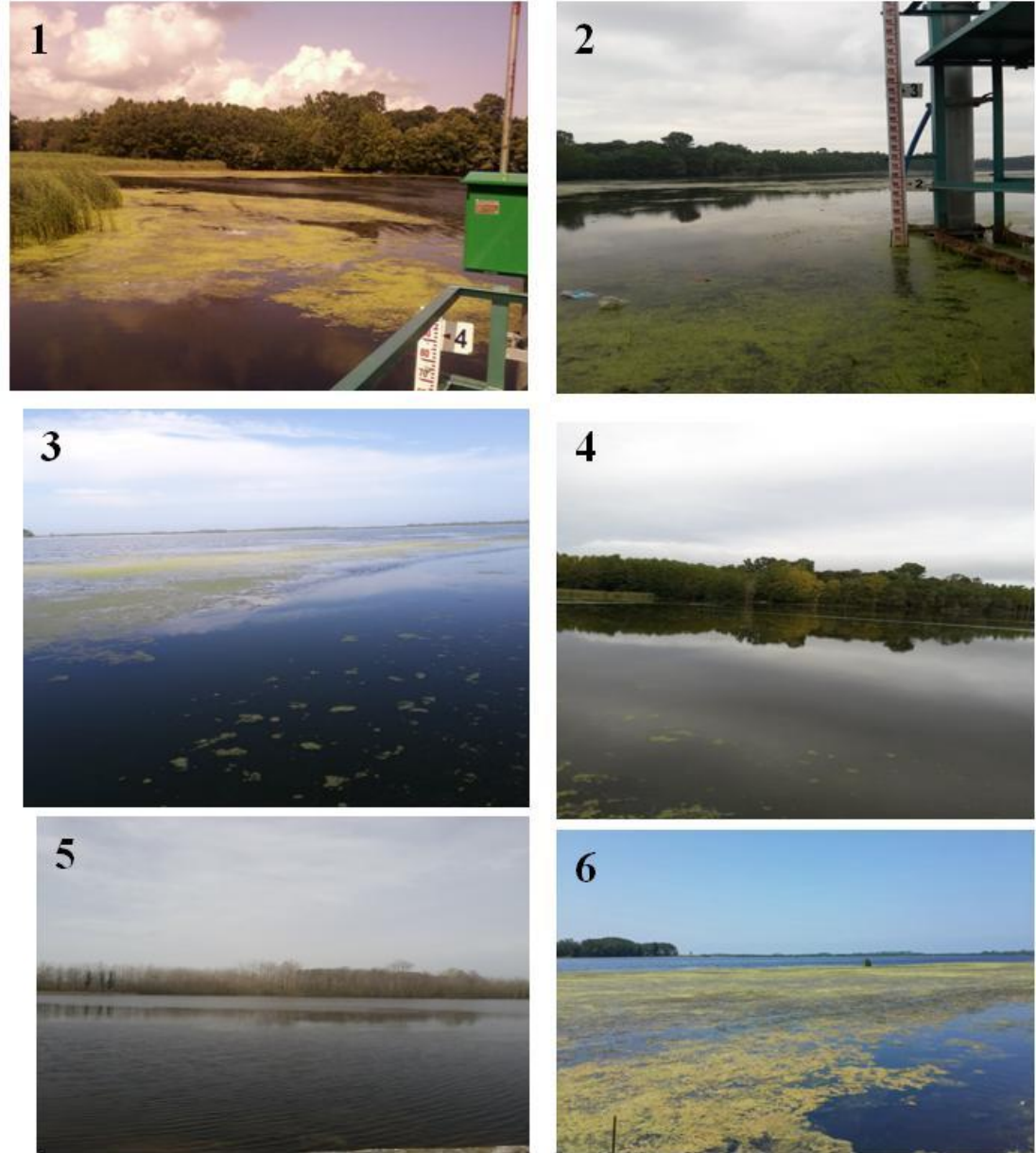
Akgöl gölünden kıyıya bitişik bölgeden belirlenen istasyonundan yaklaşık 20 cm derinden steril pet örnek kaplarına 1-2 L miktarda su örneği alındı. Örnekler 2015 yılı Temmuz, Ağustos, Eylül, Ekim ve Kasım; 2016 yılı Ocak, Mart, Nisan, Mayıs ve Haziran ayları olmak üzere 10 aylık bir dönemi kapsamıştır. Su örneklerinin alındığı Akgöl gölünün farklı aylardaki görünümü Şekil 4.1'de verilmiştir. Örnek alımı sırasında örnek alma noktasındaki su sıcaklıkları ölçüldü (Çizelge 4.1) Siyanobakterilerin avantajlı hale geçtiği sıcaklık derecelerinin haziran, temmuz, ağustos ve eylül aylarında sağlandığı görülmektedir. Ayrıca mayıs ve ekim aylarında da nispeten gelişmeyi destekleyici sıcaklık değerlerinin mevcut olduğu anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.1. Örnek alma zamanlarındaki su sıcaklıkları

Ay	Tarih	Su Sıcaklığı
Temmuz	23.07.2015	28°C
Ağustos	20.08.2015	24°C
Eylül	29.09.2015	25°C
Ekim	26.10.2015	18°C
Kasım	27.11.2015	14°C
Ocak	12.01.2016	11°C
Mart	24.03.2016	13°C
Nisan	18.04.2016	17°C
Mayıs	29.05.2016	18°C
Haziran	26.06.2016	32°C

Su örnekleri araziden doğrudan laboratuara getirilerek hücrelerin hasat işlemleri aynı gün içinde gerçekleştirildi. Bakteri hücrelerini içeren su örnekleri, fenol varlığında eriyen 0,45 µm por çapına sahip Supor (Pall Corporation) filtreler kullanılarak süzülerek bakteri komünitesinin hasat işlemi gerçekleştirildi (Bakınız Bölüm 3.4). Siyanobakteriyel üremenin daha fazla olduğu aylarda alınan örneklerinin belli bir filtreden süzülme hacminin azaldığı belirlenmiştir. Dolayısıyla siyanobakteri komünite yoğunluğunun az olduğu aylarda belli bir filtreden süzülabilen örnek su

miktarı daha fazla olmuştur. Belli bir su örneğinden birden fazla filtre kullanılarak birden fazla hasat yapılmıştır. Herbir filtreden ne kadar su örneğinin süzüldüğü daha sonra PCR tarama yönteminin gücünün ifade edilmesi için kullanılmak üzere kaydedilmiştir.



Şekil 4.1. Araştırma alanına ait görüntüler.1: Temmuz 2015, 2: Ağustos 2015, 3: Eylül 2015, 4: Ekim 2015, 5: Mart 2016, 6: Haziran 2016

Bakteri hücre kütlelerini bulandıran filtre küçük parçalara kesilerek 1,5 ml Eppendorf tüplere yerleştirilmiş, daha sonra çevresel DNA izolasyonunda kullanılmak üzere  $-20^{\circ}\text{C}$  veya  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

## 4.2 Siyanobakteriler için PCR Tarama Gücünün Optimizasyonu

Bu çalışmada, araştırma alanında toksin üreten siyanobakteri komünitesi hedef gen bölgeleri, PCR çoğaltım yöntemiyle taranmıştır. Bunun içinde önceden tasarlanmış toksin genleri, siyanobakteriyel evrensel 16S rRNA geni, *rpoCI* ve *cpc* genleri için özgül primer çiftleri kullanılmıştır (Bölüm 3.8, Çizelge 3.5). PCR taramanın temel mantığı belli bir grup için spesifik olan bir gen bölgesi çoğaltılabiliyorsa ilgili organizmanın da çevresel DNA'nın çoğaltıldığı örnek içinde mevcut olduğudur. Belli bir gen bölgesinin çoğaltılabilmesi için ilgili çevresel örnek içerisinde kaç hücrenin, dolayısıyla kaç genomun olması gerektiğinin belirlenmesi PCR tarama gücünün belirlenmesi için önemlidir. Gerekli minimum hücre sayısı, kültürde (veya çevresel örnekte) bulunan hücrelerin ne kadarının genomunun izole edilebildiğine, izole edilen genomların parçalanma oranına, PCR çoğaltımında kullanılan enzimlerin ve diğer ajanların özelliğine ve çevresel DNA içinde bulunan olası inhibitörlerin etkisine bağlı olarak değişecektir. Bu çalışmada PCR tarama gücünü belirlemek üzere standart suş *Synechocystis* sp. PCC6803 saf kültürleri kullanıldı. Bu kültürden 20 ml alınarak Bölüm 3.6'da anlatıldığı gibi genomik DNA izolasyonu yapıldı. Genomik DNA izolasyonu yapılan saf kültürün 1 ml'sindeki hücre sayısı mikroskopik sayım yöntemleri ile belirlendi (Bölüm 3.5). DNA izolasyonu amacıyla kullanılan kültürdeki her bir hücrenin genomunun başarılı bir şekilde izole edildiği varsayılarak, genomik DNA stokunun belli bir hacminde kaç genom bulunduğu hesaplandı.

*Synechocystis* sp. PCC6803 saf kültürünün 1 ml'sinde  $2.5 \times 10^6$  hücre bulunduğu belirlendi. 20 ml kültürdeki hücre sayısı ve dolayısıyla genom sayısı da  $5.0 \times 10^7$  olarak hesaplandı. Elde edilen genomik DNA 50 µl TE içinde çözülmüştür. Sonuçta 50 µl genomik DNA stokunun 1 µl'sinde  $1.0 \times 10^6$  genom olması gerektiği hesaplanmıştır.

Moleküler tarama gücünün optimizasyonun da siyanobakteri spesifik evrensel 16S rRNA geni primer çifti (CYA106F ve CYA781R, Çizelge 3.5) kullanılarak 16S rDNA ampliconları elde etme çalışmaları yürütüldü. Öncelikle saf kültürden elde edilen genomik DNA kalıp olarak kullanılarak PCR amplifikasyonunun optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Bu çalışmalarda, kalıp DNA miktarı, primer miktarı, enzim miktarı, annealing (bağlanma) sıcaklığı ve  $MgCl_2$  konsantrasyonunun optimizasyonları yapıldı. Optimum şartlar belirlendikten sonra



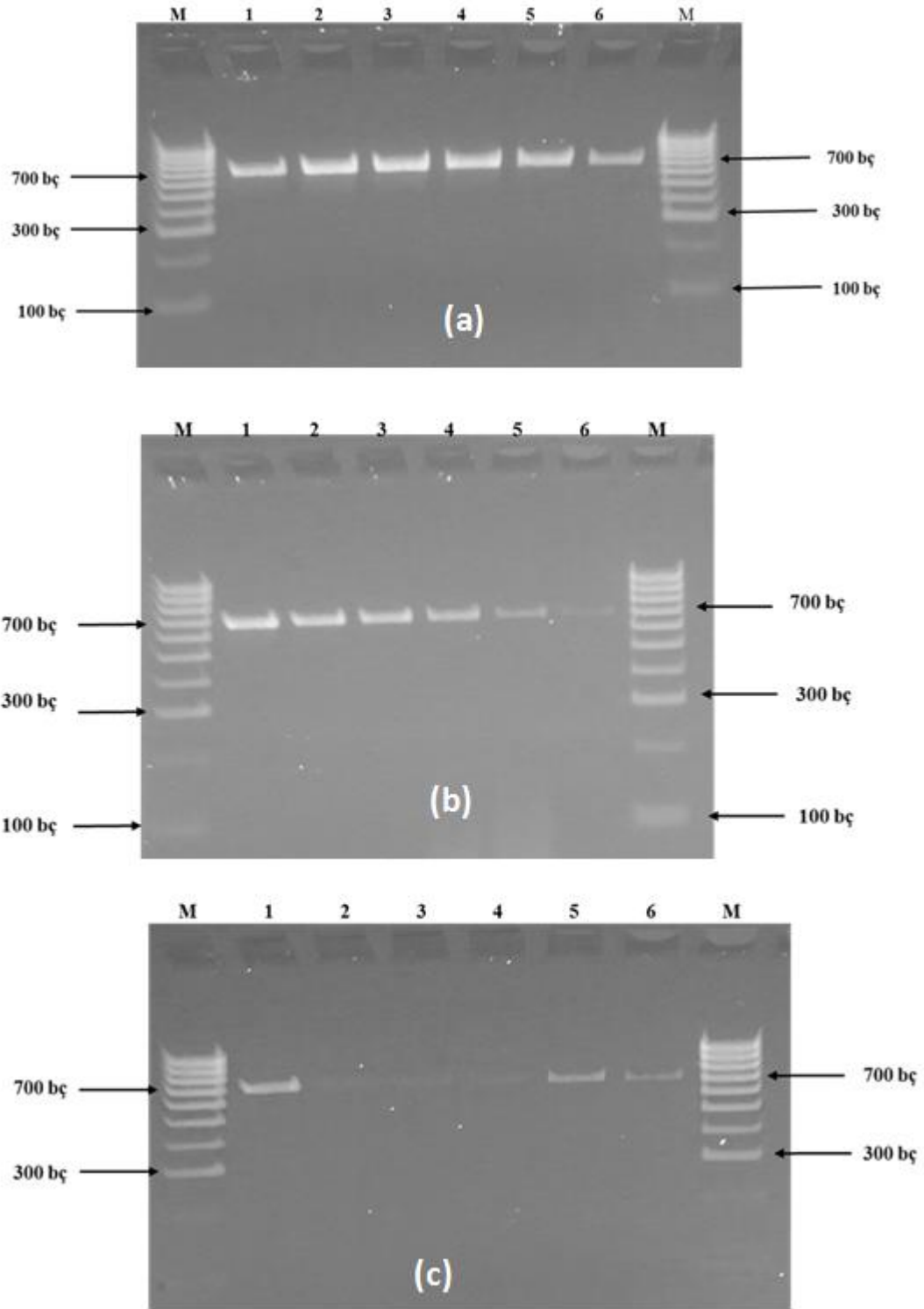
PCR ürününün elde edilebildiği en düşük kalıp DNA miktarının belirlenmesi çalışmaları yürütüldü. Genomik DNA stoku belli oranlarda sulandırılarak kalıp DNA olarak kullanıldı. Her bir sulandırılmış kalıp DNA'dan amplifikasyon yapılırken farklı konsantrasyonlarda MgCl<sub>2</sub> eklenerek farklı PCR çoğaltım işlemleri de gerçekleştirildi. Orijinal kalıp DNA stoku sırasıyla 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> ve 10<sup>-4</sup> oranında sulandırıldı ve her bir PCR reaksiyon tüpüne 1 µl eklendi. Bu denemelerde PCR ürününün elde edildiği son seyreltme değeri 10<sup>-3</sup>'tür. Daha fazla seyreltilmiş (10<sup>-4</sup>) kalıp DNA kullanıldığında amplifikasyonun gerçekleşmediği belirlendi. Şekil 4.2'de *Synechocystis* sp. PCC6803 suşunun farklı oranlarda sulandırılmış genomik DNA'sının 16S rRNA gen bölgesinin PCR çoğaltım ürünlerinin agaroz jel elektrorez görüntüsü görülmektedir.

Bu sonuçlara göre taranabilen minimum genom miktarı aşağıdaki gibi hesaplandı:

$$\text{Enaz genom sayısı}(\mu\text{l}) = (\text{Orijinal stoktaki genom sayısı}/50) / (\text{seyreltme oranı})$$

$$\text{Enaz genom sayısı} = (5 \times 10^7 / 50) / 10^3 = 10^3 \text{ genom.}$$

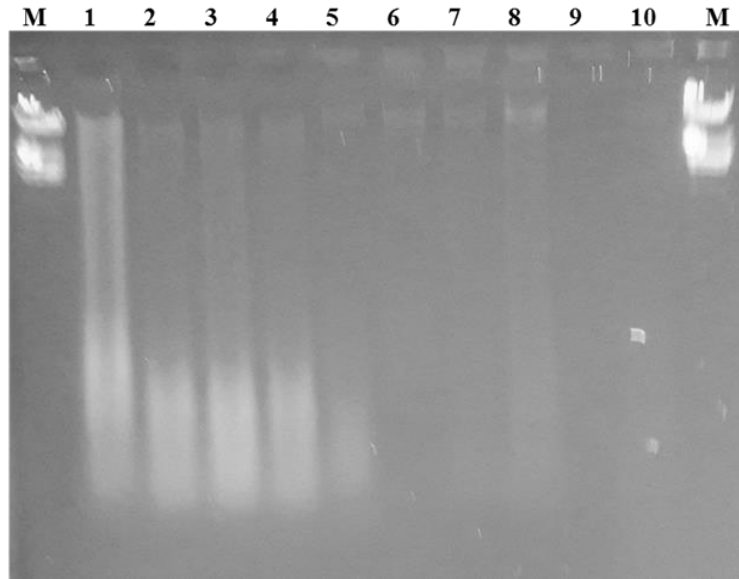
Böylece bu çalışmada PCR ile taranabilen minimum siyanobakteri genom sayısı 1000 genom olarak belirlendi.



Şekil 4.2. Farklı kalıp DNA seyreltme oranlarında gözlenen siyanobakteriyel 16S rDNA çoğaltım ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. (a) 10<sup>-1</sup> (b) 2 x 10<sup>-2</sup> ve (c) 10<sup>-3</sup> seyreltilmiş kalıp DNA ile amplifikasyon sonucu elde edilen PCR ürünleri. Beklenen amplicon büyüklüğü 700 bç. M, 100 bç DNA marker (belirteçi) (Bioline); yol 1, 1 mM; yol 2, 2 mM; yol 3, 3 mM; yol 4, 4 mM; yol 5, 5 mM; yol 6, 6 mM MgCl<sub>2</sub> içeren PCR reaksiyonları.

### 4.3 Çevresel DNA İzolasyonu

Çevresel su örneğinden filtrasyonla hasat edilen canlı kütle içinde çok farklı gruplara ait hücreler mevcuttur. Bu hücrelerin her birinin genomik DNA'sını tek bir yöntemle izole etmek beklenen bir durum değildir. Bu çalışmada siyanobakteri komünitesi hedef alındığından siyanobakteriyel DNA'nın çevresel örneklerden elde edilebildiği etkin bir yöntem tercih edilmiştir (Giovanni vd, 1990). Bu yöntem kullanılarak filtreden süzülen çevresel örneklerin DNA'ları Bölüm 3.7'de anlatıldığı gibi izole edildi ve 1X TE içinde çözülerek -20°C'de saklandı. Çevresel örneklerden elde edilen genomik DNA'lar % 0.7'lik agaroz jelde yürütüldü ve UV ışık altında görüntülendi. Şekil 4.3'de çalışma yapılan aylara ait çevresel DNA'ların jel görüntüsü görülmektedir. Sonuçta PCR reaksiyonlarında kalıp DNA olarak kullanılacak miktarda genomik DNA izolasyonunun gerçekleştirildiği sonucuna varıldı. Bu çevresel DNA'lar siyanobakteriyel indikatör gen bölgelerinin çoğaltımı işlemlerinde kullanıldı.



Şekil 4.3. Farklı aylara ait çevresel örneklerden elde edilen çevresel genomik DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü. M,  $\lambda$  DNA/*EcoR*I belirteçleri (Thermo Scientific); yol 1-10 sırasıyla Temmuz, Ağustos, Eylül, Ekim, Kasım 2015, Ocak, Mart, Nisan, Mayıs, Haziran 2016 aylarında elde edilen çevresel DNA. Her bir kuyucuğa 50  $\mu$ l stoktan 2  $\mu$ l DNA yüklenmiştir.

#### 4.3.1 Su Örneklerinde 16S rDNA Özgül Primerleri Kullanılarak Siyanobakteri ve *Microcystis* spp Suşlarının Taranması

DNA tabanlı tespit metotları duyarlı, hızlı ve spesifik olması nedeniyle mikroorganizmaların herhangi bir örnekte taranmasında yaygınlık kazanmıştır. Moleküler yöntemler organizmanın kültürüne gerek kalmadan veri üretilbildiğinden, mikrobiyal çeşitlilik ve aktivite çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu bağlamda siyanobakterilerin de varlığını belirlemek üzere gruba özel DNA bölgelerinin çoğaltımı yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Toksik ve toksik olmayan siyanobakterilerin tespiti için moleküler yöntemler kullanılarak yapılan yayınların sayısı da hızla artmaktadır (Pearson & Neilan, 2008; Cheung vd, 2013; Corbel vd, 2014 ). Bu teknik ayrıca suşların taranması ve çevresel örneklerde diğer genlerin kodladığı metabolitlerin varlığının belirlenmesi için de kullanılmaktadır. Toksin genlerinin dizilerinin bilinmesi, primerlerin tasarımı ve miktarları düşük bile olsa doğal örneklerdeki toksin üreten türlerin tanımlanmasını sağlamıştır.

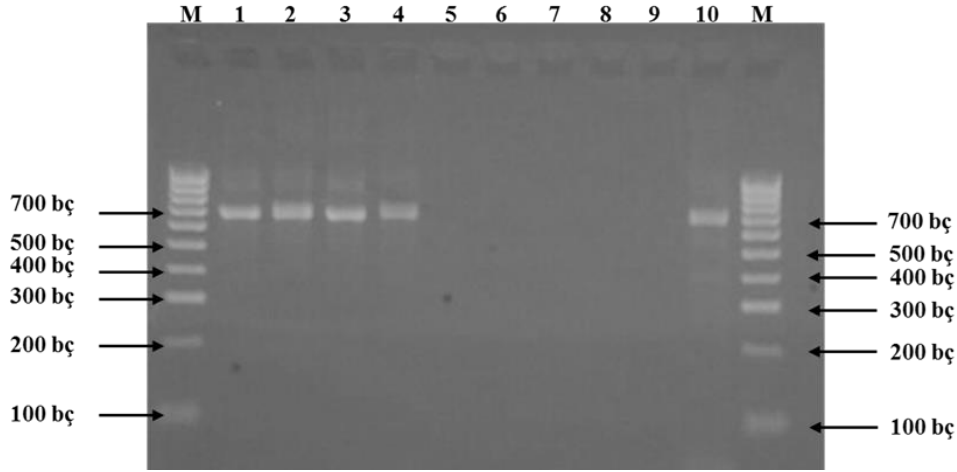
Siyanobakterilere özgü 16S rDNA bölgelerinin çoğaltımı için özgül primerler tasarlanmış ve bu grubun belli bir çevresel örnek içindeki varlığının belirlenmesi amacıyla PCR işlemlerinde kullanılmıştır (Rinta-Kanto vd, 2005). Bu çalışmada su örneklerinde siyanobakteri varlığının belirlenmesi için Nübel vd (1997) tarafından tasarlanmış CYA106F ve CYA781R primerleri kullanılmıştır. Ayrıca hedef siyanobakteri grubu olarak *Microcystis* spp. için tasarlanmış 16S F1 ve 16S R1 primerleri (Noneman & Zimba, 2002) ile PCR çoğaltımı gerçekleştirilmiştir (Primer dizileri için bakınız Bölüm 3.8 ve Çizelge 3.5 ).

Araştırma alanından alınmış su örneklerinden izole edilen genomik DNA kalıp olarak kullanılarak siyanobakteriyel evrensel 16S rRNA primerleri ve *Microcystis* 16S rRNA primerleri kullanılarak PCR taraması yapıldı. Böylece ilgili aya ait örnek içinde herhangi bir siyanobakteri suşunun ve herhangi bir *Microcystis* suşunun temsil edilip edilmediği belirlendi.

Siyanobakteri spesifik 16S rRNA bölgesinin PCR amplifikasyonunda, öncelikle kalıp DNA ve MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu optimizasyon denemeleri yapıldı. Tüm primerlerin konsantrasyonları 100 pmol/μl olarak kullanıldı. PCR işleminde Invitrogen firması tarafından üretilen *Taq* DNA polimeraz enzimi kullanıldı. Üretici firmanın önerdiği miktar olan 10 μM primer konsantrasyonu kullanıldı.

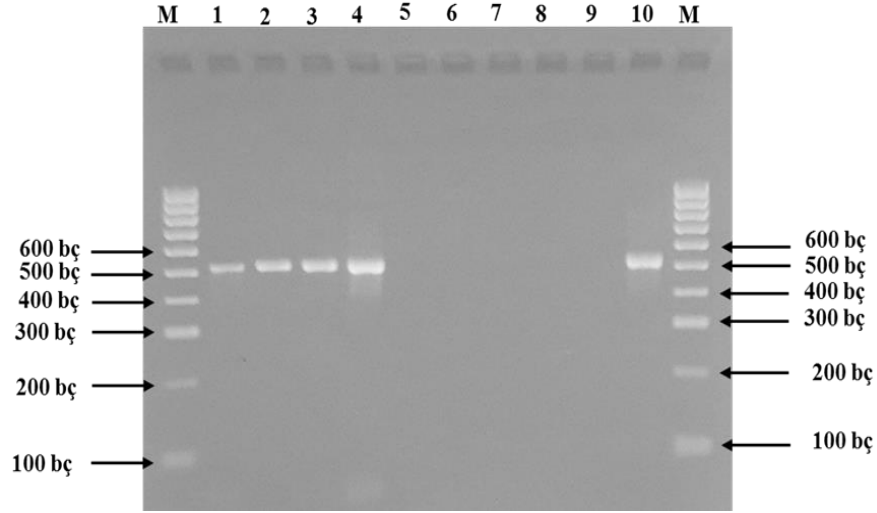
Öncelikle MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu optimize edildi. Bunun için 1, 2, 3, 4, 5 mM MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları denendi. Çevresel örneklerden elde edilen 2 µl DNA ise sulandırılmadan kalıp olarak kullanıldı. En etkili MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonunun ise 2-4 mM aralığında olduğu belirlendi. Daha sonra net bantlar elde etmek ve minimum DNA ile PCR taraması yapmak için kalıp DNA 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 2x10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> ve 10<sup>-4</sup> oranlarında sulandırıldı. Her sulandırma işlemi için de 1, 2, 3, 4 ve 5 mM aralığında MgCl<sub>2</sub> optimizasyonu işlemi yapıldı. Optimum sonucun ise 2x10<sup>-2</sup> kalıp DNA sulandırması ve 4 mM MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonunda elde edildiği belirlendi. 10<sup>-3</sup> sulandırılan kalıp DNA'da PCR sonucunda ürün gözlenmedi. Çevresel genomik DNA stok konsantrasyonuna bağlı olarak her bir ay için optimum genomik DNA kalıp oranı belirlendi. Bu denemelere dayanarak tüm aylarda siyanobakteri spesifik 16S rRNA'nın PCR amplifikasyonlarında 2x10<sup>-2</sup> oranında sulandırılan çevresel DNA kalıp olarak kullanıldı. PCR amplifikasyon denemelerinin sonucunda haziran, temmuz, ağustos, eylül ve ekim aylarında Akgöl gölünde siyanobakterilerin mevcut olduğu belirlendi. Şekil 4.4'de siyanobakteriyel 16S rRNA gen bölgesine ait PCR amplifikasyon ürünlerinin jel elektroforezi görüntüsü görülmektedir.

Kasım, ocak, mart, nisan ve mayıs ayı çevresel DNA stokları sulandırılmadan ve 10<sup>-1</sup> oranında sulandırılarak kalıp olarak kullanılmasına ve ayrıca diğer aylarda olduğu gibi MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu 1-5 mM aralığında değiştirilmesine rağmen PCR ürünü elde edilemedi. Bu sonuç bu aylarda örnek alınan su tabakasında, uyguladığımız tarama yöntemi ile belirlenebilecek miktarda siyanobakteri hücrelerinin bulunmadığını göstermektedir.



Şekil 4.4. Çevresel DNA kalıp olarak kullanılarak siyanobakteri spesifik 16S rRNA gen bölgesinin PCR amplifikasyonunun agaroz jel elektroforez görüntüsü. Aylara ait sonuçlar örnek alma sırasına göre jele yüklenmiştir. M, 100 bç Marker (belirteç) (Bioline). Yol 1-10 sırasıyla temmuz, ağustos, eylül, ekim, kasım, ocak, mart, nisan, mayıs, haziran aylarından elde edilen 16S rDNA PCR sonuçları. Elektroforez ortamı olarak %2.5'lik agaroz jel kullanılmıştır. Amplikon büyüklüğü 700 bç.

Örnek alınan aylara ait çevresel DNA örneklerinde *Microcystis* üyelerinin mevcudiyeti de *Microcystis* spesifik 16S rDNA primerleri kullanılarak tarandı. *Microcystis* spesifik 16S rRNA gen bölgesinin PCR amplifikasyonunda kalıp DNA ve MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu yukarıda anlatıldığı gibi optimize edildi. Bunun için 1, 2, 3, 4 ve 5 mM MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonları denendi. Bu işlem sırasında kalıp DNA öncelikle sulandırılmadan PCR işlemi yürütüldü. En etkili MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonunun 2-4 mM aralığında olduğu belirlendi. Daha sonra ise daha net DNA bantları elde etmek ve minimum kalıp DNA oranını belirlemek için PCR taraması gerçekleştirildi. Su örneği alınan tüm aylarda elde edilen çevresel DNA 10<sup>-1</sup> ve 10<sup>-2</sup> oranında sulandırıldı. Her bir sulandırma işlemi için de 1-5 mM aralığında MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu denendi. MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu için optimum sonucun 4 mM olduğu belirlendi. Kalıp DNA optimizasyonunda ise temmuz ve haziran aylarının kalıp olarak kullanıldığı çevresel DNA 10<sup>-1</sup> oranında sulandırılarak kullanıldığında en iyi sonucu verdiği görüldü. Temmuz ve haziran aylarından elde edilen çevresel DNA'nın 10<sup>-2</sup> sulandırılarak kalıp DNA olarak kullanıldığında PCR ürününün oluşmadığı gözlemlendi. Ağustos, eylül ve ekim aylarında elde edilen çevresel DNA için ise 10<sup>-2</sup> oranında sulandırılmış çevresel DNA'nın optimum sonuç verdiği belirlendi. Şekil 4.5'de *Microcystis* 16S rRNA gen bölgesine ait PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüsü verilmektedir.



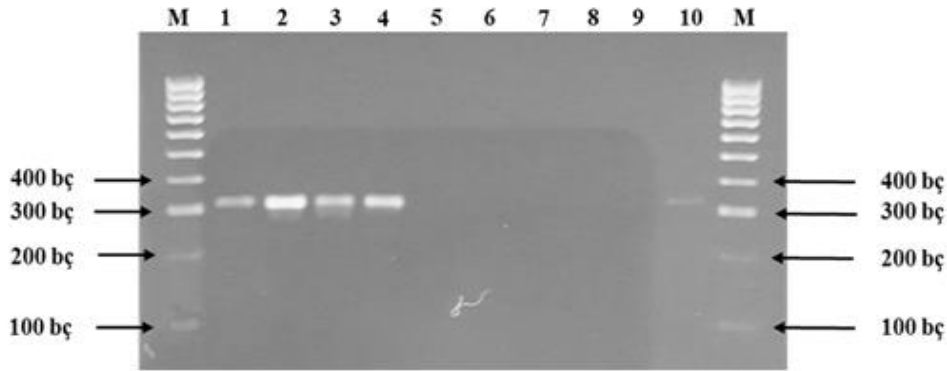
Şekil 4.5. Çevresel DNA kalıp olarak kullanılarak *Microcystis* spesifik 16S rRNA gen bölgesinin PCR amplifikasyonunun agaroz jel elektroforez görüntüsü. Aylara ait sonuçlar örnek alma sırasına göre jele yüklenmiştir. M, 100 bç Marker (belirteç) (Bioline). Yol 1-10 sırasıyla temmuz, ağustos, eylül, ekim, kasım, ocak, mart, nisan, mayıs, haziran aylarından elde edilen 16S rDNA PCR sonuçları. Elektroforez ortamı olarak %2.5'lik agaroz jel kullanılmıştır. Amplikon büyüklüğü 508 bç.

Kasım, ocak, mart, nisan ve mayıs aylarında elde edilen çevresel DNA için ise hem gerekli  $MgCl_2$  optimizasyonu (1-5 mM aralığı) yapılmasına ve hem de sulandırılmamış ve  $10^{-1}$  oranında sulandırılmış kalıp DNA kullanılmasına rağmen PCR işlemi sonucunda ürün elde edilemedi.

#### 4.3.2 Su örneklerinde *mcyB* ve *mcyD* özgül primerleri kullanılarak toksigenik *Microcystis* spp suşlarının taranması

Siyanotoksin biyosentez genlerini hedef alan PCR çoğaltım tekniği, su kaynağında bulunan toksigenik siyanobakteri popülasyonlarının belirlenebilmesi için hızlı ve duyarlı bir araç olarak kullanılmaktadır. Toksin genlerinin dizilerinin bilinmesi, spesifik primerlerin tasarımı ve miktarları düşük bile olsa doğal örneklerdeki toksin üreten türlerin tanımlanmasını sağlamıştır (Kaushik & Balasubramanian, 2013). Bu çalışmada Rinta-Kanto vd (2005) tarafından *Microcystis* toksin geni *mcyB* için tasarlanmış *mcyB* 2959F ve *mcyB* 3278R primerleri ve *mcyD* geni için tasarlanmış *mcyD* F2 ve *mcyD* R2 primerleri kullanılarak bu iki gen bölgesinin amplifikasyonu çalışmaları yürütüldü (Primer dizileri için bakınız Bölüm 3.8 ve Çizelge 3.5 ). Bu gen bölgelerinin çoğaltılabilir olması ilgili çevresel örnekte toksigenik *Microcystis* spp. suşlarının varlığının bir göstergesi olarak kabul edildi.

Öncelikle *Microcystis*'e ait *mcyB* gen bölgesinin PCR amplifikasyonu yürütüldü. Bunun için yukarıda bahsedilen diğer genlerin çoğaltımında olduğu gibi kalıp DNA ve MgCl<sub>2</sub> optimizasyon deneyleri yapıldı. Çevresel örneklerden elde edilen kalıp DNA başlangıçta sulandırılmadan kullanıldı. Haziran, temmuz, ağustos, eylül ve ekim aylarına ait çevresel DNA kullanıldığında spesifik PCR ürünleri elde edildi. Daha sonra çevresel DNA örnekleri 10<sup>-1</sup> oranında sulandırıldı ve PCR çoğaltımı ile daha net çoğaltım ürünleri oluşumu sağlandı. Daha fazla sulandırma oranında herhangi bir amplikon elde edilemedi. Siyanobakteriyel evrensel 16S rDNA çoğaltımı olmadığına bilinmesine rağmen yine de kasım, ocak, mart, nisan ve mayıs aylarında elde edilen çevresel DNA için gerekli MgCl<sub>2</sub> ve kalıp DNA konsantrasyonu optimizasyonları yapılarak deneyler yürütüldü ve beklentiye uygun olarak PCR çoğaltım ürünü elde edilemedi. Şekil 4.6'da *Microcystis mcyB* gen bölgesine ait PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü görülmektedir.

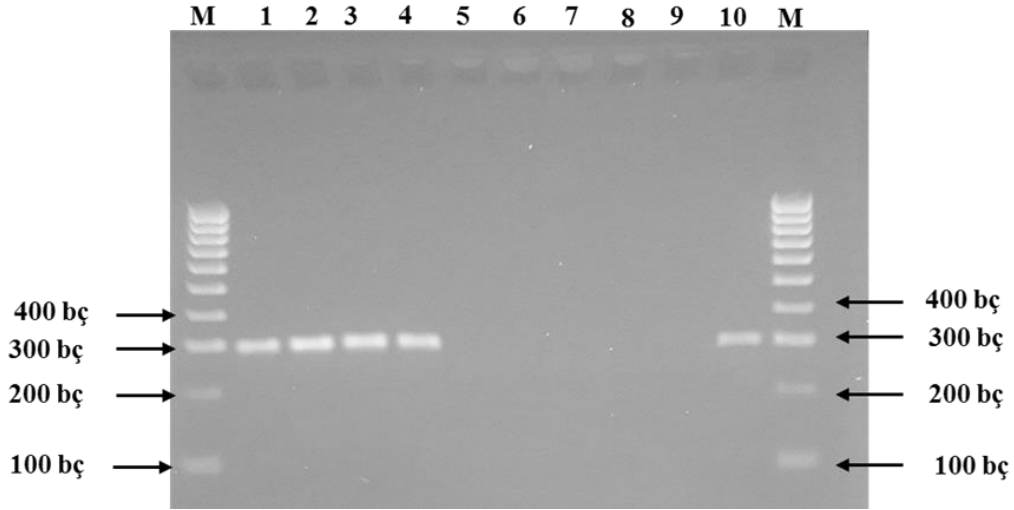


Şekil 4.6. Çevresel DNA kalıp olarak kullanılarak *Microcystis* spesifik *mcyB* gen bölgesinin PCR amplifikasyonunun agaroz jel elektroforez görüntüsü. Aylara ait sonuçlar örnek alma sırasına göre jele yüklenmiştir. M, 100 bp Marker (belirteç) (Bioline). Yol 1-10 sırasıyla temmuz, ağustos, eylül, ekim, kasım, ocak, mart, nisan, mayıs, haziran aylarından elde edilen *mcyB* gen bölgesi PCR sonuçları. Elektroforez ortamı olarak %2.5'lik agaroz jel kullanılmıştır. Amplikon büyüklüğü 320 bp.

*Microcystis*'e ait *mcyD* gen bölgesinin PCR amplifikasyonu da *mcyB* gen bölgesi gibi aynı şekilde yürütüldü. Kalıp DNA ve MgCl<sub>2</sub> optimizasyon deneyleri yapıldı. Çevresel örneklerden elde edilen kalıp DNA ise ilk denemede sulandırılmadan kullanıldı. Daha sonraki denemelerde ise 10<sup>-1</sup> oranında sulandırıldı. Haziran, temmuz, ağustos, eylül ve ekim aylarına ait çevresel DNA örneklerinden PCR çoğaltım ürünleri elde edildi. Kasım, ocak, mart, nisan ve mayıs aylarında elde edilen çevresel DNA için ise *mcyB* için uygulanan aynı işlemler uygulandı ancak



herhangi bir çoğalım ürünü elde edilemedi. Şekil 4.7’de *Microcystis mcyD* gen bölgesine ait PCR amplifikasyon ürünlerinin jel görüntüsü görülmektedir.



Şekil 4.7. Çevresel DNA kalıp olarak kullanılarak *Microcystis* spesifik *mcyD* gen bölgesinin PCR amplifikasyonunun agaroz jel elektroforez görüntüsü. Aylara ait sonuçlar örnek alma sırasına göre jele yüklenmiştir. M, 100 bç Marker (belirteç) (Bioline). Yol 1-10 sırasıyla temmuz, ağustos, eylül, ekim, kasım, ocak, mart, nisan, mayıs, haziran aylarından elde edilen *mcyB* gen bölgesi PCR sonuçları. Elektroforez ortamı olarak %2.5’lik agaroz jel kullanılmıştır. Amplikon büyüklüğü 297 bç.

*mcy* genlerinin taranması sonuçları, haziran-ekim ayları arasında Akgöl gölünde bulunan *Microcystis* spp. üyelerinin eğer hepsi değilse, önemli bir kısmının toksigenik olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar iki farklı belirteç gen (*mcyB* ve *mcyD*) ile yürütülen çalışmalarla desteklenmiştir. Haziran ve temmuz aylarında *Microcystis* spp. spesifik 16S rRNA genlerinin çoğaltılma sınırı ( $10^{-1}$  kalıp DNA sulandırması) ile *mcyB* ve *mcyD* genlerinin çoğaltım sınırının aynı olması ilgili suşların tamamının toksigenik olduklarına işaret etmektedir. Ağustos, eylül ve ekim aylarında ise toksigenik olan suşların oranının bir miktar daha az olduğu anlaşılmaktadır (*Microcystis* 16S rRNA geni çoğaltımı için çevresel DNA seyreltim oranı  $10^{-2}$  iken *mcy* genlerinin çoğaltımı için sulandırma sınırı  $10^{-1}$ ’dir).

### 4.3.3 Diğer siyanoakteriyel gruplara ait toksigenik suşların taranması

Çevresel örneklerden elde edilen genomik DNA’lar diğer toksin üreten siyanobakterilerin varlığı bakımından da test edilmiştir. Bunun için daha önce tasarlanmış farklı gruplara ait bir grup primer çifti kullanılmıştır. Bunlar *Anabaena*

*mcyE* geni için *AnamcyE-424F* ve *AnamcyE-583R* (Ngwa vd, 2014), *Planktotrix mcyTD* geni için *McyTD F* ve *McyTD R* (Mbedi vd, 2005), *Anabaena anaC* (anatoksin C) geni için 5802 F ve 6064 R (Rantala vd, 2011), *Oscillatoria anaC* (anatoksin C) geni için 5604 F ve 5819 R (Rantala vd, 2011) ve *stx* (saksitoksin) geni için *sxt F* ve *sxt R* (Al-Tebrineh, 2012) primer çiftleridir (Primer dizileri için bakınız Bölüm 3.8 ve Çizelge 3.5).

Siyanobakteriyel suşların mevcut olduğu aylara ait çevresel DNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak bu gen bölgelerinin amplifikasyon çalışmaları yürütüldü. Çok sayıda optimizasyon çalışmalarına rağmen herhangi bir amplifikasyon ürünü elde edilmedi. Bu sonuç adı geçen genlere sahip siyanobakteriyel suşların Akgöl gölünde ya hiç temsil edilmediğini, ya da eğer temsil ediliyorsa bu çalışmada uygulanan test duyarlılığının altında bir sıklıkta temsil edildiğini göstermektedir. Çizelge 4.2’de yapılan tüm PCR amplifikasyon çalışmalarının sonuçları toplu olarak verilmiştir.

Çizelge 4.2. Yapılan PCR amplifikasyon çalışmalarının toplu sonuçları. (+) amplifikasyon ürünü var, (-) yok

Gen bölgesi	Aylar									
	Temmuz 2015	Ağustos 2015	Eylül 2015	Ekim 2015	Kasım 2015	Ocak 2016	Mart 2016	Nisan 2016	Mayıs 2016	Haziran 2016
CYA 16S	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
MIC 16S	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
<i>McyB</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
<i>McyD</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
<i>AnamcyE</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>McyTD</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ana. anaC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Osc. anaC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saksitoksin (Sxt)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

#### 4.3.4 Toksikjenik *Microcystis* spp. üyelerinin biyoçeşitliliğinin moleküler analizi

16S rRNA ve *mcy* genlerinin PCR amplifikasyon çalışmaları, Akgöl gölünde *Microcystis* spp. üyelerinin oldukça yaygın bir şekilde temsil edildiğini ve bunların da önemli bir kısmının toksikjenik olduğunu yani *mcyB* ve *mcyD* geni taşıdıklarını göstermektedir. Dolayısıyla bu gölde temsil edilen *Microcystis* üyelerinin bir kısmının mikrosistin üretme potansiyeline sahip olduğu anlaşılmaktadır. Toksikjenik olan bu bireylerin aynı klonal kökenden mi oldukları yoksa farklı genotiplere sahip gruplara mı ait olduğunu anlamak üzere çalışmalar yürütüldü. Genotipik çeşitliliğin belirlenmesi için RAPD ve RFLP gibi diğer klasik moleküler yöntemler uygulandı.

mümkünse bile en kesin sonuçlar hedef DNA bölgesinin nükleotit dizisinin belirlenmesi ve analizi ile elde edilebilmektedir. Bu nedenle RFLP gibi diğer yöntemler yerine doğrudan çoğaltılmış DNA fragmentlerinin dizilerinin belirlenmesi ve filogenetik analizi çalışmaları tercih edilmiştir. Bu çalışma için mikrosistin biyosentez genlerinden *mcyB*'nin çoğaltılan hedef bölgesi daha ileri analize tabii tutulmuştur.

*mcyB* geninin hedef bölgesinin PCR amplifikasyonunun sonucunda elde edilen ampliconun genotipik olarak farklı olabilecek fragmentleri içermesi doğal bir beklentidir. Bunun nedeni alınan çevresel su örneği içerisinde *mcyB* genini taşıyan ancak bu DNA bölgesindeki nükleotit dizisi farklı olan bireylerin de mevcut olması beklentisidir. Bu nedenle doğrudan PCR ürününün geleneksel yöntemle dizilenmesi genotipik çeşitlilik hakkında doğru bilgiye ulaşılmasını sağlayamaz (Yeni nesil dizileme stratejileriyle bütün fragmentlerin, PCR ürününden doğrudan dizilenmesi mümkündür). Bu durum göz önünde bulundurularak Ağustos ve Eylül ayına ait *mcyB* PCR fragmentlerinin rastgele klonlanması ve klonlar arasından rastgele belirlenmiş belli sayıda klonun dizilenmesi stratejisi uygulanmıştır. Bu durumda her klon sadece tek bir fragment tipine sahip olacağı için sadece belli bir bireye ait nükleotit dizisi elde edilebilir hale getirilmektedir.

#### **4.3.5 *mcyB* ampliconunun rastgele klonlanması ve dizilenmesi**

Bir amplifikasyon ürününün bir vektöre etkili bir şekilde bağlanması için yapışkan uç oluşturan restriksiyon endonükleaz (RE) enzimleriyle hem vektör hem de hedef DNA fragmentinin kesilmesi gerekir. Vektör molekülleri üzerinde farklı RE tanıma dizisi mevcut olsa da bir PCR ürününde primerlerin 5' ucunda modifikasyonlar yapılmadıkça uygun tanıma dizisi bulunma olasılığı düşüktür. Bunun yerine vektör kör uç oluşturan bir RE ile kesilerek kör uçlu olan hedef PCR DNA fragmenti bu vektöre bağlanabilir. Bu durumda ligasyon verimliliği oldukça düşüktür. Tek tip fragmentlerden oluşan bir PCR ürünü (saf kültürlerden elde edilmiş kalıp DNA kullanıldığında) düşük verimlilikte de olsa bu yöntemle klonlanabilir. Fakat çevresel DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı, dolayısıyla farklı baz dizileri taşıdığı düşünülen karışık bir PCR ürününün bu yöntemle klonlanması sırasında karışımda bulunan bütün fragmentlerin temsil edildiği bir gen kütüphanesi elde etme olasılığı oldukça düşüktür. Neyse ki tek tip veya karma fragmentlerden oluşan PCR fragmentlerinin

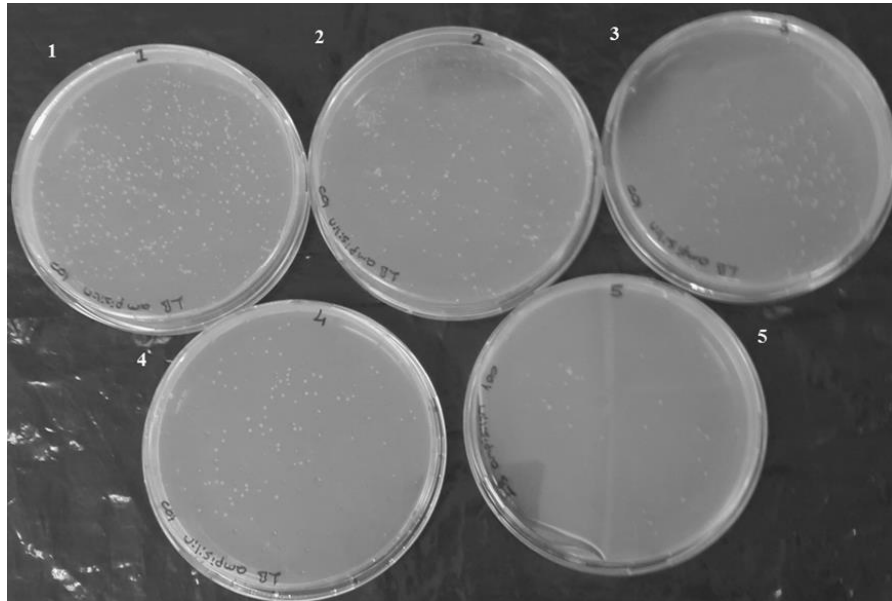
etkili bir şekilde klonlanmasında T/A klonlama sistemi oldukça etkilidir. Bu sistem bazı ısıya dayanıklı DNA polimerazların sentezledikleri zincirin 3' ucuna fazladan bir A nükleotiti eklemesi özelliğinden faydalanarak etkili bir ligasyon gerçekleştirmek esasına dayanır. Bunun için Küt uç oluşturan bir RE ile kesilen vektörün açık 3' uçlarına özel yöntemlerle bir T nükleotiti bağlanır. Böylece PCR fragmenti ile vektör arasında tek bazlık da olsa bir komplementerlik sağlanır.

T/A klonlama sistemi (Promega) mikrosistin üreten komünite üyelerinin çeşitliliğini belirlemek için *mycB* mikrosistin geninin ilgili bölgesinden elde edilen PCR ürünlerinin (ağustos ve eylül ayına ait) rastgele klonlanması amacıyla kullanıldı. Baz dizisinin yüksek doğruluk oranı baz dizilimindeki modifikasyonun belirlenmesi için yapılan çalışmalar için hayati bir gerekliliktir ve *Pfu* DNA polimeraz enzimi *Taq* DNA polimeraza göre daha yüksek doğrulukta fragmentler oluşturmaktadır. Bu nedenle *mycB* gen bölgesi, *Pfu* DNA polimeraz enzimi kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. Böylece nispeten daha yüksek doğrulukta DNA fragmentleri elde edilmiş oldu. Ancak *Pfu* DNA polimerazlar fragmentlerin 3' ucuna A nükleotiti eklemeyiz. Bu nedenle amplifikasyon sonrası PCR fragmentlerinin 3' uçlarına A nükleotitlerinin ayrıca eklenmesi gerekir. Bunun için *Pfu* DNA polimeraz ile gerçekleştirilen PCR işlemi tamamlandıktan sonra ligasyon reaksiyonunda kullanılacak PCR ürünü saflaştırıldı. Sonra bu küt uçlu yüksek doğrulukta sentezlenmiş DNA fragmentlerinin yapışkan uçlu hale getirilmesi için *Taq* DNA polimeraz ve dATP kullanılarak karışım 72°C'de 30 dakika inkübe edildi. Böylece *Pfu* DNA polimeraz ile elde edilen küt uçlu fragmentlerin 3' uçlarına birer A nükleotiti eklendi. 3' uçlarına birer A eklenen hedef PCR ürünü pGEM-T vektörüne (Promega) bağlanabilecek hale getirildi. Bu karışım doğrudan ligasyon reaksiyonlarında kullanıldı.

PCR ürününün derişimini belirlemek ve ligasyon reaksiyonunda kullanılacak insert miktarının hesaplamak için 1 µl saflaştırılan PCR ürünü ve her bir fragmentinin miktarı bilinen 1 µl 100 baz çifti DNA belirteci elektroforetik ortamda yürütülerek analiz edildi. DNA belirtecinin 300 bp fragmenti ile aynı büyüklükteki *mycB* geni PCR ürününün yoğunluğu karşılaştırılarak fragment miktarı belirlendi. Buna göre ağustos ayı çevresel DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı insert (hedef DNA fragmenti, PCR ürünü) yoğunluğu 10 ng/µl olarak belirlendi. Eylül ayı çevresel DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı insert yoğunluğu ise 12 ng/µl olarak

belirlendi. Daha sonra Bölüm 3.9.2’de verilen formüle göre kullanılacak insert miktarları hesaplandı. Her bir ligasyon reaksiyonunda 50 ng vektör kullanılmıştır. Insert büyüklüğü 0.3 kb (300 bp), vektör büyüklüğü ise 3 kb’dır. Ligasyon reaksiyonlarında 3:1, 1:1 ve 1:3 insert:vektör oranları kullanılarak 3 farklı ligasyon karışımı hazırlandı.

Daha önce (Bölüm 3.9.2) verildiği şekilde hazırlanan ligasyon karışımları +4°C’de gece boyu inkübasyona bırakılarak ligasyon işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen 10 µl ligasyon karışımının 5 µl’si Bölüm 3.9.1’de anlatıldığı şekilde hazırlanan 100 µl *E. coli* DH5-α alıcı hücrelerine transforme edildi (Transformasyon için bakınız Bölüm 3.9.3). Transformasyon sonrası oluşan *mcyB* kolonilerini (klonlarını) taşıyan LB agar besiyerleri Şekil 4.8’de görülmektedir. Bu sonuçlara göre 3:1 olan insert:vektör oranında ligasyonun en etkili, 1:1’de daha az etkili ve 1:3’de zayıf şekilde etkili olduğu anlaşılmaktadır.

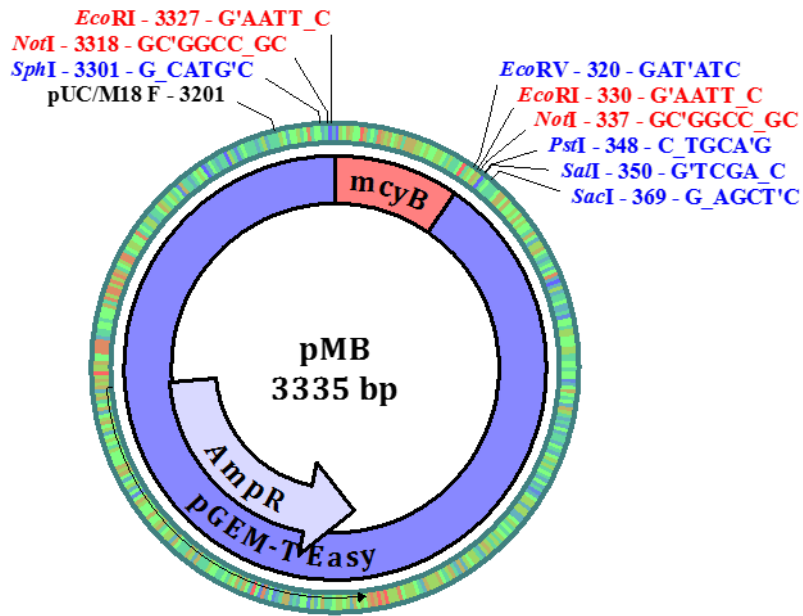


Şekil 4.8. Transformasyon sonucu oluşan *mc y B* klonlarının LB agar besiyerindeki görünümü. Petriler: 1, 3:1 insert:vektör oranı; 2, 1:1 insert:vektör oranı; 3, 1:3 insert:vektör; 4, pozitif kontrol (pGEM-T vektör + üretici firma tarafından sağlanan kontrol DNA’sı); 5, negatif kontrol (*E. coli* DH5-α alıcı hücreleri) görülmektedir. Besiyerlerinin tamamı 100 µg/ml ampisilin içerir.

3:1 insert:vektör oranına sahip ligasyon karışımının transformasyonu ile elde edilmiş belli sayıda koloni (klon) doğru fragmenti taşıyıp taşımadıklarını test etmek üzere analiz edilmiştir. Rastgele seçilen klonlar 50 µg/ml ampisilin içeren LB broth

besiyerine inoküle edilerek üretildi. Elde edilen her bir sıvı kültürden Bölüm 3.9.4'te anlatılan yöntem kullanılarak plazmit izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen her bir plazmit RE fragment büyüklükleri bakımından analiz edilerek beklenen hedef DNA fragmentlerini taşıyıp taşımadıkları belirlendi.

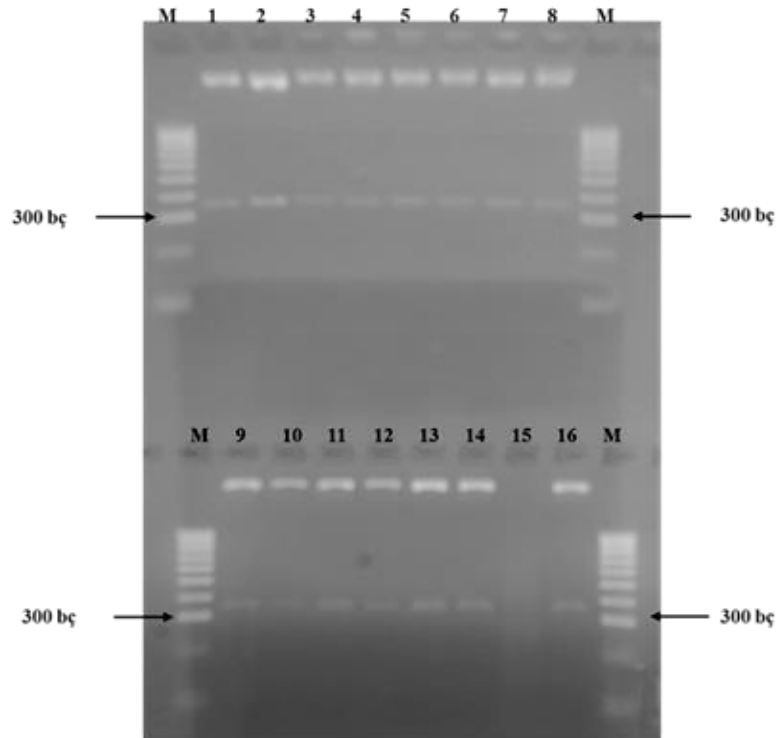
Elde edilen klonların sanal fiziksel haritaları hazırlanarak beklenen RE fragment büyüklükleri öngörülür hale getirilmiştir. pGEM-T Easy vektörünün uçlarının her iki yanında birer adet *EcoRI* tanıma dizisi mevcuttur. Dolayısıyla bu vektöre bir fragment bağlandıktan sonra rekombinant vektör *EcoRI* ile kesilerek vektör ve insert fragmentlerinin oluşumu sağlanabilir. Dolayısıyla elde edilen rekombinant plazmitler *EcoRI* enzimi ile kesilerek pGEM<sup>®</sup>-T Easy vektör fragmenti ve *mcyB* insertlerinin varlığı kontrol edildi. pGEM-T vektörü ile *mcyB* fragmentinin birleşmesiyle oluşması beklenen klonlar pMB olarak (Şekil 4.9) isimlendirildi. Sonuçta klonlar *EcoRI* enzimi ile kesildiğinde pMB klonlarında 3 kb ve 0.34 bç fragmentlerin oluşması gerekir. pMB rekombinant plazmitlerindin her birinden 20-30 kadar klon *EcoRI* enzimi ile kesilerek beklenen fragment büyüklüklerinin oluşup oluşmadığı gözlemlendi.



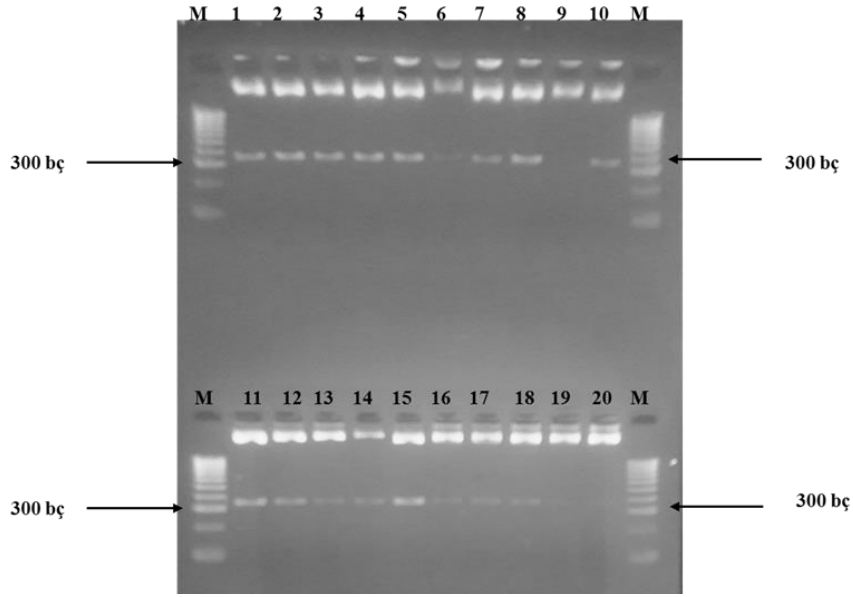
Şekil 4.9. *mcyB* geninin hedef bölgesinin ligasyonu ile oluşan rekombinant plazmitin (pMB) fiziksel haritası. 3335 bç büyüklüğündeki pMB 3305 bç pGEM-T Easy ve 300 bç *mcyB* gen bölgesini içermektedir. *mcyB* gen bölgesinin her iki ucunda birer adet *EcoRI* tanıma dizisi mevcuttur. Ayrıca ampisilin direnç geni de plazmit kopyası üzerinde gösterilmektedir.

Çevresel DNA'dan klonlanmış *mcvB* klonlarının restriksiyon fragment büyüklüğü ve DNA dizi analizleri

*mcvB* genini taşıyan pMB rekombinant plazmitlerinin *EcoRI* enzimi ile kesilerek oluşan fragmentler agaroz jel elektroforez ile ayrıştırılmıştır (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11). Klonların büyük çoğunluğunun beklenen 338 bç büyüklükte *mcvB* fragmentini taşıdığı belirlenmiştir. Elektroforez analiz sonucuna göre *mcvB* hedef gen bölgesini taşıdığı belirlenmiş rekombinant plazmitler ağustos ayına ait olanlar pMB10-33 olarak ve eylül ayına ait olanlar da pMB100-119 olarak isimlendirildi.



Şekil 4.10. Ağustos ayı çevresel DNA'sından elde edilen *mcvB* geninin hedef bölgesini içeren rekombinant plazmitlerin *EcoRI* kesimi sonucu oluşan fragmentlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M, 100 bç DNA belirteçleri (Bioline). Yol 1-20 *EcoRI* ile kesilmiş rekombinant plazmitler (pMB10-33)



Şekil 4.11. Eylül ayı çevresel DNA'sından elde edilen *mcyB* geninin hedef bölgesini içeren rekombinant plazmitlerin *EcoRI* kesimi sonucu oluşan fragmentlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M, 100 bç DNA belirteçleri (Bioline). Yol 1-20 *EcoRI* ile kesilmiş rekombinant plazmitler (pMB100-119)

Daha sonra ağustos ve eylül aylarına ait *mcyB* gen bölgesinin rastgele klonlandığı pMB klonlarından her birinden 12 adet klon geleneksel yöntemlerle hizmet alımı yoluyla diziletilirerek baz dizisi belirlenmiştir (Macrogen Inc.). Dizileme primeri olarak evrensel M13/pUC forward primeri kullanılmıştır. Elde edilen bu 24 adet dizi ve *Microcystis aeruginosa* NIES-2549 ve *Planktothrix agardhii* *mcyB* dizisi biyoinformatik yöntemlerle analiz edildi (PHYDIT ve MEGA6).

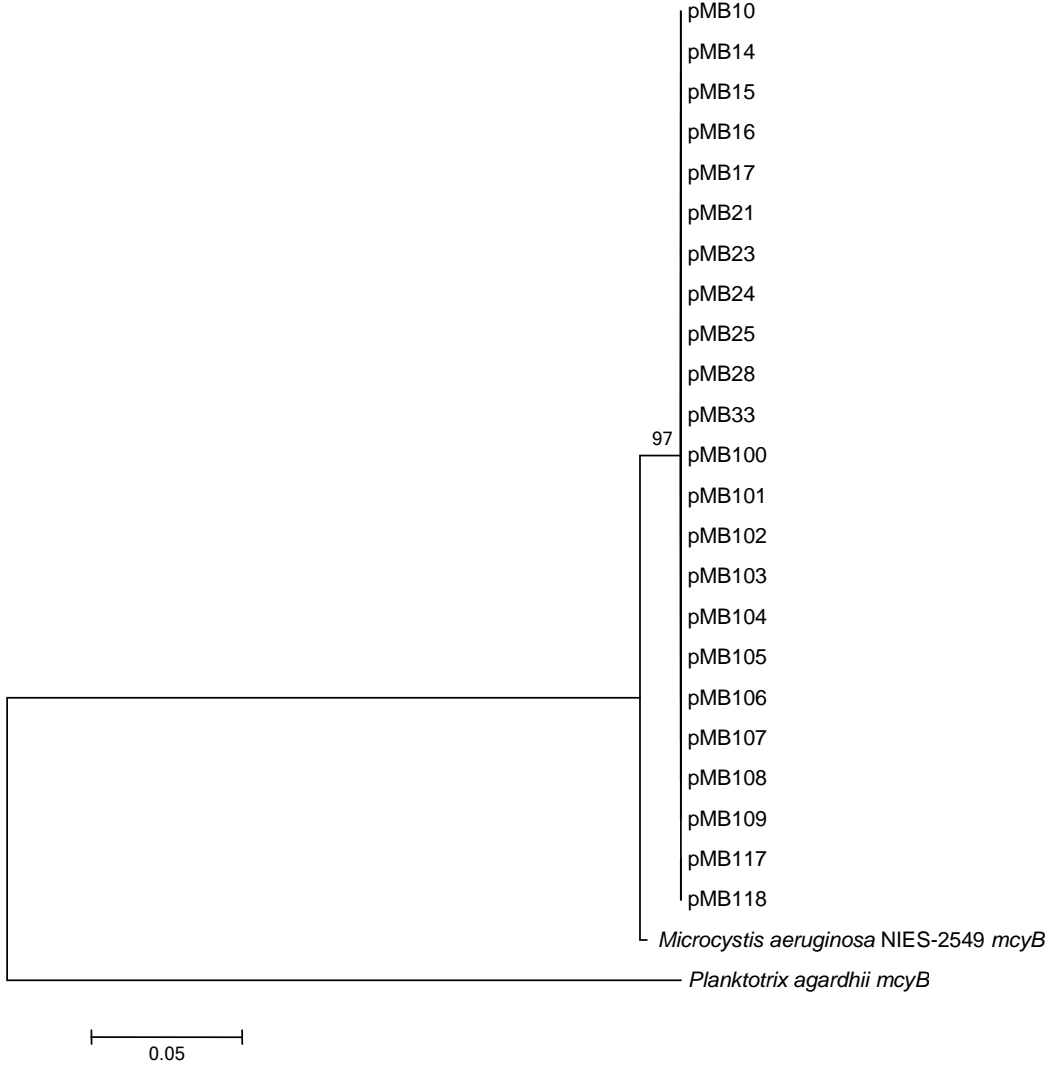
Klonlar ve standart suşlar arasındaki benzerlik ve farklılıklar Çizelge 4.3'te verilmektedir. Çizelgede de görüldüğü gibi *mcyB* klonlarının dizilerinin benzerliği pMB107 klonu hariç tam benzerlik göstermektedir. pMB107 klonu ise diğerlerinden sadece 1 nükleotit bakımından farklılık göstermektedir. Bu farklılık gerçek bir farklılık olabileceği gibi, dizileme sürecinden kaynaklanan bir hata da olabilir. Her iki durumda da bu klonun da diğerleriyle aynı gruba mensup olduğu anlaşılmaktadır. Klonlara ait diziler *Microcystis aeruginosa*'ya ait *mcyB* gen bölgesine %98 oranında benzerlik gösterirken, beklendiği gibi *Planktothrix agardhii* geni ile benzerlik %66 civarındadır.



Çizelge 4.3. *mcyB* gen bölgesinden elde edilmiş klonların yüzde benzerlik ve toplam nükleotit farklılıkları. Mic: *Microcystis* sp. *mcyB*, Plank: *Planktotrix agardhii mcyB*

	pMB10	pMB14	pMB15	pMB16	pMB17	pMB21	pMB23	pMB24	pMB25	pMB28	pMB33	pMB100	pMB101	pMB102	pMB103	pMB104	pMB105	pMB106	pMB107	pMB108	pMB109	pMB117	pMB118	Mic	Plank
pMB10	---	0/322	0/321	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	1/322	0/322	0/322	0/322	0/322	6/322	108/322
pMB14	100.00	---	0/321	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	1/322	0/322	0/322	0/322	0/322	6/322	108/322
pMB15	100.00	100.00	---	0/321	0/321	0/321	0/321	0/321	0/321	0/321	0/321	0/321	0/321	0/321	0/321	0/321	0/321	0/321	0/321	0/321	0/321	0/321	0/321	5/321	108/321
pMB16	100.00	100.00	100.00	---	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	1/322	0/322	0/322	0/322	0/322	6/322	108/322
pMB17	100.00	100.00	100.00	100.00	---	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	1/322	0/322	0/322	0/322	0/322	6/322	108/322
pMB21	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	---	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	1/322	0/322	0/322	0/322	0/322	6/322	108/322
pMB23	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	---	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	1/322	0/322	0/322	0/322	0/322	6/322	108/322
pMB24	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	---	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	1/322	0/322	0/322	0/322	0/322	6/322	108/322
pMB25	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	---	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	1/322	0/322	0/322	0/322	0/322	6/322	108/322
pMB28	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	---	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	1/322	0/322	0/322	0/322	0/322	6/322	108/322
pMB33	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	---	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	1/322	0/322	0/322	0/322	0/322	6/322	108/322
pMB100	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	---	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	1/322	0/322	0/322	0/322	0/322	6/322	108/322
pMB101	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	---	0/322	0/322	0/322	0/322	0/322	1/322	0/322	0/322	0/322	0/322	6/322	108/322
pMB102	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	---	0/322	0/322	0/322	0/322	1/322	0/322	0/322	0/322	0/322	6/322	108/322
pMB103	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	---	0/322	0/322	0/322	0/322	1/322	0/322	0/322	0/322	0/322	6/322	108/322
pMB104	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	---	0/322	0/322	0/322	1/322	0/322	0/322	0/322	0/322	6/322	108/322
pMB105	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	---	0/322	1/322	0/322	0/322	0/322	0/322	6/322	108/322
pMB106	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	---	1/322	0/322	0/322	0/322	0/322	6/322	108/322
pMB107	99.69	99.69	100.00	99.69	99.69	99.69	99.69	99.69	99.69	99.69	99.69	99.69	99.69	99.69	99.69	99.69	99.69	99.69	---	1/322	1/322	1/322	1/322	5/322	109/322
pMB108	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.69	---	0/322	0/322	0/322	6/322	108/322
pMB109	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.69	100.00	---	0/322	0/322	6/322	108/322
pMB117	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.69	100.00	100.00	---	0/322	6/322	108/322
pMB118	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.69	100.00	100.00	100.00	---	6/322	108/322
Mic	98.14	98.14	98.44	98.14	98.14	98.14	98.14	98.14	98.14	98.14	98.14	98.14	98.14	98.14	98.14	98.14	98.14	98.14	98.45	98.14	98.14	98.14	98.14	---	108/325
Plank	66.46	66.46	66.36	66.46	66.46	66.46	66.46	66.46	66.46	66.46	66.46	66.46	66.46	66.46	66.46	66.46	66.46	66.46	66.15	66.46	66.46	66.46	66.46	66.77	---

Neighbor-joining algoritması Jukes-Cantor modeline göre filogenetik ağaç oluşturularak araştırma alanından elde edilen *mcyB* genlerinin akrabalık ilişkileri analiz edildi (Şekil 4.12).

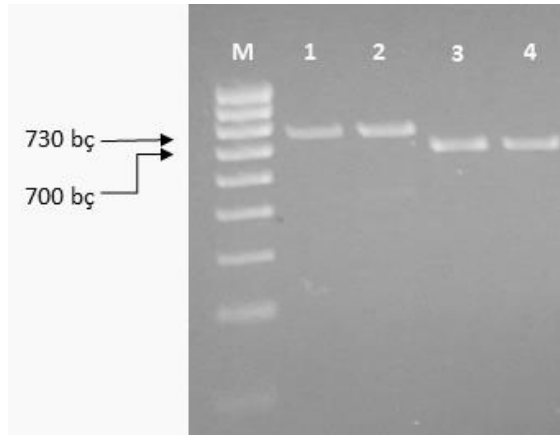


Şekil 4.12. Dizisi belirlenen *mcyB* fragmentlerinin evrimsel ilişkilerini gösteren filogenetik ağaç. Evrimsel geçmiş Neighbor-joining metodu Jukes-Cantor modeli kullanılarak oluşturulmuştur. Evrimsel analizler Mega 6 programında yapılmıştır (Tamura vd, 2013)

#### 4.3.6 *cpcBA* ve *rpoCI* gen bölgelerinin amplifikasyonu, rastgele klonlanması ve dizilenmesi

Aynı tür içinde bile toksin gen kümesini taşıyan ve taşımayan soylar mevcuttur. Dolayısıyla toksin gen bölgelerindeki farklılık sadece toksin üreten soylar arasındaki genetik farklılıklar hakkında bilgi verir. *mcyB* dizi analizlerinin sonuçları ağustos ve eylül aylarında Akgöl'deki *Microcystis* üyelerinin genotipik olarak oldukça homojen olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar Akgöl gölünde toksigenik olmayan siyanobakteri üyelerinin durumu hakkında bilgi vermez. Siyanobakteriyel suşların göldeki mevcudiyeti hakkında daha genel bilgilere ulaşmak üzere iki ilave belirteç gen kullanılarak genotipik çeşitliliğin belirlenmesi için deneyler yürütüldü. Bu amaç için bütün siyanobakteriler için esasi olan iki gen (housekeeping gene) RNA polimeraz gama ( $\gamma$ ) altbirimini kodlayan gen (*rpoCI* geni) ve fikosiyanın gen bölgesi (*cpcBA* bölgesi) genotipik çeşitlilik bakımından araştırıldı.

Siyanobakterilerin geneli için özgül olan primerler kullanılarak *rpoCI* ve *cpcBA* genlerinin belli bölgeleri PCR ile amplifiye edilmiştir. *rpoCI* geni için *RpoCI* F ve *RpoCI* R primerleri, *cpcBA* gen bölgesi için PC $\beta$  F ve PC $\alpha$  R primerleri kullanılarak ağustos ayına ait çevresel DNA örneğinde yukarıda anlatıldığı gibi PCR işlemleri uygulandı ve ampliconlar elde edildi. *rpoCI* ampliconu 730 bç ve *cpcBA* ampliconu da 685 bç'dir (Şekil 4.13).

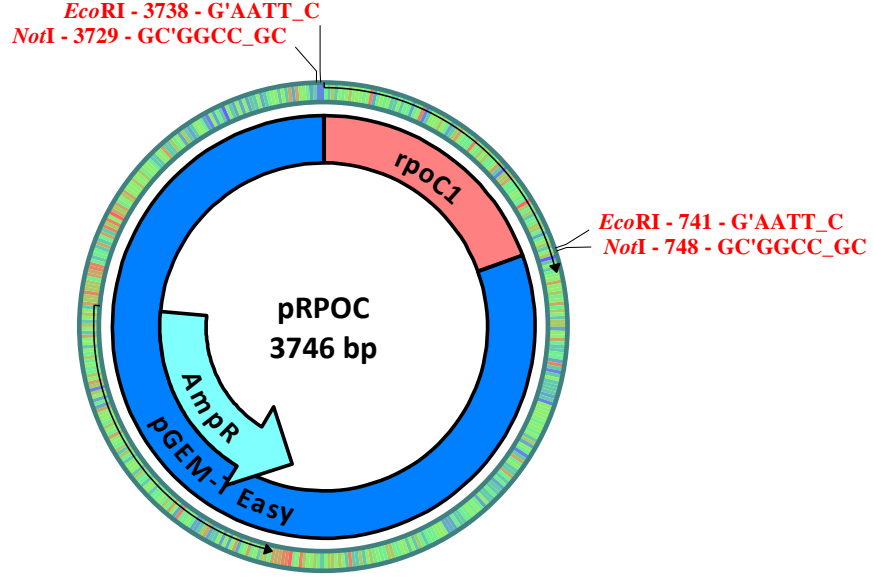


Şekil 4.13. Ağustos ayı çevresel DNA'sı kalıp olarak kullanılarak elde edilen *cpcBA* ve *rpoCI* genlerinin PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M, 100 bç Marker (belirteç) (Bioline). Yol 1-2 *rpoCI* bölgesi ve yol 3-4 *cpcBA* bölgesi çoğaltım ürünleri. Elektroforez ortamı olarak %2.5'lik agaroz jel kullanılmıştır. Amplicon büyüklükleri *rpoCI* için 730 bç ve *cpcBA* için 685 bç, MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu Yol 1-3: 3 mM, Yol 2-4: 4 mM'dir. Çevresel DNA 10<sup>-1</sup> oranında sulandırılarak kalıp olarak kullanılmıştır.

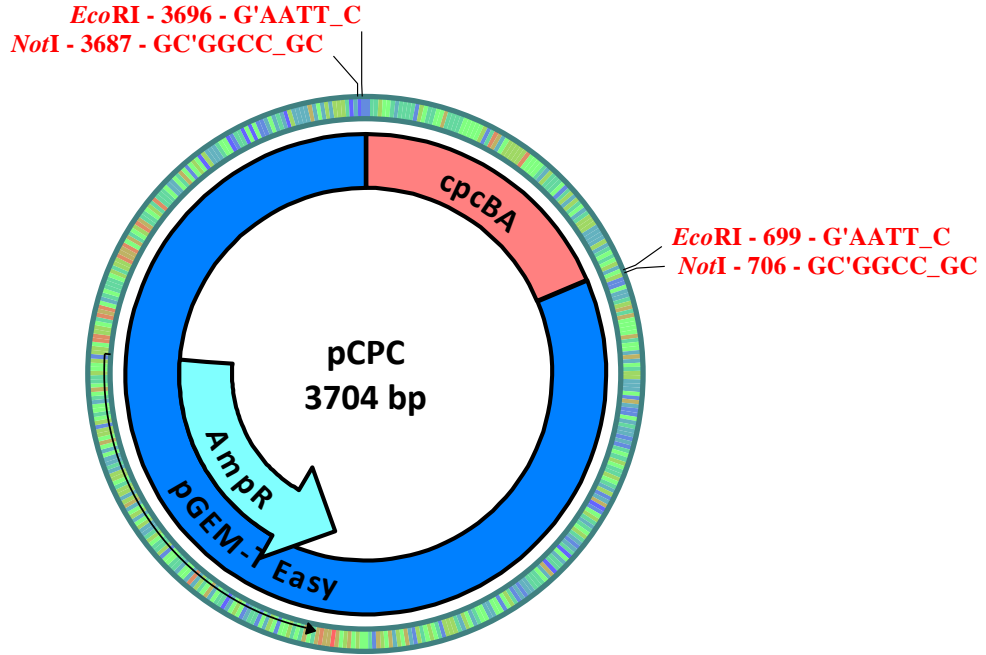
*rpoC1* ve *cpcBA* geninin PCR ürünlerinin yoğunluğunu belirlemek ve ligasyon reaksiyonunda kullanılacak insert miktarının hesaplanması için 1 µl saflaştırılan PCR ürünü ve her bir fragmentinin miktarı bilinen 1 µl 100 bç DNA belirteci ile elektroforetik olarak analiz edildi. DNA belirtecinin 700 bp fragmenti ile *rpoC1* ve *cpcBA* geni PCR ürününün yoğunluğu (sırasıyla 730 bç ve 685 bç) karşılaştırılarak DNA miktarı belirlendi. Buna göre ağustos ayı çevresel DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı insert (hedef DNA fragmenti, PCR ürünü) miktarı *rpoC1* 10 ng/µl, *cpcBA* gen bölgesi için 8 ng/µl olarak belirlendi. Daha sonra Bölüm 3.9.2'de verilen formüle göre kullanılacak insert miktarları hesaplandı. Her bir ligasyon reaksiyonunda 50 ng vektör kullanılmıştır. İntert büyüklüğü *rpoC1* için 0.73 kb (730 bp), *cpcBA* için 0.685 (685 bp), vektör büyüklüğü ise 3 kb'dır. Ligasyon reaksiyonlarında 3:1 ve 1:1 insert:vektör oranları kullanılarak 2 farklı ligasyon karışımı hazırlandı ve gece boyu +4°C'de inkübasyona bırakıldı. Ligasyondan sonra alıcı hale getirilmiş *E. coli* DH5-α hücrelerine transforme edildi ve transformantlar 100 mg/ml ampicilin içeren besiyerinde üretildi. 3:1 insert:vektör oranında daha fazla olmak üzere her iki ligasyon reaksiyonundan da rekombinant plazmitlerin oluştuğu gözlemlendi.

#### Çevresel DNA'dan klonlanmış *rpoC1* ve *cpcBA* klonlarının restriksiyon fragment büyüklüğü ve DNA dizi analizleri

Siyanobakteriyel genom dizilerinden ve pGEM-T Easy vektör dizisinden faydalanılarak klonların fiziksel haritaları oluşturuldu. pGEM-T vektörü ile *rpoC1* fragmentinin birleşmesiyle oluşması beklenen bu klonlar pRPOC olarak (Şekil 4.14) ve *cpcBA* fragmentinin birleşmesiyle oluşması beklenen klonlar pCPC olarak (Şekil 4.15) isimlendirildi. Sonuçta klonlar *EcoRI* enzimi ile kesildiğinde pRPOC1 klonlarında 2997 bç ve 731 bç ve pCPC klonlarında 2997 bç ve 685 bç fragmentlerin oluşması gerekir. pRPOC ve pCPC rekombinant plazmitlerinin her birinden 20-30 kadar klon *EcoRI* enzimi ile kesilerek beklenen fragment büyüklüklerinin oluşup oluşmadığı gözlemlendi.

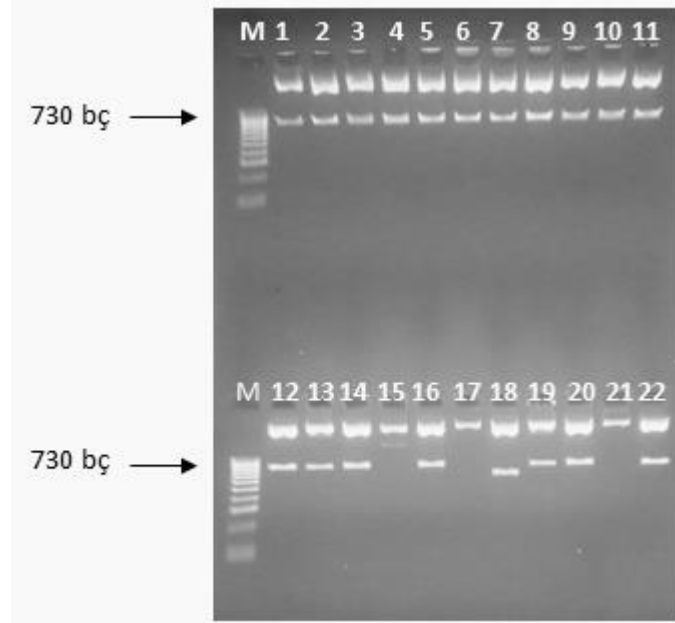


Şekil 4.14. *rpoC1* geninin hedef bölgesinin ligasyonu ile oluşan rekombinant plazmidin (pRPOC) fiziksel haritası. 3335 bç büyüklüğündeki pRPOC, 3305 bç pGEM-T Easy ve 730 bç *rpoC1* gen bölgesini içermektedir. Ayrıca ampisilin direnç geni de plazmit kopyası üzerinde gösterilmektedir.



Şekil 4.15. *cpcBA* geninin hedef bölgesinin ligasyonu ile oluşan rekombinant plazmidin (pCPC) fiziksel haritası. 3335 bç büyüklüğündeki pCPC, 3305 bç pGEM-T Easy ve 685 bç *cpcBA* gen bölgesini içermektedir. Ayrıca ampisilin direnç geni de plazmit kopyası üzerinde gösterilmektedir.

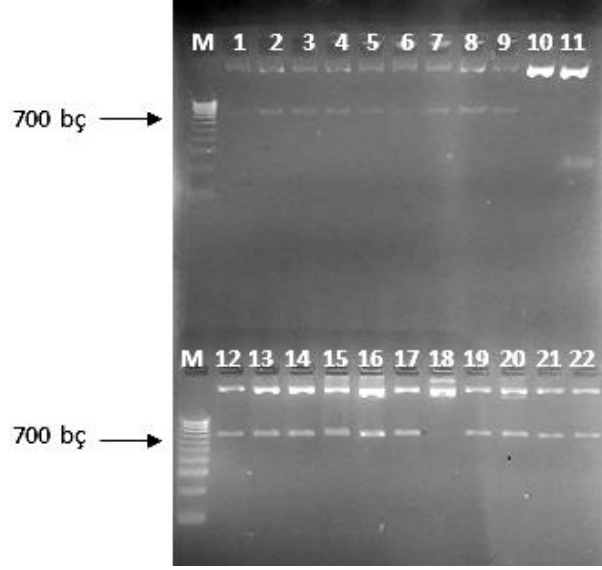
*rpoC1* genini taşıyan pRPOC1 rekombinant plazmitlerinin *EcoRI* enzimi ile kesimi sonucu oluşan fragmentlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.16'de görülmektedir. Analiz edilen 22 klondan 18 klonda beklenen insert gözlemlenmiştir. 4 klonda ise (yol 15,17,18 ve 21) ya bir insert mevcut değildir ya da istenen büyüklükte değildir. Doğru fragmenti taşıdığına karar verilen klonlar pRPOC1-pRPOC18 şeklinde isimlendirilmiştir.



Şekil 4.16. Ağustos ayı çevresel DNA'sından elde edilen *rpoC1* geninin hedef bölgesini içeren rekombinant plazmitlerin *EcoRI* kesimi sonucu oluşan fragmentlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M, 100 bç DNA belirteçleri (Bioline). Yol 1-22 *EcoRI* ile kesilmiş rekombinant plazmitler (pRPOC 1-18)

Aynı yöntemle elde edilen *cpcBA* genini taşıyan pCPC rekombinant plazmitlerinin de *EcoRI* enzimi ile kesiminin sonucunda oluşan fragmentlerin jel elektroforez sonuçları Şekil 4.17'da verilmiştir. Analiz edilen 22 klondan 19 klonda istenilen büyüklükte fragment belirlenmiş sadece 3 klonda gözlemlenmemiştir. İstenilen fragmenti taşıyan rekombinant plazmitler pCPC1-pCPC19 olarak isimlendirilmiştir.

Ağustos ayına ait *rpoC1* ve *cpcBA* gen bölgelerinin rastgele ligasyonu ile elde edilen klonların her birinden 15 adeti geleneksel yöntemlerle dizilettirilerek baz dizisi belirlenmiştir (Macrogen Inc.). Dizileme primeri olarak M13/pUC forward primer kullanılmıştır.



Şekil 4.17. Ağustos ayı çevresel DNA'sından elde edilen *cpcBA* geninin hedef bölgesini içeren rekombinant plazmitlerin *EcoRI* kesimi sonucu oluşan fragmentlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M, 100 bç DNA belirteçleri (Bioline). Yol 1-22 *EcoRI* ile kesilmiş rekombinant plazmitler (pCPC 1-19)

Yapılan Blast ve karşılaştırma (alignment) çalışmaları sonucunda ilgili gen bölgelerini taşıyan klonlara ait diziler benzerlik oranları ve nükleotit farklılıkları bakımından PHYDIT paket programı kullanılarak analiz edilmiştir (Çizelge 4.4). Mega 6.06 programı kullanılarak filogenetik ağaç oluşturmak için eklenen bilinen suşlara ait gen bölgesinin dizileri Cyanobase veri tabanından (Anonymus-7) sağlanmıştır.

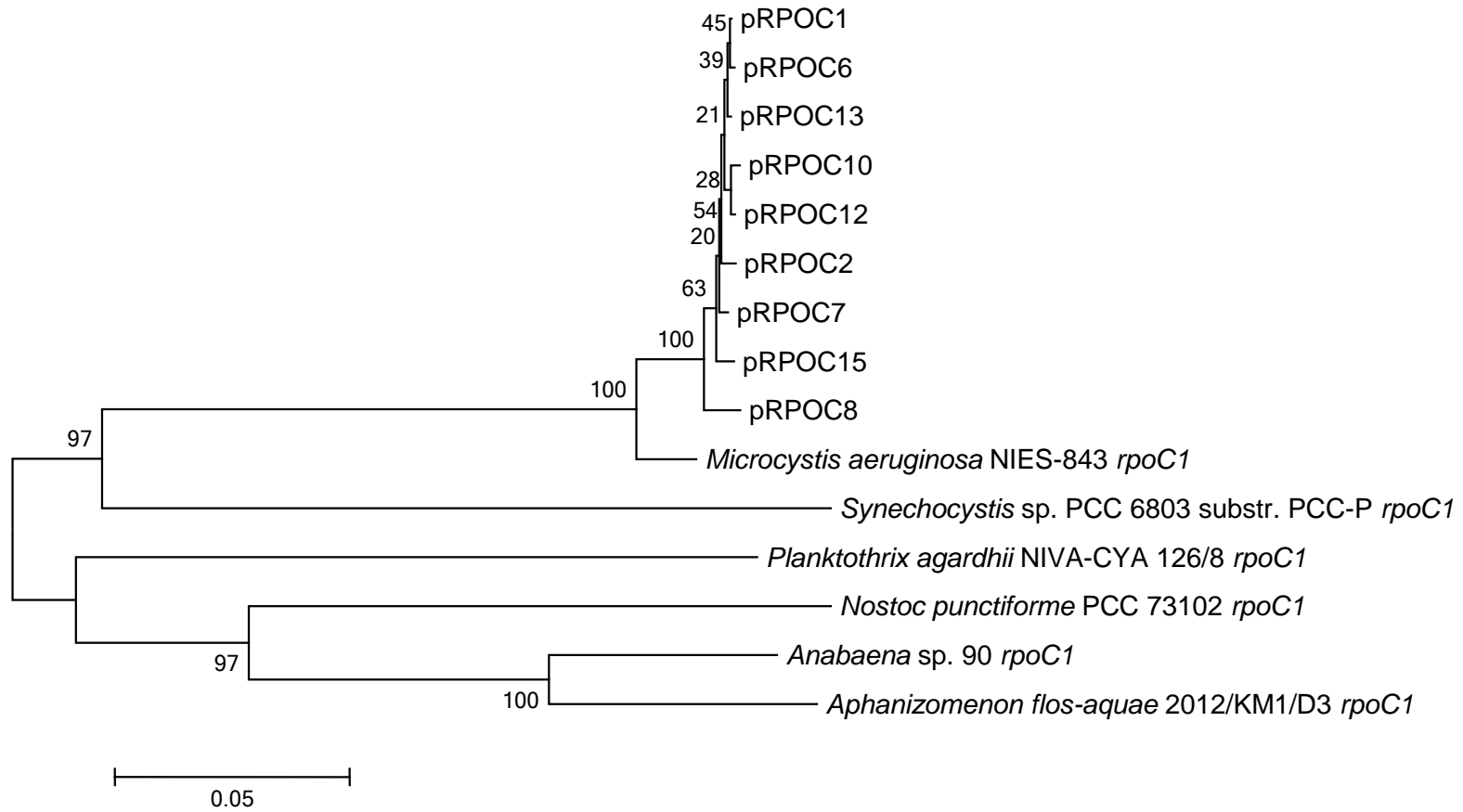
Ağustos *rpoCI* fragmentlerini taşıyan pRPOC klonları pRPOC8 dışında tamamı %99 oranında benzerlik göstermektedir. PRPOC8 ise diğerlerinden %98 oranında benzerlik göstermektedir. Klonlar arasındaki farklılık oranları %1-2 arasında olup aynı türaltı gruba mensup olmaları olasıdır. Her ne kadar düşük oranda da olsa *mcyB* geniyle karşılaştırıldığında farklılıklar nispeten daha fazladır. Diğer standart suşlarla karşılaştırıldığında %96 oranıyla en fazla *Microcystis aeruginosa*'ya benzerken diğerleriyle benzerlik oranları %72-75 arasındadır.

Ağustos ayına ait çevresel DNA'dan elde edilen *rpoCI* dizileri MEGA6 paket programı kullanılarak Neighbor-joining metodu Jukes-Cantor modeline göre filogenetik ağaç oluşturuldu (Şekil 4.18). Filogenetik ağaçta da görüldüğü gibi ağustos ayı *rpoCI* fragmentleri *Microcystis aeruginosa* NIES-843 ile yakın akrabalık ilişkisine sahiptir.

Çizelge 4.4. *rpoC1* gen bölgesinden elde edilmiş klonların yüzde benzerlik ve toplam nükleotit farklılıkları. Syneç: *Synechocystis* sp. PCC 6803 substr. PCC-P *rpoC1*, Ana: *Anabaena* sp. 90 *rpoC1*, Apha: *Aphanizomenon flos-aquae* 2012/KM1/D3 *rpoC1*, Mic: *Microcystis aeruginosa* NIES-843 *rpoC1*, Nostoc: *Nostoc punctiforme* PCC 73102 *rpoC1*, Plank: *Planktothrix agardhii* NIVA-CYA 126/8 *rpoC1*.

	pRPOC1	pRPOC2	pRPOC6	pRPOC7	pRPOC8	pRPOC10	pRPOC12	pRPOC13	pRPOC15	Syneç	Ana	Apha	Mic	Nostoc	Plank
pRPOC1	---	4/731	1/731	3/731	10/731	4/731	3/731	1/731	5/731	177/731	186/731	193/731	24/731	193/731	186/731
pRPOC2	99.45	---	5/731	4/731	12/731	5/731	5/731	3/731	5/731	176/731	187/731	192/731	24/731	194/731	186/731
pRPOC6	99.86	99.32	---	4/731	10/731	3/731	2/731	2/731	6/731	177/731	187/731	192/731	24/731	193/731	186/731
pRPOC7	99.59	99.45	99.45	---	9/731	4/731	4/731	3/731	4/731	177/731	185/731	192/731	24/731	195/731	187/731
pRPOC8	98.63	98.36	98.63	98.77	---	10/731	8/731	10/731	12/731	176/731	186/731	193/731	26/731	196/731	185/731
pRPOC10	99.45	99.32	99.59	99.45	98.63	---	2/731	4/731	7/731	177/731	188/731	192/731	25/731	195/731	188/731
pRPOC12	99.59	99.32	99.73	99.45	98.91	99.73	---	3/731	7/731	175/731	188/731	192/731	23/731	194/731	186/731
pRPOC13	99.86	99.59	99.73	99.59	98.63	99.45	99.59	---	6/731	177/731	187/731	192/731	24/731	192/731	187/731
pRPOC15	99.32	99.32	99.18	99.45	98.36	99.04	99.04	99.18	---	174/731	185/731	191/731	22/731	198/731	185/731
Syneç	75.79	75.92	75.79	75.79	75.92	75.79	76.06	75.79	76.20	---	206/731	194/731	167/731	199/731	199/731
Ana	74.56	74.42	74.42	74.69	74.56	74.28	74.28	74.42	74.69	71.82	---	72/731	190/731	150/731	183/731
Apha	73.60	73.73	73.73	73.73	73.60	73.73	73.73	73.73	73.87	73.46	90.15	---	195/731	151/731	192/731
Mic	96.72	96.72	96.72	96.72	96.44	96.58	96.85	96.72	96.99	77.15	74.01	73.32	---	200/731	184/731
Nostoc	73.60	73.46	73.60	73.32	73.19	73.32	73.46	73.73	72.91	72.78	79.48	79.34	72.64	---	176/731
Plank	74.56	74.56	74.56	74.42	74.69	74.28	74.56	74.42	74.69	72.78	74.97	73.73	74.83	75.92	---





Şekil 4.18. Dizisi belirlenen *rpoC1* fragmentlerinin evrimsel ilişkilerini gösteren filogenetik ağaç. Evrimsel geçmiş Neighbor-joining metodu Jukes-Cantor modeli kullanılarak oluşturulmuştur. Evrimsel analizler Mega 6 programında yapılmıştır (Tamura vd, 2013)

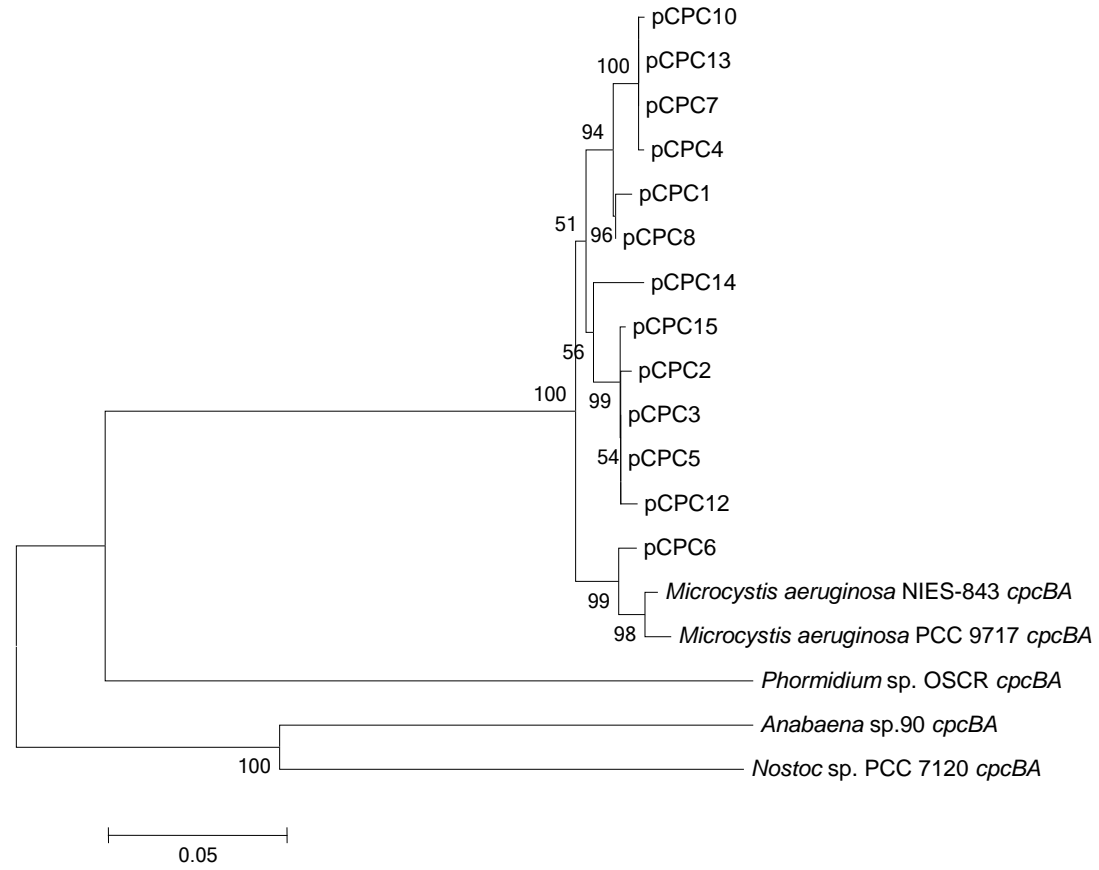
Ağustos *cpcBA* fragmentlerini taşıyan pCPC klonlarının nükleotit benzerlikleri diğer iki gene göre nispeten daha azdır. Benzerlik oranları %96-100 arasında değişmektedir. İki klon pCPC3 ve pCPC5 bir birine tam benzerlik gösterir. En yüksek farklılık oranı benzerlik oranı %4 ile pCPC6 klonuna ait olup diğerleriyle %96 oranında benzerlik göstermektedir. Diğer klonların benzerlik oranları %97-99 arasında değişmektedir. Klonların *Microcystis aeruginosa cpcBA* gen bölgesine benzerliği %95-98 arasında iken diğer suşlar ile benzerlik oranı %70 civarındadır (Çizelge 4.5).

Aynı şekilde Ağustos ayına ait çevresel DNA'dan elde edilen *cpcBA* dizilerinden MEGA6.06 paket programı kullanılarak Neighbor-joining metodu Jukes-Cantor modeline göre filogenetik ağaç oluşturuldu (Şekil 4.18). Filogenetik ağaçtan da anlaşılacağı gibi gruplar arasındaki en büyük genetik çeşitlilik bu gen bölgesinde görülmüştür.

Her üç gene ait sonuçlara dayanılarak Akgöl'de toksin üreten *Microcystis* spp. gruplarının baskın grup olduğu anlaşılmaktadır. Diğer esasi gen bölgelerini (housekeeping genes) analizi sonuçları göl suyunda toksigenik gruplar dışında baskın olmasalarda diğer grupların da temsil ediliyor olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.5 *cpcBA* gen bölgesinden elde edilmiş klonların yüzde benzerlik ve toplam nükleotit farklılıkları. Ana: *Anabaena* sp.90 *cpcBA*, Mic-a: *Microcystis aeruginosa* NIES-843 *cpcBA*, Mic-b: *Microcystis aeruginosa* PCC 9717 *cpcBA*, Phr: *Phormidium* sp. OSCR *cpcBA*. PHYDIT programı kullanılarak yapılmıştır.

	pCPC1	pCPC2	pCPC3	pCPC4	pCPC5	pCPC6	pCPC7	pCPC8	pCPC10	pCPC12	pCPC13	pCPC14	pCPC15	Ana	Mic-a	Mic-b	Nostoc	Phr
pCPC1	---	16/663	14/663	9/663	14/663	24/663	8/663	3/663	9/663	17/663	8/663	20/663	15/663	195/659	27/663	30/663	195/660	179/663
pCPC2	97.59	---	2/663	19/663	2/663	21/663	18/663	13/663	19/663	5/663	18/663	17/663	3/663	196/659	25/663	27/663	195/660	179/663
pCPC3	97.89	99.70	---	17/663	0/663	19/663	16/663	11/663	17/663	3/663	16/663	15/663	1/663	196/659	23/663	25/663	193/660	179/663
pCPC4	98.64	97.13	97.44	---	17/663	23/663	1/663	6/663	2/663	20/663	1/663	23/663	18/663	191/659	28/663	29/663	197/660	180/663
pCPC5	97.89	99.70	100.00	97.44	---	19/663	16/663	11/663	17/663	3/663	16/663	15/663	1/663	196/659	23/663	25/663	193/660	179/663
pCPC6	96.38	96.83	97.13	96.53	97.13	---	22/663	21/663	23/663	22/663	22/663	24/663	20/663	197/659	11/663	12/663	197/660	182/663
pCPC7	98.79	97.29	97.59	99.85	97.59	96.68	---	5/663	1/663	19/663	0/663	22/663	17/663	192/659	27/663	30/663	196/660	179/663
pCPC8	99.55	98.04	98.34	99.10	98.34	96.83	99.25	---	6/663	14/663	5/663	17/663	12/663	194/659	24/663	27/663	194/660	178/663
pCPC10	98.64	97.13	97.44	99.70	97.44	96.53	99.85	99.10	---	20/663	1/663	23/663	18/663	193/659	28/663	31/663	196/660	180/663
pCPC12	97.44	99.25	99.55	96.98	99.55	96.68	97.13	97.89	96.98	---	19/663	18/663	4/663	199/659	26/663	28/663	194/660	182/663
pCPC13	98.79	97.29	97.59	99.85	97.59	96.68	100.00	99.25	99.85	97.13	---	22/663	17/663	192/659	27/663	30/663	196/660	179/663
pCPC14	96.98	97.44	97.74	96.53	97.74	96.38	96.68	97.44	96.53	97.29	96.68	---	16/663	199/659	27/663	28/663	198/660	179/663
pCPC15	97.74	99.55	99.85	97.29	99.85	96.98	97.44	98.19	97.29	99.40	97.44	97.59	---	197/659	24/663	26/663	193/660	178/663
Ana	70.41	70.26	70.26	71.02	70.26	70.11	70.86	70.56	70.71	69.80	70.86	69.80	70.11	---	196/659	197/659	155/679	233/679
Mic-a	95.93	96.23	96.53	95.78	96.53	98.34	95.93	96.38	95.78	96.08	95.93	95.93	96.38	70.26	---	7/663	199/660	179/663
Mic-b	95.48	95.93	96.23	95.63	96.23	98.19	95.48	95.93	95.32	95.78	95.48	95.78	96.08	70.11	98.94	---	203/660	183/663
Nostoc	70.45	70.45	70.76	70.15	70.76	70.15	70.30	70.61	70.30	70.61	70.30	70.00	70.76	77.17	69.85	69.24	---	217/689
Phr	73.00	73.00	73.00	72.85	73.00	72.55	73.00	73.15	72.85	72.55	73.00	73.00	73.15	65.68	73.00	72.40	68.51	---



Şekil 4.19. Dizisi belirlenen *cpcBA* fragmentlerinin evrimsel ilişkilerini gösteren filogenetik ağaç. Evrimsel geçmiş Neighbor-joining metodu Jukes-Cantor modeli kullanılarak oluşturulmuştur. Evrimsel analizler Mega 6 programında yapılmıştır (Tamura vd, 2013)

## 5. TARTIŞMA

Bu tez çalışması Samsun Terme Akgöl gölündeki toksigenik siyanobakteri suşlarının varlığını metagenomik yöntemler ile belirlemek amacıyla yapılmıştır. Böylece toksigenik suşların yılın hangi aylarında temsil edildiği belirlenmiştir. Akgöl'de Haziran 1997 ve Mayıs 1998 yılları arasında Ersanlı vd, (2011) tarafından fitoplankton üzerine yapılan çalışmada mikroskobik gözlemlerde bazı siyanobakteri suşlarının varlığından da söz edilmektedir. Bu çalışmada sınırlı sayıda siyanobakteri grubundan sözedilmekte olup siyanobakteri komünitesi hakkında yeterli bilgi sağlamamaktadır. Dolayısıyla bu araştırma ile Akgöl gölü toksigenik siyanobakteri komünitesi moleküler yöntemler ile ilk kez araştırılmıştır.

Metagenomik çalışmalarda, diğer bir ifade ile çevresel genomik çalışmalarda etkili bir DNA izolasyon yöntemi kritik basamaklardan birisidir. Siyanobakteri komünitelerinin analizi araştırmalarında başarılı bir şekilde uygulanan bir yöntemle çevresel DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Giovannoni vd, 1990). Yine de uygulanan bu yöntemin ne kadar kusursuz olduğuna karar vermek şüphesiz zordur, elde edilen sonuçların daha duyarlı olması için daha etkili izolasyon yöntemlerin hala geliştirilebilir olduğu göz ardı edilemez.

Siyanobakteri komünite üyelerinin taranma gücünün bilinmesi önemlidir. Bir populasyonun moleküler analizlerle belirlenebilmesi için kaç hücreyle temsil edilmesi gerektiği öncelikle standart *Synechocystis* sp. PCC6803 suşu kullanılarak belirlenmiştir. Hücre sayısı belirlenmiş belli hacimdeki saf kültürden DNA izolasyonu yapıldıktan sonra amplifikasyonu gerçekleştirilebilir en az genom sayısı 1000 olarak hesaplanmıştır. Bunun anlamı her bir PCR reaksiyonu için 1000 siyanobakteri genomu gereklidir. Şüphesiz ki bu tarama gücü nispeten zayıftır. Bu düşük tarama gücünün nedeni genomik DNA izolasyon yönteminden kaynaklanan zorluklar olabileceği gibi PCR bileşenlerinin etkinliği ile de ilgili olabilir. Ancak yine de uygulanan yöntemle siyanobakteri komünite üyelerinin taranabilir olduğu ortadadır.

Çevresel genomik araştırmalarda daha kapsamlı sonuçlar izole edilen bütün genomların gelecek nesil (next-generation, NG) dizileme yöntemleriyle tam genom dizilerinin belirlenmesi olsa da daha hızlı sonuçlar elde etmek üzere indikatör gen

dizilerinin amplifikasyonu ve dizilenmesi de yaygın kullanılan bir yöntemdir (Pearson ve Neilan, 2008; Cheung vd, 2013; Corbel vd, 2014). Bu çalışmada siyanobakteriyel araştırmalarda (Nübel vd, 1997; Rinta-Kanto vd, 2005; Rantala vd, 2003; Neilan, 2002) başarılı bir şekilde indikatör olarak kullanılmakta olan 16S rDNA, *mcyB*, *mcyD*, *rpoCI* ve *cpcBA* gen veya DNA bölgeleri olarak taranmıştır.

16S rDNA geninin belli bölgelerini çoğaltmak için siyanobakteri spesifik ve *Microcystis* spesifik primer çiftleri kullanılarak yapılan çalışmalarda siyanobakterilerin Haziran-Ekim ayları arasında mevcut olduğu ve siyanobakterilerin mevcut olduğu her periyotta *Microcystis* üyelerinin de temsil edildiği belirlenmiştir. Aynı seyreltme değerlerinde aynı aya ait çevresel DNA kalıp olarak kullanılarak yapılan PCR amplifikasyon çalışmalarında elde edilen ürün yoğunluklarının benzerliğine bakılarak baskın siyanobakteriyel komünite üyelerinin *Microcystis* grubuna dâhil olduğu değerlendirilebilir. Siyanobakterilerin taranabilir olduğu Haziran-Ekim ayları arasındaki su sıcaklıkları daha yüksektir. Gerçekte yüksek sıcaklıkların tek hücreli ökaryotik algere göre siyanobakteriler için daha avantajlı olduğu bilinen bir gerçektir (Boopathi ve Ki, 2014). Kasım-mayıs ayları arasında siyanobakteri üyelerine ait 16S rDNA bölgeleri çoğaltılamamıştır. Bu sonuçlar bu aylarda siyanobakteri komünitesinin temsil edilmediği şeklinde yorumlanması yanıltıcı olabilir. Yılın bu döneminde su sıcaklıklarının düşük olması siyanobakteriler için olumsuz bir durum oluşturur. Dolayısıyla populasyon büyüklüklerinin sınırlanması normal bir durumdur. Ancak bu çalışmada uygulanan test düzeneğinin duyarlılık sınırının altındaki bir miktarda Akgöl'de temsil ediliyor olmaları beklenir.

*Microcystis* spp. üyeleri arasında mikrosistin genlerine sahip olan grupların varlığı mikrosistin sentezini yöneten gen kümesi üyelerinden *mcyB* ve *mcyD* genlerinin belli bölgeleri spesifik primerler kullanılarak PCR amplifikasyonu ile tarandı. *Microcystis* spp. üyelerinin mevcut olduğu bütün aylarda bu iki gen bölgesinin amplifiye edilebildiği belirlendi. Dolayısıyla *Microcystis* spp. üyelerinin içinde daima toksin üretme yeteneğinde olan grupların mevcut olduğu anlaşılmaktadır. Ancak organizmanın toksin genine sahip olmasıyla toksin geninin ekspresyonunun yapılması ve toksin üretimi arasındaki farkı gözardı etmemek gerekir. Organizma toksin genlerine sahip olsa bile bu genlerin ekspresyonunu geçekleştirmeyebilir ve dolayısıyla toksin üretimi yapmıyor olabilir. Toksigenik bir

populasyonun hangi şartlara maruz kaldığında toksin ürettiği tam olarak bilinmemektedir (Kleinteich vd, 2012). Ayrıca toksin üreten siyanobakterilerin ürettikleri toksini hücre dışına salgıladıklarını gösteren bir bilgi mevcut değildir. Toksin, hücre içerisinde üretilmekte ve hücrenin parçalanması sonucunda suya salınmaktadır. Toksinin suya salınması veya toksin üreten hücreler ile beslenen organizmalar toksine maruz kalmaktadır (Kaushik ve Balasubramanian, 2013; Cheung vd, 2013; Boopathi ve Ki, 2014). Büyük çaplı populasyon üremelerinde (bloom) kitlesel ölümler sonucunda su kütlesi içinde zararlı düzeyde toksin birikimi mümkün hale gelmektedir. Mevcut literatür bilgilerine göre siyanobakterilerin hangi şartlar altında toksin ürettikleri tam olarak bilinmese de (Boopathi ve Ki, 2014) potansiyel olarak Akgöl *Microcystis* spp. üyeleri toksin üretme yeteneğinde olduğu açıktır ve potansiyel bir tehdit olarak durmaktadırlar.

Siyanobakterilerde sadece mikrosistin değil diğer tip toksinler üreten gruplar da vardır (Pearson vd, 2010). Bu çalışmada diğer toksin genleri için spesifik primerler kullanılarak taranmıştır. Ancak herhangi bir PCR ürünü elde edilememiştir. Akgöl'de en azından su örneklerinin alındığı yüzeyaltı tabakasında görünüme göre *Microcystis* spp. üyeleri baskın siyanobakteri grubudur. Bir olasılık diğer grupların mevcut olmadığıdır. Ancak yine de bu çalışmada uygulanan test düzeneğinin duyarlılık sınırı göz ardı edilmemelidir.

Çevresel DNA'dan elde edilen amplikonların nükleotit dizileri belli bir ortamdaki bakteriyel grupların biyoçeşitliliğinin belirlenmesi için yaygın kullanılan bir yöntemdir (Nonneman ve Zimba, 2002; Ngwa vd, 2014, Mbedi vd, 2005, Rantala vd, 2011). Toksigenik *Microcystis* spp. üyelerinin genotipik çeşitliliğinin belirlenmesi için aşırı populasyon büyümesinin gerçekleştiği ağustos ve eylül aylarına ait *mcyB* amplikonlarının nükleotit dizileri analiz edilmiştir. Karışık fragmentlerden oluşan bir amplikon olması nedeniyle öncelikle fragmentler klonlanmış ve her klonun içerdiği fragmentlerin dizileri belirlenerek filogenetik analizlere tabii tutulmuştur. Analizlerin sonuçlarından *mcyB* geninin hemen hemen hiç farklılık göstermediği ve dolayısıyla tek bir genotip olarak temsil edildikleri anlaşılmıştır. Bu bulgu göl suyunda tek bir siyanobakteriyel suşun mu temsil ediliyor olduğu sorusunu doğurmuştur. Bu soruyu cevaplandırmak üzere genel olarak siyanobakteriyel çeşitlilik hakkında bilgi toplamak üzere iki indikatör gen bölgesi analiz edilmiştir. Bunlardan birisi RNA polimeraz  $\gamma$  altbirimini kodlayan *rpoCI* geninin bir bölgesi ve

fotosentetik pigmentlerle kompleks oluşturan fikosiyenin proteinlerini kodlayan *cpcBA* genlerine ait bir bölge ağustos ayı çevresel DNA'sından amplifiye edilerek rastgele klonlanmış ve dizilenmiştir. Yapılan filogenetik analizler Akgöl suyunda farklı siyanobakteriyel genotiplerin mevcut olduğunu göstermiştir. Filogenetik ağaçlarda bu genotiplerin *Microcystis* spp. gruplarına yakın bir konumda olduklarını ancak belli oranlarda farklılıklara da sahip olduklarını göstermektedir.

Sonuç olarak haziran-ekim aylarında Akgöl yüzeyaltı su tabakasında mutemelen *Microcystis* spp. üyeleri baskın olmak üzere siyanobakteri grupları temsil edilmektedir. Siyanobakterilerin mevcut olduğu aylarda toksigenik *Microcystis* spp. üyeleri de temsil edilmektedir. Toksigenik *Microcystis* spp. üyeleri genotipik olarak homojendir. Ancak genel siyanobakteriyel indikatör gen bölgelerinin analizleri siyanobakteriyel genotipik çeşitliliğin daha fazla olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada sadece yüzeyaltı su takakası analiz edilmiştir. Akgöl'ün siyanobakteriyel çeşitliliğinin tam olarak tanımlanması için farklı derinlik ve farklı konumlardan örnekler alınarak analiz edilmesi daha kapsayıcı bilgiler sağlayacaktır.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Akgöl gölündeki toksin üreten siyanobakteri komünitesinin mevcudiyeti ve biyoçeşitliliğinin belirlenmesi bu araştırmanın temel amacıdır. Bu amaca ulaşmak için metagenomik bir yaklaşımla deneyler ve gözlemler yapılmıştır. Göl suyunun yüzeyaltı tabakasından 2015 yılının temmuz, ağustos, eylül, ekim ve kasım aylarında ve 2016 yılının ocak, mart, nisan, mayıs ve haziran aylarında su örnekleri alınmıştır. Bu su örnekleri filtrasyon ile süzülerek bakteri hücreleri hasat edilmiştir. Hasat edilen bu hücre kütesinden çevresel DNA izole edilmiştir. Bu çevresel DNA stokları PCR çoğaltım çalışmalarında kalıp DNA olarak kullanılmıştır.

Uygulanacak PCR deney düzeneğinin duyarlılığını yani tarama gücünü belirlemek üzere standart siyanobakteriyel suş *Synechocystis* sp. PCC6803 kültürleri kullanılarak deneyler yapılmıştır. Bilinen sayıda hücre içeren belli bir hacimdeki kültürden DNA izolasyonu yapılmış ve bilinen sayıda genomlar PCR amplifikasyonunda kalıp olarak kullanılmış, amplifikasyonun gerçekleştiği en az genom sayısı belirlenmiştir. Bu deneylerin sonucunda en az 1000 genomik DNA'nın amplicon elde edebilmek için gerekli olduğu belirlenmiştir.

Farklı aylara ait çevresel DNA kalıp olarak kullanılarak amaca göre farklı gen bölgelerinin amplifikasyon deneyleri gerçekleştirildi. Öncelikle siyanobakteriler için evrensel primerler kullanılarak siyanobakteri suşlarının varlığını göstermek üzere 16S rDNA bölgesi amplifiye edildi. Bu deneylerin sonucunda haziran, temmuz, ağustos, eylül ve ekim aylarında taranabilir düzeyde siyanobakteri üyelerinin göl suyunda mevcut olduğu belirlenmiştir. Diğer aylarda bir amplifikasyon görülmemiştir.

Aynı deneyler spesifik primerler kullanılarak *Microcystis* spp. üyelerinin 16S rDNA bölgeleri amplifiye edilmiştir. Bu deneylerin sonucunda siyanobakterilerin mevcut olduğu aylarda *Microcystis* spp. üyelerinin de mevcut olduğu belirlenmiştir. Kullanılan kalıp DNA miktarları ve elde edilen amplicon miktarları karşılaştırıldığında baskın siyanobakteri grubunun *Microcystis* spp. üyeleri olduğu anlaşılmaktadır.

Mikrosistin gen kümesinin iki üyesi olan *mcyB* ve *mcyD* genlerinin belli bölgeleri için kullanılan spesifik primerlerle yürütülen amplifikasyon çalışmalarında

da *Microcystis* üyelerinin mevcut olduğu aylarda toksin genlerinin de mevcut olduğu görülmüştür. Bu sonuç potansiyel olarak toksin üretebilecek soyların *Microcystis* üyeleri arasında yaygın olarak bulunduğunu göstermektedir. İlave olarak belli başlı siyanobakteriyel toksin üretici diğer grupların toksin genleri için spesifik primerler kullanılarak yürütülen amplifikasyon denemelerinde bir amplikon oluşumu gözlenememiştir. Bu durum en azından uygulanan yöntemin tarama gücü içinde diğer toksin üretici siyanobakterilerin mevcut olmadığı anlaşılmaktadır.

Toksin üreten *Microcystis* üyelerinin genotipik çeşitliliğinin belirlenmesi için ağustos ve eylül aylarında elde edilen PCR ürünleri rastgele klonlanarak belli sayıda klonun nükleotit dizisi belirlenmiş ve filogenetik analizlere tabii tutulmuştur. Filogenetik analizler toksin üreten grupların oldukça yüksek bir akrabalık ilişkisine sahip olduğu ve muhtemelen aynı tür veya türaltı kategoride yer aldıklarını göstermiştir. Bir karşılaştırma yapabilmek amacıyla genel olarak siyanobakteri komünitesi içindeki genotipik çeşitliliğin belirlenmesi için aynı şekilde rastgele klonlama ve dizileme çalışmaları yürütülmüştür. Bunun için ağustos ayı çevresel DNA'sı kalıp olarak kullanılarak *rpoC1* ve *cpcBA* gen bölgelerinden çoğaltılmış fragmentler ayrı ayrı rastgele klonlanmış, belli sayıda klonun nükleotit dizisi belirlenerek filogenetik analizlere tabii tutulmuştur. Bu analizlerin sonucunda siyanobakteriyel genotipik çeşitliliğin *mcyB* genine dayalı genotipik çeşitliliğe göre daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Bu sonuçlar siyanobakterilerin yaz ve erken güz aylarında Akgöl suyunda temsil edildiğini, *Microcystis* spp. üyelerinin komünitenin baskın üyesi olduğu ve daima toksigenik grupların temsil edildiğini göstermektedir. Ayrıca toksigenik *Microcystis* üyelerinin genel siyanobakteri komünite üyelerine göre genotip olarak daha homejen olduğu ve muhtemelen aynı tür veya türaltı kategoriye mensup oldukları anlaşılmaktadır.

Bu araştırmanın sonuçlarını desteklemek ve ilave bilgiler elde etmek için bazı tamamlayıcı çalışmalar yürütülmesi uygun olacaktır. Bu çalışmada uygulanan PCR tarama düzeneğinin duyarlılık sınırı 1000 genomdur. Şüphesiz bu duyarlılık düzeyinin daha aşağılara çekilmesi gerekir. Bunun için alternatif çevresel DNA izolasyon yöntemleri denenebilir, farklı özelliklerde ısı dayanıklı DNA polimerazlar denenebilir, qPCR yöntemleri uygulanabilir ve çevresel DNA gelecek nesil (next-generation) dizleme yöntemleriyle doğrudan dizilenebilir. Komünite içinde toksin

genlerinin ekspresyonunun yapıp yapılmadığı ve hangi şartlar altında yapıldığı RT-qPCR teknikleri uygulanarak gerçekleştirilebilir. Şüphesiz bu toksigenik suşların varlığının ötesinde yılın hangi zamanlarında ve hangi çevresel şartlar altında organizmaların toksin ürettikleri hakkında daha ayrıntılı bilgiler verecektir. Tabiki doğrudan göl suyunda ve hasat edilmiş hücrelerin özütlerinde kromotografik veya immünolojik yöntemlerle siyanotoksinler doğrudan taranabilir.

Bu araştırmanın, Akgöl gölünde toksin üreten siyanobakterilerin kültüre alınmadan veya mikroskopik olarak gözlenmeden çevresel DNA'nın moleküler analizleriyle taranabilir olduğunu göstererek ve göl suyuyla bir şekilde temasta olan zooplanktonlar, balıklar, kuşlar ve evcil hayvanlardan insanlara kadar birçok organizmayı etkileme riskine dikkat çekerek bilimsel birikime ve toplumsal farkındalığa katkı sağlayacağı açıktır.



## KAYNAKLAR

- Al-Tebrineh, J., Pearson, L. A., Yaşar, S. A. and Neilan, B. A. 2012. A multiplex Qpcr targeting hepato-and neurotoxic cyanobacteria of global significance. *Harmful Algae*, 15, 19-25. doi: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.11.001>
- Anonim (2016) -4: Çevre ve Şehircilik Bakanlığı-Samsun 2011. [http://www.csb.gov.tr/db/ced/editordosya/samsun\\_icdr2011.pdf](http://www.csb.gov.tr/db/ced/editordosya/samsun_icdr2011.pdf). (Erişim tarihi: 03.10.2016)
- Anonymous (2015) -1: <http://www-cyanosite.bio.purdie.edu/cyanotox/toxiccyanos> (Erişim tarihi: 05.10.2015)
- Anonymous (2015) -2: [http://www.uvm.edu/wbowden/Teaching/Risk Assesment/ Resources/Public/Projects\\_docs2010/Cyanotoxins](http://www.uvm.edu/wbowden/Teaching/Risk%20Assesment/Resources/Public/Projects_docs2010/Cyanotoxins) (Erişim tarihi: 23.09.2015)
- Anonymous (2015)-3: <http://water.epa.gov/scitech/drinkingwater/dws/ccl>. (cyanobacteria and Cyanotoxins: information for drinking water systems/EPA-810F11001/2012) (Erişim tarihi: 03.08.2015)
- Anonymous (2016) -5: pGEM T and pGEM T Easy Vector Systems. <http://www.promega.com/protocols/> (Erişim tarihi: 15.03.2016)
- Anonymous (2017) -6: <http://plaza.snu.ac.kr/jchun/phydit> (Erişim tarihi: 21.03.2017)
- Anonymous (2017) -7: Cyanobase-Kazusa Genome Resources <http://genome.microbedb.jp/cyanobase#resources> (Erişim tarihi: 10.05.2017)
- Bittencourt-Oliveira, M. D. C., Piccin-Santos, V., Kujbida, P. and Moura, A. D. N. 2011. Cylindrospermopsin in Water Supply Reservoirs in Brazil Determined by Immuno chemical and Molecular Methods. *Journal of Water Resource and Protection*, 3:6, 349–355. doi:10.4236/jwarp.2011.36044
- Boopathi, T. and Ki, J. S. 2014. Impact of environmental factors on the regulation of cyanotoxin production. *Toxins*, 6:7, 1951-1978. doi:10.3390/toxins6071951
- Byth, S. 1980. Palm Island mystery disease. *Medical Journal of Australia*, 2:1, 40-42.
- Cantrell, C. L., Schrader, K. K., Mamonov, L. K., Sitpaeva, G. T., Kustova, T. S., Dunbar, C. and Wedge, D. E. (2005). Isolation and identification of antifungal and antialgal alkaloids from *Haplophyllum sieversii*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53:20, 7741-7748. doi: 10.1021/jf051478v
- Caroppo, C. 2015. Ecology and biodiversity of picoplanktonic cyanobacteria in coastal and brackish environments. *Biodiversity and Conservation*, 24:4, 949-971. doi:10.1007/s10531-015-0891

- Castenholz, R. W. and Waterbury, J. B. 1989. Group I. Cyanobacteria. Preface. In Holt, J. G. (editors), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 3. Williams and Wilkins, Baltimore: 1710–1727.
- Castenholz, R. W., 2001. General characteristics of cyanobacteria. In Garrity, G. M. (editors), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, New York: 474-478.
- Castiglioni, B., Rizzi, E., Frosini, A., Sivonen, K., Rajaniemi, P., Rantala, A., Mugnai, M. A., Ventura, S., Wilmotte, A. and Boutte, C. 2004. Development of a universal microarray based on the ligation detection reaction and 16S rRNA gene polymorphism to target diversity of cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:12, 7161-7172. doi: 10.1128/AEM.70.12.7161-7172.2004
- Chaurasia, A. 2015. Cyanobacterial biodiversity and associated ecosystem services: introduction to the special issue. *Biodiversity and Conservation*, 24:4, 707-710. doi 10.1007/s10531-015-0908-6
- Cheung, M. Y., Liang, S. and Lee J. 2013. Toxin-producing cyanobacteria in freshwater: A review of the problems, impact on drinking water safety, and efforts for protecting public health. *The Journal of Microbiology*, 51:1, 1-10. doi: 10.1007/s12275-013-2549-3
- Corbel, S., Mougin, C. and Bouaicha, N. 2014. Cyanobacterial toxins: Modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. *Chemosphere*, 96, 1-15. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.07.056
- Dadheech, P. K., Glöckner, G., Casper, P., Kotut, K., Mazzoni, C. J., Mbedi, S. and Krienitz, L. 2013. Cyanobacterial diversity in the hot spring, pelagic and benthic habitats of a tropical soda lake. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology*, 85:2, 389-401. doi: 10.1111/1574-6941.12128
- Davison, M., Hall, E., Zare, R. and Bhaya, D. 2015. Challenges of metagenomics and single-cell genomics approaches for exploring cyanobacterial diversity. *Photosynthesis research*, 126:1, 135-146. doi: 10.1007/s11120-014-0066-9
- Dittmann, E. and Börner, T. 2005. Genetic contributions to the risk assessment of microcystin in the environment. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203:3, 192-200. doi: 10.1016/j.taap.2004.06.008
- Drobac, D., Tokodi, N., Meunovic, J. S., Baltic, V., Stanic, D. and Svircev, Z. 2013. Human exposure to Cyanotoxins and their effects on health. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 64:2, 305-316. doi: 10.2478/10004-1254-64-2013-2320
- Ersanli, E., Gönülol, A., Şehirli, H. and Baytut, Ö. 2006. The phytoplankton of lake Akgöl, Turkey. *Journal of Freshwater Ecology*, 21:3, 523-525. doi:10.1080/02705060.2006.9665030

- Falconer, I. R. and Humpage, A. R. 2001. Preliminary evidence for in vivo tumour initiation by oral administration of extracts of the blue green alga *Cylindrospermopsis raciborskii* containing the toxin cylindrospermopsin. *Environmental Toxicology*, 16:2, 192–195. doi: 10.1002/tox.1024
- Froschio, S. M., Humpage, A. R., Burcham, P. C. and Falconer, I. R. 2003. Cylindrospermopsin induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. *Environmental Toxicology*, 18:4, 243-251. doi: 10.1002/tox.10121
- Garcia-Pichel, F., Belnap, J., Neuer, S. and Schanz, F. 2003. Estimates of global cyanobacterial biomass and its distribution. *Algological Studies*, 109:1, 213-227. doi: 10.1127/1864-1318/2003/0109-0213
- Gehring, M. M. and Wannicke, N. 2014. Climate change and regulation of hepatotoxin production in Cyanobacteria. *Federation of European Microbiological Societies*, 88:1, 1-25. doi: 10.1111/1574-6941.12291
- Giovannoni, S. J., DeLong, E. F., Schmidt, T. M. and Pace, N. R. 1990. Tangential flow filtration and preliminary phylogenetic analysis of marine picoplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, 56:8, 2572-2575.
- Giovannoni, S. J., Turner, S., Olsen, G. J., Barns, J., Lane, D. J. and Pace, N. R. 1988. Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *Journal of Bacteriology*, 170:8, 3584–3592. doi: 10.1128/jb.170.8.3584-3592.1988
- Hastie, C. J., Borthwick, E. B., Morrison, L. F., Codd, G. A. and Cohen, P. T. W. 2005. Inhibition of several protein phosphatases by a non-covalently interacting microcystin and a novel cyanobacterial peptide, nostocyclin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1726:2, 187-193. doi: 10.1016/j.bbagen.2005.06.005
- Hawkins, P. R., Runnegar, M. T. C., Jackson, A. R. B. and Falconer, I. R. 1985. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (Blue-Green Alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Suba Raju isolated from a Domestic Water Supply Reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*, 50:5, 1292-1295.
- Heather, J. M., ve Chain, B. 2016. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107:1, 1-8. doi: 10.1016/j.ygeno.2015.11.003
- Hitzfeld, B. C., Höger, S. F. and Dietrich, D. R. 2000. Cyanobacterial toxins: Removal during drinking water treatment, and human risk assessment. *Environmental Health Perspect*, 108:1, 113-122.
- Humpage, A. R., Fontaine, F., Froschio, S., Burcham, P. and Falconer, I. R. 2005. Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: Role of cytochrome P-450 and oxidative stress. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 68:9, 739-753. doi: 10.1080/15287390590925465

- Iteman, I., Rippka, R., Tandeau de Marsac, N. and Herdman, M. 2000. Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA-23S rRNA spacer of cyanobacteria. *Microbiology*, 146:6, 1275-1286. doi: 10.1099/00221287-146-6-1275
- Jancula, D., Suchomelova, J., Gregor, J., Smutna, M., Marsalek, B. and Taborska, E. 2007. Effects of aqueous extracts from five species of the family Papaveraceae on selected aquatic organisms. *Environmental toxicology*, 22:5, 480-486. doi: 10.1002/tox.20290
- Jia, Y., Wang, Q., Chen, Z., Jiang, W., Zhang, P. and Tian, X. 2010. Inhibition of phytoplankton species by co-culture with a fungus. *Ecological Engineering*, 36:10, 1389-1391. doi: 10.1016/j.ecoleng.2010.06.017
- Kaebnick, M. and Neilan, B. A. 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology*, 35:1, 1-9. doi: 10.1111/j.1574-6941.2001.tb00782.x
- Kaplan, A., Harel, M., Kaplan-Levy, R. N., Hadas, O., Sukenik, A. and Dittmann, E. 2012. The languages spoken in the water body (or the biological role of cyanobacterial toxins). *Frontiers in Microbiology*, 3, 1-11. doi: 10.3389/fmicb.2012.00138.
- Kaushik, R. and Balasubramanian, R. 2013. Methods and approaches used for detection of Cyanotoxins in environmental samples: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43:13, 1349-1383. doi: 10.1080/10643389.2011.644224
- Kellmann, R., Mihali, T. K., Jean, Y. J., Pickford, R., Pomati, F. and Neilan, B. A. 2008. Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a Saxitoxin gene cluster in cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 74:13, 4044-4053. doi: 10.1128/AEM.00353-08
- Kleinteich, J., Wood, S. A., Küpper, F. C., Camacho, A., Quesada, A., Frickey, T. and Dietrich, D. R. 2012. Temperature-related changes in polar cyanobacterial mat diversity and toxin production. *Nature Climate Change*, 2:5, 356-360. doi:10.1038/nclimate1418
- Komárek, J. 2006. Cyanobacterial Taxonomy: Current Problems and Prospects for the Integration of Traditional and Molecular Approaches. *Algae*, 21:4, 349-375.
- Komarek, J., Kaštovský, J., Mareš, J. and Johansen, J. R. 2014. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia* 86:4, 295-335.
- Krishnamurthy, T., Carmichael, W.W., Sarver, E.W. 1986. Toxic peptides from freshwater cyanobacteria (blue-green algae). I. Isolation, purification and characterization of peptides from *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae*. *Toxicon*, 24:9, 865-873. doi: 10.1016/0041-0101(86)90087-5



- Kuiper-Goodman, T., Falconer, I. and Fitzgerald, J. 1999. Human Health Aspects. In Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management; Chorus, I., Bartram, J., Eds.; E and FN Spon Publishers: London, UK.
- Kurmayer, R., Dittmann, E., Fastner, J., Chorus, I. 2002. Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. in Lake Wannsee (Berlin, Germany). *Microbial Ecology*, 43:1, 107-118. doi: 10.1007/s00248-001-0039-3
- Leao, P. N., Vasconcelos, M. T. and Vasconcelos, V. M. 2009. Allelopathy in freshwater cyanobacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 35:4, 271-282. doi: 10.3109/10408410902823705
- Makhalanyane, T. P., Valverde, A., Velazquez, D., Gunnigle, E., van Goethem, M. W., Quesada, A. and Cowan, D. A. 2015. Ecology and biogeochemistry of cyanobacteria in soils, permafrost, aquatic and cryptic polar habitats. *Biodiversity and Conservation*, 24:4, 819-840. doi:10.1007/s10531-015-0902-z.
- Mankiewicz, J., Tarczynska, M., Walter, Z. and Zalewski, M. 2003. Natural Toxins From Cyanobacteria. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 45, 9-20.
- Mbedi, S., Welker, M., Fastner, J., Wiedner, C. 2005. Variability of the microcystin synthetase gene cluster in the genus planktotrix (oscillatoriales, cyanobacteria). *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 245:2, 299-306. doi: 10.1016/j.femsle.2005.03.020
- Meepagala, K. M., Schrader, K. K., Wedge, D. E., & Duke, S. O. 2005. Algicidal and antifungal compounds from the roots of *Ruta graveolens* and synthesis of their analogs. *Phytochemistry*, 66:22, 2689-2695. doi: 10.1016/j.phytochem.2005.09.019
- Metcalf, F. S. and Codd, G. A. 2014. Cyanobacterial toxins (Cyanotoxins) in water. © Foundation for Water Research.
- Mikalsen, B., Boison, G., Skulberg, O. M., Fastner, J., Davies, W., Gabrielsen, T. M., Rudi, K., Jakobsen, K. S. 2003. Natural variation in the microcystin synthetase operon *mcyABC* and impact on microcystin production in *Microcystis* strains. *Journal of Bacteriology*, 185:9, 2774-2785. doi: 10.1128/JB.185.9.2774-2785.2003
- Moffitt, M. C. and Neilan, B. A. 2004. Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:11, 6353-6362. doi: 10.1128/AEM.70.11.6353-6362.2004
- Moffitt, M. C., Blackburn, S. I., Neilan, B. A. 2001. rRNA sequences reflect the ecophysiology and define the toxic cyanobacteria of the genus *Nodularia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51:2, 505-512. doi: 10.1099/00207713-51-2-505

- Nabout, J. C., da Silva Rocha, B., Carneiro, F. M. and Sant'Anna, C. L. 2013. How many species of Cyanobacteria are there? Using a discovery curve to predict the species number. *Biodiversity and conservation*, 22:12, 2907-2918. doi: 10.1007/s10531-013-0561-x
- Nandini, V. 2015. Plant derived compounds for the control of toxic cyanobacterial blooms: a comprehensive mini-review. *International Journal of Research*, 2:5, 421-435.
- Neilan, B. A. 2002. The Molecular Evolution and DNA Profiling of Toxic Cyanobacteria. *Current Issues in Molecular Biology*, 4, 1-11.
- Neilan, B. A., Pearson, L. A., Muenchhoff, J., Moffitt, M. C. and Dittmann, E. 2013. Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environmental Microbiology*, 15:5, 1239–1253. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02729.x
- Ngwa, F. F., Madramootoo, C. A. and Jabaji, S. 2014. Development and application of a multiplex qPCR technique to detect multiple microcystin-production cyanobacterial genera in a Canadian freshwater lake. *Journal of Applied Phycology*, 26:4, 1675-1687. doi: 10.1007/s10811-013-0199-9
- Niedermeyer, T. H., Schmieder, P. and Kurmayer, R. 2014. Isolation of microcystins from the cyanobacterium *Planktothrix rubescens* strain No80. *Natural products and bioprospecting*, 4:1, 37-45. doi: 10.1007/s13659-013-0001-3
- Nonneman, D. and Zimba, P. V. 2002. A-PCR based test to assess the potential for microcystin occurrence in channel catfish production ponds. *Journal of Phycology*, 38:1, 230-233. doi: 10.1046/j.1529-8817.2002.01138.x
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F. and Muyzer, G. 1997. PCR primers to amplify 16S Rna genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:8, 3327-3332.
- Oren, A. 2015. Cyanobacteria in hypersaline environments: biodiversity and physiological properties. *Biodiversity and Conservation*, 24:4, 781-798. doi: 10.1007/s10531-015-0882
- Oren, A., 2004. A proposal for further integration of the cyanobacteria under the Bacteriological Code. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54:5, 1895-1902. doi: 10.1099/ijs.0.03008-0
- Paerl, H. W. and Otten, T. G. 2013. Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls. *Microbial ecology*, 65:4, 995-1010. doi: 10.1007/s00248-012-0159-y
- Palinska, K. A. and Surosz, W. 2014. Taxonomy of cyanobacteria: a contribution to consensus approach. *Hydrobiologia*, 740:1, 1-11. doi: 10.1007/s10750-014-1971-9

- Pearson, L. A. and Neilan, B. A. 2008. The molecular genetics of Cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk. *Current Opinion in Biotechnology*, 19:3, 281-288. doi: 10.1016/j.copbio.2008.03.002
- Pearson, L., Mihali, T., Moffitt, M., Kellmann, R. and Neilan, B. 2010. On the chemistry, toxicology and genetics on the Cyanobacterial toxins, Microcystin, nodularin, Saxitoxin and silindrospermopsin. *Marine Drugs*, 8:5, 1650-1680. doi: 10.3390/md8051650
- Peuthert, A., Chakrabarti, S. and Pflugmacher, S. 2007. Uptake of Microcystin-LR and-LF (cyanobacterial Toxins) in seedlings of several important agricultural plant species and the correlation with cellular damage (lipid peroxidation). *Environmental Toxicology*, 22:4, 436-442. doi: 10.1002/tox.20266
- Pope, P. B. and Patel, B. K. 2008. Metagenomic analysis of a freshwater toxic cyanobacteria bloom. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology*, 64:1, 9-27. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00448.x
- Purcaro, R., Schrader, K. K., Burandt, C., DellaGreca, M. and Meepagala, K. M. 2009. Algicide constituents from *Swinglea glutinosa*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57:22, 10632-10635. doi: 10.1021/jf902561c
- Purdie, E. L., Metcalf, J. S., Kashmiri, S. and Codd, G. A. 2009. Toxicity of the cyanobacterial neurotoxin  $\beta$ -N-Methylamino-L-alanine to three aquatic animal species. *Amytrophic Lateral Sclerosis*, 10:2, 67-70. doi: 10.3109/17482960903273551
- Rantala, A., Fewer, D. P., Hisbergues, M., Rouhiainen, L., Vaitomaa, J., Börner, T. and Sivonen, K. 2004. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101:2, 568-573. doi: 10.1073
- Rantala-Ylinen, A., Kana, S., Wang, H., Rouhianinen, L., Wahlsten, M., Rizzi, E., Berg, K., Gugger, M. and Sivonen, K. 2011. Anatoxin-a synthetase gene cluster of the cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain 37 and Molecular Methods to detect potential producers. *Applied and Environmental Microbiology*, 77:20, 7271-7278. doi: 10.1128/AEM.06022-11
- Rinta-Kanto, J. M., Ouellette, A. J. A., Boyer, G. L., Twiss, M. R., Bridgeman, T. B. and Wilhelm, S. W. 2005. Quantification of toxic *Microcystis* spp. During the 2003 and 2004 blooms in western lake erie using quantitative real-time pcr. *Environmental Science & Technology*, 39:11, 4198-4205. doi: 10.1021/es048249u
- Rinta-Kanto, J. M., Oullete, A. J. A., Boyer, G. L., Twiss, M. R., Bridgeman, T. B. and Wilhelm, S. W. 2005. Quantification of toxic *Microcystis* spp. During the 2003 and 2004 blooms in western lake erie using qantitative real time PCR. *Environmental Science & Technology*, 39:11, 4198-4205. doi: 10.1021/es048249u
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. and Stanier, R. Y. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of

- cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, 111, 1-161. doi: 10.1099/00221287-111-1-1
- Rogers, E, Zehr, R., Gage, M., Humpage, A. R., Falconer, I. R., Marr, M. and Chernoff, N. 2007. The cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin, induces fetal toxicity in the mouse after exposure late in gestation. *Toxicol*, 49:6, 855–864. doi: 10.1016/j.toxicol.2006.12.009
- Rohrlack, T., Christoffersen, K., Kaebernick, M. and Neilan, B. A. 2004. Cyanobacterial protease inhibitor microviridin j causes a lethal molting disruption in *Daphnia pulex*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:8, 5047-5050. doi: 10.1128/AEM.70.8.5047-5050.2004
- Romo, S., Fernandez, F., Ouahid, Y. and Baron-Sola, A. 2012. Assessment of microcystins in lake water and fish (*Mugilidae*, *Liza* sp.) in the largest Spanish coastal lake. *Environmental monitoring and assessment*, 184:2, 939-949. doi: 10.1007/s10661-011-2011-0
- Rouhiainen, L., Vakkilainen, T., Siemer, B. L., Buikema, W., Haselkorn, R. and Sivonen, K. 2004. Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:2, 686-692. doi: 10.1128/AEM.70.2.686–692.2004
- Runnegar, M. T., Kong, S. M., Zhong, Y. Z. and Lu, S. C. 1995. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*, 49:2, 219-225. doi: 10.1016/S0006-2952(94)00466-8
- Runnegar, M. T., Xie, C., Snider, B. B., Wallace, G. A., Weinreb, S. M. and Kuhlenkamp, J. 2002. In vitro hepatotoxicity of the cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin and related synthetic analogues. *Toxicological Sciences*, 67:1, 81-87. doi: 10.1093/toxsci/67.1.81
- Sabree, Z. L., Randon, M. R. and Handelsman, J. 2009. Metagenomics. *Elsevier*. 622-632.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. Molecular cloning a laboratory manual. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schembri, M., Neilan, B. and Saint, C. 2001. Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environmental Toxicology*, 16:5, 413-421. doi: 10.1002/tox.1051
- Sevilla, E., Martin-Luna, B., Vela, L., Bes, M. T., Fillat, M. F. and Peleato, M. L. 2008. Iron availability affects mcyD expression and Microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Environmental Microbiology*, 10:10, 2476-2483. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01663.x
- Sinha, R., Pearson, L. A., Davis, T. W., Muenchhoff, J., Pratama, R., Jex, A., Burford, M. and Neilan, B. A. 2014. Comparative genomics of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains with differential toxicities. *BioMed Central genomics*, 15:1, 83. doi: 10.1186/1471-2164-15-83

- Sivonen, K. and Jones, G. 1999. Cyanobacterial Toxins. In Toxic Cyanobacteria in Water; Chorus, I., Bartram, J., Editors. WHO E and FN Spon Publishers: London, UK.
- Stanier, R. Y., Siström, W. R., Hansen, T. A., Whitton, B. A., Castenholz, R. W., Pfennig, N., Gorlenko, V. N., Kondratieva, E. N., Eimhjellen, K. E., Whittenbury R., Gherna, R. L. and Trüper, H. G. 1978. Proposal to place the of the cyanobacteria (blue-green algae) under the rules of the International Code of Nomenclature of Bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 28:2, 335–336. doi: 10.1099/00207713-28-2-335
- Steffen, M. M., Li, Z., Effler, T. C., Hauser, L. J., Boyer, G. L. and Wilhelm, S. W. 2012. Comparative Metagenomics of Toxic Freshwater Cyanobacteria Bloom Communities on Two Continents. *Plos One*, 7:8, 1-9. doi:10.1371/Journal.pone.0044002
- Stüken, A. and Jakobsen, K. S. 2010. The cylindrospermopsin gene cluster of *Aphanizomenon* sp. strain 10E6: organization and recombination. *Microbiology*, 156:8, 2438-2451. doi: 10.1099/mic.0.036988-0
- Su, Z., Sheets, M., Ishida, H., Li, F. and Barry, W. H. 2004. Saxitoxin blocks L-Type  $I_{Ca}$ . *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 308:1, 324–329. doi: 10.1124/jpet.103.056564
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30:12, 2725-2729.
- Thajuddin, N. and Subramanian, G. 2005. Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Current Science*, 89:1, 47-57.
- Thomas, T., Gilbert, J. and Meyer, F. 2012. Metagenomics-a guide from sampling to data analysis. *Microbial informatics and experimentation*, 2:1, 3. doi: 10.1186/2042-5783-2-3
- Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., von Dohren, H., Börner, T. and Neilan, B.A. 2000. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chemistry and Biology*, 7:10, 753-764. doi: 10.1016/S1074-5521(00)00021-1
- Tillett, D., Parker, D. L. and Neilan, B. A. 2001. Detection of toxigenicity by a probe for the microcystin synthetase A gene (*mcyA*) of the cyanobacterial genus *Microcystis*: comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (Phycocyanin Intergenic Spacer) phylogenies. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:6, 2810-2818. doi: 10.1128/AEM.67.6.2810-2818.2001
- Vaitomaa, J., Rantala, A., Halinen, K., Rouhiainen, L., Tallberg, P., Møkelke, L. and Sivonen, K. 2003. Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase e copy numbers for *Microcystis* and *Inabaena* in lakes. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:12, 7289-7297. doi: 10.1128/AEM.69.12.7289-7297.2003

- van Apeldoorn, M. E., van Egmond, H. P., Speijers, G. J. and Bakker, G. J. 2007. Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51:1, 7-60. doi: 10.1002/mnfr.200600185
- Vijayakumar, S, and Menakha, M. 2015. Pharmaceutical applications of cyanobacteria-A review. *Journal of Acute Medicine*, 5:1, 15-23. doi: 10.1016/j.jacme.2015.02.004
- Wang, H., Kang, H., Zhang, L., Cheng, S., Liu, H., Liu, H. and Sun, B. 2015. Composition of ethyl acetate extracts from three plant materials (shaddock peel, pomegranate peel, pomegranate seed) and their algicidal activities. *Polish Journal of Environmental Studies*, 24:4, 1803-1807. doi: 10.15244/pjoes/36986
- Wang, J., Salata, J. J. and Bennett, P. B. 2003. Saxitoxin is a gating modifier of HERG K<sup>+</sup> channels. *Journal of General Physiology*, 121:6, 583-598. doi: 10.1085/jgp.200308812
- Wang, M. H., Liu, Y. M., and Li, L. 2013. Algicidal activity of a dibenzofuran-degrader *Rhodococcus* sp. *Journal of microbiology and biotechnology*, 23:2, 260-266.
- Wang, M. H., Peng, P., Liu, Y. M., Jia, R. B. and Li, L. 2013. Algicidal activity of a dibenzofuran-degrader *Rhodococcus* sp. *Journal of microbiology and biotechnology*, 23:2, 260-266.
- Wang, Q., Su, M., Zhu, W., Li, X., Jia, Y., Guo, P., Chen, Z., Jiang, W. and Tian, X. (2010). Growth inhibition of *Microcystis aeruginosa* by white-rot fungus *Lopharia spadicea*. *Water Science and Technology*, 62:2, 317-323. doi: 10.2166/wst.2010.214
- Watanabe, M. F., Oishi, S., Harada, K. I., Matsuura, K., Kawai, H., and Suzuki, M. 1988. Toxins contained in *Microcystis* species of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon*, 26:11, 1017-1025.
- Weiss, J. H., Koh, J. Y., and Choi, D. W. 1989. Neurotoxicity of  $\beta$ -N-methylamino-l-alanine (BMAA) and  $\beta$ -N-oxalylamino-l-alanine (BOAA) on cultured cortical neurons. *Brain research*, 497:1, 64-71. doi: 10.1016/0006-8993(89)90970-0
- Welker, M., and Von Döhren, H. 2006. Cyanobacterial peptides nature's own combinatorial biosynthesis. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, 30:4, 530-563. doi: 10.1111/j.1574-6976.2006.00022.x
- Wiese, M., Dagostino, P. M., Mihali, T. K., Moffitt, M. C. and Neilan, B. A. 2010. Neurotoxic alkaloids: Saxitoxin and its analogs. *Marine Drugs*, 8:7, 2185-2211. doi:10.3390/md8072185
- Xie, L., Xie, P., Guo, L., Li, L., Miyabara, Y. and Park, H. D. 2005. Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish at different trophic levels from the eutrophic Lake Chaohu, China. *Environmental toxicology*, 20:3, 293-300. doi: 10.1002/tox.20120

Yağcı, M. A. 2010. G6llerde 6trofikasyon, kontrol6 ve planktonik g6sterge t6rleri. *Yunus Araştırma B6lteni*, 1, 11-14.

Zhang, C., Yi, Y. L., Hao, K., Liu, G. L. and Wang, G. X. 2013. Algicidal activity of *Salvia miltiorrhiza* Bung on *Microcystis aeruginosa*-Towards identification of algicidal substance and determination of inhibition mechanism. *Chemosphere*, 93:6, 997-1004. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.05.068





## ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı :Yasemin VARLI

Doğum Yeri :Samsun

Doğum Tarihi :01.08.1992

Yabancı Dili :İngilizce

### Eğitim Durumu

Lise :Samsun Namık Kemal Lisesi (2010)

Lisans :T.C. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi  
Biyoloji Bölümü (2014)

Pedagojik Formasyon Sertifikası :T.C. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Eğitim  
Fakültesi (2016)

Yüksek Lisans :Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji  
Anabilim Dalı (Eylül 2014-Haziran 2017)

Ödül :T.C. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi  
Biyoloji Bölümü Onur Belgesi