



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



DOKTORA TEZİ

**SİYANOBAKTERİLERDE ÇEVRESEL FAKTÖRLERİN
TOKSİN ÜRETİMİNDE ROL OYNAYAN GENLER
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dilek SEVER KAYA

Su Ürünleri Temel Bilimleri Anabilim Dalı

İçsular Biyolojisi Programı

Danışman

Doç. Dr. Reyhan AKÇAALAN ALBAY

Eylül, 2014

İSTANBUL

Bu çalışma 29/09/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Su Ürünleri Temel Bilimleri Anabilim Dalı İçsular Biyolojisi programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:



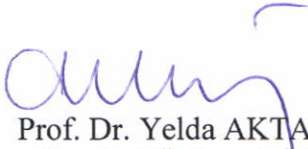
Doç. Dr. Reyhan AKÇAALAN ALBAY (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi



Prof. Dr. Oya OKAY
İstanbul Teknik Üniversitesi
Gemi İnşaatı ve Deniz Bilimleri
Fakültesi



Doç. Dr. Duran ÜSTEK
İstanbul Üniversitesi
DETAE



Prof. Dr. Yelda AKTAN
İstanbul Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi



Doç. Dr. Fatma ÇEVİK
Çukurova Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliđinin 22543 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Doktora tezimin oluşum sürecinden başlayarak değerli bilgilerini benimle paylaşan, fikirleriyle bana yol gösteren danışmanım Sayın Doç. Dr. Reyhan AKÇAALAN ALBAY'a,

Tezim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, laboratuvar çalışmalarında bana her türlü imkanı sağlayan, desteğini her zaman yanımda hissettiğim, Sayın Doç. Dr. Duran ÜSTEK'e,

Laboratuvar çalışmalarında bilgi ve tecrübesiyle sürekli yanımda olan, Sayın Doç. Dr. Sema Sırma Ekmekçi ve Doç. Dr. Neslihan ABACI'ya ,

Tez çalışmamda beni yalnız bırakmayan, bilgisi ve emeğiyle yanımda olan arkadaşım, Arş. Gör. Emre TURGAY'a,

Tez çalışmalarımın çeşitli aşamalarında değerli katkılarıyla bana yardımcı olan arkadaşlarım Msc. Latife KÖKER, Dr. Ferda PAÇAL, Dr. Aris ÇAKİRİS, Dr. M. Onur ELBAŞI, Dr. Cenk GÜREVİN, Mühendis Ayça OĞUZ, Mühendis İzzet Cem YILDIZ, Biyolog Zuhal TUNÇ ve Laborant Cansu DEMİRTAŞ'a,

Tez çalışmamda burs desteği sağlayan TÜBİTAK 2211 Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı'na,

Tezimin hazırlanmasında emeği geçen, çalışmalarım süresince desteğini hep yanımda hissettiğim, sabır ve ilgisini benden esirgemeyen sevgili eşim Hasan KAYA'ya,

Tüm yaşamım boyunca maddi ve manevi destekleriyle beni hiç yalnız bırakmayan, karşılaştığım her türlü güçlüğü aşmamda yardımcı olan sevgili anneme, babama ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eylül, 2014

Dilek SEVER KAYA

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	viii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET.....	xii
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	5
2.1. SU KİRLİLİĞİ VE ÖTROFİKASYON	5
2.2. SİYANOBAKTERİLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ	10
2.3. <i>MICROCYSTIS</i> TÜRLERİNİN EKOLOJİSİ	12
2.4. SİYANOBAKTERİ SEKONDER METABOLİTLERİ.....	14
2.5. MICROCYSTİNİN YAPISI VE CANLILAR ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ.....	19
2.6. MICROCYSTİN BİYOSENTEZİNİN ORGANİZASYONU	29
2.7. ÇEVRESEL STRES FAKTÖRLERİNİN MICROCYSTİN ÜRETİMİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ	34
2.7.1. Demir Stresinin Microcystin Üretimi Üzerine Etkileri.....	36
2.7.2. Işık Stresinin Microcystin Üretimi Üzerine Etkileri	39
3. MALZEME VE YÖNTEM	41
3.1. <i>MICROCYSTIS</i> SPP.'NİN İZOLASYONU	41
3.2. BG-11 KÜLTÜR ORTAMI	43
3.3. GENOMİK DNA İZOLASYONU	43
3.4. DNA ÖRNEKLERİNİN KALİTE VE MİKTAR TAYİNİ.....	44
3.5. DNA ÖRNEKLERİNİN ELEKTROFOREZİ VE GÖRÜNTÜLENMESİ	44
3.6. UZUN ARALIKLI PCR (L-PCR).....	44
3.7. PCR (POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU).....	46
3.8. PCR ÜRÜNLERİNİN ELEKTROFOREZİ VE GÖRÜNTÜLENMESİ.....	47
3.9. DİZİ ANALİZİ	47

3.10. DENEY DÜZENEKLERİ	48
3.11. DENEY DÜZENEKLERİ İÇİN KULLANILAN KÜLTÜR ORTAMLARI.....	50
3.12. DEMİR İÇERMEYEN BG-11 KÜLTÜR ORTAMI HAZIRLIĞI	50
3.12.1. Temizlik	50
3.12.2. EDTA Konsantrasyonu	51
3.12.3. Tindalizasyon	51
3.12.4. Hücre Dışı Demirin Uzaklaştırılması.....	52
3.13. HÜCRE İÇİ VE HÜCRE DIŞI DEMİR KONSANTRASYONUNUN TAYİNİ.....	52
3.13.1. ICP-MS (İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometrisi)	52
3.14. HÜCRE SAYIMI.....	53
3.15. HÜCRE YOĞUNLUĞU ÖLÇÜMÜ	53
3.16. KLOROFİL-A TAYİNİ	53
3.17. TOTAL RNA İZOLASYONU	54
3.18. RNA ÖRNEKLERİNİN KALİTE VE MİKTAR TAYİNİ.....	54
3.18.1. RNA Örneklerinin Spektrofotometrik Yöntemle Kalite ve Miktar tayini ...	54
3.18.2. RNA Örneklerinin Florometrik Yöntemle Miktar tayini.....	55
3.19. RNA ÖRNEKLERİNİN ELEKTROFOREZİ VE GÖRÜNTÜLENMESİ.....	55
3.20. CDNA (KOMPLEMENTER DNA) SENTEZİ.....	55
3.21. GERÇEK ZAMANLI PCR (REAL-TİME PCR).....	56
3.21.1. Standart Eğrinin Hazırlanması	58
3.21.2. SYBR Green I Boyası	59
3.21.3. Erime Eğrisi (Melting Curve) Analizi	59
3.22. İSTATİSTİK ANALİZ	60
4. BULGULAR	61
4.1. GENOMİK DNA İZOLASYON SONUÇLARI	61
4.2. <i>MICROCYTIS</i> SPP. 'NİN PCR YÖNTEMİYLE TANIMLANMASI.....	62
4.3. <i>MICROCYSTIS AERUGINOSA</i> SUŞLARININ TOKSİK ÖZELLİĞİNİN BELİRLENMESİ.....	66
4.4. ICP-MS SONUÇLARI	67
4.5. HÜCRE SAYIMI SONUÇLARI.....	67
4.6. <i>MICROCYSTIS</i> SUŞLARININ GELİŞİMLERİNİN İZLENMESİ	68
4.6.1. 16:8 Aydınlık/Karanlık Şartlarda <i>Microcystis</i> Hücrelerinin Gelişimi	68
4.6.2. 24 Saat Aydınlık Koşulda <i>Microcystis</i> Hücrelerinin Gelişimi	73
4.7. TOTAL RNA İZOLASYON SONUÇLARI	79

4.8. GERÇEK ZAMANLI PCR SONUÇLARI	81
4.9. GEN ANLATIM SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ	82
4.9.1. 16:8 Aydınlik/Karanlık Koşuldaki Örneklerin <i>mcyB</i> Gen Ekspresyonları....	82
4.9.2. 24 Saat Aydınlik Koşuldaki Örneklerin <i>mcyB</i> Gen Ekspresyonları	84
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	87
KAYNAKLAR	98
ÖZGEÇMİŞ.....	114

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Ötrofikasyona neden olan çeşitli nutrient kaynakları ve aşırı algal artışın etkileri.	9
Şekil 2.2: <i>Microcystis</i> suşlarının ve <i>Microcystis</i> ile ilişkili organizmaların neighbour-joining (komşu birleştirme) ağacı.	13
Şekil 2.3: Siyanobakteri sekonder metabolitleri.....	15
Şekil 2.4: Lineer tripeptid ACV'nin [Δ -(L- α -aminoadipil)-L-sisteinil-D-valin] sentez mekanizması.	16
Şekil 2.5: Siyanotoksinlerin sınıflandırılması.	17
Şekil 2.6: Microcystinin genel yapısı.	20
Şekil 2.7: Microcystin-LR'nin yapısı ve konfigürasyonu.	21
Şekil 2.8: Microcystinin hayvan hücreleri üzerindeki toksik etkisi.....	22
Şekil 2.9: Besin zincirindeki siyanotoksinlerin biyomagnifikasyonu ve biyodilüsyonu.....	25
Şekil 2.10: Microcystin üretimini etkileyen genetik, hücre ve populasyon seviyesindeki faktörlerin özeti.....	30
Şekil 2.11: <i>Mcy</i> gen kümesinin organizasyonu.	31
Şekil 2.12: Microcystin sentetaz bileşenlerinin rolü ve fonksiyonel analizleri.	32
Şekil 2.13: Microcystin-LR'ın biyosentetik modeli ve <i>mcyA</i> , <i>B</i> , <i>C</i> , <i>E</i> 'nin domeyn yapıları.....	33
Şekil 2.14: Siyanobakteri hücrelerinin çevresel strese verdikleri yanıtın genel şeması.	35
Şekil 3.1: <i>Microcystis</i> spp.'nin izolasyon sonucu konulduğu kuyucuklar.....	41
Şekil 3.2: Büyük hacimli erlenlere aktarılan <i>Microcystis</i> spp. suşları.....	42
Şekil 3.3: Tez çalışmasında kullanılan <i>Microcystis</i> spp. suşu.	42
Şekil 3.4: Işık ve demirin değişken olarak kullanıldığı seriler ve örnek numaraları.	48
Şekil 3.5: Demirsiz kültür ortamlarında kullanılan EDTA konsantrasyonları.	51
Şekil 3.6: Standart olarak kullanılan <i>RpoC1</i> genine ait standart eğri ve amplifikasyon eğrileri.....	58
Şekil 3.7: <i>RpoC1</i> genine ait erime eğrisi grafiği.	59

Şekil 3.8: <i>mcyB</i> genine ait erime eğrisi grafiği.....	60
Şekil 4.1: <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806 suşuna ait genomik DNA grafik görüntüsü.....	61
Şekil 4.2: <i>Microcystis aeruginosa</i> IFCC 150 suşuna ait genomik DNA grafik görüntüsü.	61
Şekil 4.3: <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 ve IFCC 150 suşlarına ait genomik DNA'nın agaroz jel görüntüsü.	62
Şekil 4.4: <i>Microcystis</i> spp. suşundan izole edilen 16S rRNA geninin agaroz jel görüntüsü.....	63
Şekil 4.5: <i>Microcystis</i> spp. suşunun BLAST analizi sonuçları.....	64
Şekil 4.6: <i>Microcystis</i> spp. suşu, <i>Microcystis aeruginosa</i> SAG 17.85 suşu ve <i>Microcystis aeruginosa</i> VN311 suşunun çoklu dizi hizalaması sonuçları.....	65
Şekil 4.7: <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806'dan izole edilen <i>mcyB</i> geninin agaroz jel görüntüsü.	66
Şekil 4.8: <i>mcyB</i> genine ait PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri.	66
Şekil 4.9: 1. serideki <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 suşunun kontrol, Fe ⁺ ve Fe ⁻ örneklerinin kültür ortamlarındaki görüntüleri.....	68
Şekil 4.10: 1. serideki <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 suşunun kontrol, Fe ⁺ ve Fe ⁻ örneklerinin hücre yoğunluklarının zamana bağlı değişimi.	69
Şekil 4.11: 1. serideki <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 suşunun kontrol, Fe ⁺ ve Fe ⁻ örneklerinin klorofil- <i>a</i> sonuçlarının zamana bağlı değişimi.	70
Şekil 4.12: 1. serideki <i>M. aeruginosa</i> IFCC 150 suşunun kontrol, Fe ⁺ ve Fe ⁻ örneklerinin kültür ortamlarındaki görüntüleri.....	71
Şekil 4.13: 1. serideki <i>M. aeruginosa</i> IFCC 150 suşunun kontrol, Fe ⁺ ve Fe ⁻ örneklerinin hücre yoğunluklarının zamana bağlı değişimi.	72
Şekil 4.14: 1. serideki <i>M. aeruginosa</i> IFCC 150 suşunun kontrol, Fe ⁺ ve Fe ⁻ örneklerinin klorofil- <i>a</i> sonuçlarının zamana bağlı değişimi.	73
Şekil 4.15: 2. serideki <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 suşunun kontrol, Fe ⁺ ve Fe ⁻ örneklerinin kültür ortamlarındaki görüntüleri.....	74
Şekil 4.16: 2. serideki <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 suşunun kontrol, Fe ⁺ ve Fe ⁻ örneklerinin hücre yoğunluklarının zamana bağlı değişimi.	75
Şekil 4.17: 2. serideki <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 suşunun kontrol, Fe ⁺ ve Fe ⁻ örneklerinin klorofil- <i>a</i> sonuçlarının zamana bağlı değişimi.	76
Şekil 4.18: 2. serideki <i>M. aeruginosa</i> IFCC 150 suşunun kontrol, Fe ⁺ ve Fe ⁻ örneklerinin kültür ortamlarındaki görüntüleri.....	77
Şekil 4.19: 2. serideki <i>M. aeruginosa</i> IFCC 150 suşunun kontrol, Fe ⁺ ve Fe ⁻ örneklerinin hücre yoğunluklarının zamana bağlı değişimi.	78
Şekil 4.20: 2. serideki <i>M. aeruginosa</i> IFCC 150 suşunun kontrol, Fe ⁺ ve Fe ⁻ örneklerinin klorofil- <i>a</i> sonuçlarının zamana bağlı değişimi.	79

Şekil 4.21: <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 suşundan elde edilen RNA'nın grafik görüntüsü.	80
Şekil 4.22: <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 suşuna ait total RNA'nın agaroz jel görüntüsü.....	80
Şekil 4.23: <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 suşuna ait RpoC1 ve mcyB genlerinin gerçek zamanlı PCR ürünleri	81
Şekil 4.24: RpoC1 ve mcyB genlerinin ekspresyon dereceleri.....	82
Şekil 4.25: 1. serideki <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 suşunun kontrol, Fe ⁺ ve Fe – örneklerinin mcyB geni ekspresyon değerlerinin zamana bağlı değişimi.	83
Şekil 4.26: 1. serideki <i>M. aeruginosa</i> IFCC 150 suşunun kontrol, Fe ⁺ ve Fe – örneklerinin mcyB geni ekspresyon değerlerinin zamana bağlı değişimi.	84
Şekil 4.27: 2. serideki <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 suşunun kontrol, Fe ⁺ ve Fe – örneklerinin mcyB geni ekspresyon değerlerinin zamana bağlı değişimi.	85
Şekil 4.28: 2. serideki <i>M. aeruginosa</i> IFCC 150 suşunun kontrol, Fe ⁺ ve Fe – örneklerinin mcyB geni ekspresyon değerlerinin zamana bağlı değişimi.	86

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: <i>Microcystis</i> spp.'nin taksonomisi..	12
Tablo 2.2: Microcystinlerin isimlendirilmesi.	20
Tablo 2.3: Balıklara uygulanan subletal oral microcystin dozlarının toksik etkileri..	26
Tablo 3.1: Siyanobakteriler için BG-11 kültür ortamı..	43
Tablo 3.2: L-PCR reaksiyonu için kullanılan primer çifti.	45
Tablo 3.3: L-PCR reaksiyonu için kullanılan karışım.	45
Tablo 3.4: <i>mcyB</i> geninin tamamının çoğaltılması için kullanılan PCR programı.	45
Tablo 3.5: PCR reaksiyonları için kullanılan primer çiftleri.	46
Tablo 3.6: PCR reaksiyonları için kullanılan karışım.	46
Tablo 3.7: 16S rRNA geninin 780 bp'lik bölgesinin çoğaltılması için kullanılan PCR programı.	46
Tablo 3.8: <i>mcyB</i> geninin 578 bp'lik bölgesinin çoğaltılması için kullanılan PCR programı.	47
Tablo 3.9: Deney düzeneklerinde kullanılan serilerdeki örneklerin adlandırılması ve özellikleri.	49
Tablo 3.10: cDNA sentezi için RNA ve primer karışımı.	55
Tablo 3.11: cDNA sentezi için kullanılan ana karışım.	56
Tablo 3.12: cDNA sentezi için PCR cihazında gerçekleştirilen inkübasyonlar.	56
Tablo 3.13: RT-PCR reaksiyonu için kullanılan karışım.	57
Tablo 3.14: <i>mcyB</i> genini çoğaltmak için kullanılan primer çifti.	57
Tablo 3.15: <i>RpoC1</i> genini çoğaltmak için kullanılan primer çifti.	57
Tablo 3.16: Real-time PCR koşulları.	58
Tablo 4.1: PCC 7806 ve IFCC 150 suşlarının nükleik asit konsantrasyon değerleri.	62
Tablo 4.2: Stok kültür ortamlarının ve stok hücre içeriklerinin demir konsantrasyonları.	67

Tablo 4.3: Stok kültür ortamlarından deney düzeneklerindeki örneklere eklenen kültür ortamı miktarları.....	67
Tablo 4.4: 1. serideki <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 suşunun kontrol, Fe ⁺ ve Fe – örneklerinin hücre yoğunluğu sonuçlarının <i>t</i> -test p değerleri	69
Tablo 4.5: 1. serideki <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 suşunun kontrol, Fe ⁺ ve Fe – örneklerinin klorofil- <i>a</i> sonuçlarının <i>t</i> -test p değerleri	70
Tablo 4.6: 1. serideki <i>M. aeruginosa</i> IFCC 150 suşunun kontrol, Fe ⁺ ve Fe – örneklerinin hücre yoğunluğu sonuçlarının <i>t</i> -test p değerleri.	72
Tablo 4.7: 1. serideki <i>M. aeruginosa</i> IFCC 150 suşunun kontrol, Fe ⁺ ve Fe – örneklerinin klorofil- <i>a</i> sonuçlarının <i>t</i> -test p değerleri.	73
Tablo 4.8: <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 suşunun kontrol, Fe ⁺ ve Fe – örneklerinin hücre yoğunluğu sonuçlarının <i>t</i> -test p değerleri	75
Tablo 4.9: 2. serideki <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 suşunun kontrol, Fe ⁺ ve Fe – örneklerinin klorofil- <i>a</i> sonuçlarının <i>t</i> -test p değerleri	76
Tablo 4.10: 2. serideki <i>M. aeruginosa</i> IFCC 150 suşunun kontrol, Fe ⁺ ve Fe – örneklerinin hücre yoğunluğu sonuçlarının <i>t</i> -test p değerleri	78
Tablo 4.11: 2. serideki <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 suşunun kontrol, Fe ⁺ ve Fe – örneklerinin klorofil- <i>a</i> sonuçlarının <i>t</i> -test p değerleri	79
Tablo 4.12: 1. Serideki <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806 suşuna ait örneklerin 16. gün total RNA miktarları	81
Tablo 4.13: 1. serideki <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 suşunun kontrol, Fe ⁺ ve Fe – örneklerinin mcyB geni ekspresyon sonuçlarının <i>t</i> -test p değerleri	83
Tablo 4.14: 1. serideki <i>M. aeruginosa</i> IFCC 150 suşunun kontrol, Fe ⁺ ve Fe – örneklerinin mcyB geni ekspresyon sonuçlarının <i>t</i> -test p değerleri	84
Tablo 4.15: 2. serideki <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 suşunun kontrol, Fe ⁺ ve Fe – örneklerinin mcyB geni ekspresyon sonuçlarının <i>t</i> -test p değerleri	85
Tablo 4.16: 2. serideki <i>M. aeruginosa</i> IFCC 150 suşunun kontrol, Fe ⁺ ve Fe – örneklerinin mcyB geni ekspresyon sonuçlarının <i>t</i> -test p değerleri	86

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler Açıklama

β	: Beta
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
Da	: Dalton
Fe	: Demir
g	: Gram
kDa	: Kilodalton
kb	: Kilobaz
λ	: Lambda
l	: Litre
lx	: Lüks
μ	: Mikron
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
M	: Molar
mA	: Miliamper
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
m^3	: Metreküp
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
S	: Svedberg birimi
Uv	: Ultraviyole

Kısaltmalar Açıklama

ATP	: Adenozin tri fosfat
Bp	: Baz çifti
CoA	: Koenzim a
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
dNTP	: Deoksinükleosid trifosfat
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetate
Fur	: Ferrik uptake regülatör
ELISA	: Enzim linked immünosorbent assay
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
ICP-MS	: İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometrisi
kl-a	: Klorofil-a
LPS	: Lipopolisakkaritler
L-PCR	: Long PCR

mcy	: Microcystin sentetaz gen kümesi
mRNA	: Messenger (elçi) RNA
NRPS	: Non ribozomal peptid sentetaz
Od	: Optik yoğunluk
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PKS	: Poliketid sentaz
PP	: Protein fosfataz
PPI	: Protein fosfataz inhibitör
PS	: Fotosistem
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RNA	: Ribo nükleik asit
rRNA	: Ribozomal RNA
TAE	: Tris-asetat
TE	: Tris-EDTA

ÖZET

DOKTORA TEZİ

SİYANOBAKTERİLERDE ÇEVRESEL FAKTÖRLERİN TOKSİN ÜRETİMİNDE ROL OYNAYAN GENLER ÜZERİNE ETKİLERİ

Dilek SEVER KAYA

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Su Ürünleri Temel Bilimleri Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Reyhan AKÇAALAN ALBAY

Su yaşamın sürekliliği için vazgeçilmez bir kaynaktır. Ancak, evsel ve endüstriyel atıkların yeterince arıtılmadan nehir, göl ve deniz gibi alıcı ortamlara verilmesi ekolojik sistemler için ciddi sorunlar oluşturmaktadır. Microcystinin ölümcül etkilerinden korunabilmek için özellikle içme suları ile yüzme, spor, sulama gibi aktiviteler için kullanılan sulardaki microcystin üreten organizmaların ve üretilen toksin miktarlarının tespiti önemlidir. Günümüzde birçok ülke su kaynaklarındaki siyanobakteriyel hücre yoğunluğunu ve toksin konsantrasyonlarını izlemektedir. Siyanobakteriler üzerinde stres oluşturabilecek çevresel faktörlerin toksin üretimi üzerindeki etkilerinin laboratuvar koşullarında incelenmesi, doğal ortamlarındaki ekolojik ve fizyolojik rollerinin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olmaktadır. Bu çalışmada toksin üretiminde rol alan genlerin stres faktörlerine bağlı ekspresyonlarında oluşabilecek değişikliklerin incelenmesi amacıyla *Microcystis aeruginosa* laboratuvar koşullarında farklı stres faktörlerine (demir yokluğu ve sürekli ışık stresi) maruz bırakılmıştır. Toksin üretiminden sorumlu genlerde farklı ışık ve demir konsantrasyonlarına bağlı olarak meydana gelen değişiklikler Gerçek Zamanlı PCR yöntemiyle tespit edilmiş ve toksin üretiminde bu faktörlerin rolleri ortaya konmuştur. Bu çalışmada elde edilen verilere göre demir yokluğu ve sürekli ışık stresi *mcyB* gen ekspresyonunu dolayısıyla microcystin konsantrasyonunu arttırmakta, ancak *M. aeruginosa* hücrelerinin gelişimini yavaşlatmaktadır.

Eylül, 2014, 127 Sayfa

Anahtar kelimeler: *Microcystis*, microcystin, çevresel stres, demir, ışık

SUMMARY

Ph.D. THESIS

THE EFFECTS OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON THE TOXIN PRODUCING GENES IN CYANOBACTERIA

Dilek SEVER KAYA

İstanbul University

Graduate School of Science and Engineering

Department of Fundamental Science

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Reyhan AKÇAALAN ALBAY

Water is an indispensable source for life. However, if domestic and industrial wastes reach to the water sources like rivers, lakes and seas, without enough treatment serious ecological problems will arise. Eutrophication as a result of deterioration in water quality and formation of algal blooms causes fish deaths and affects public health negatively because of toxicity problems. *Microcystis* is the most common cyanobacteria in fresh waters and is usually toxic. Determination of microcystin producing organisms and toxin amounts in water sources, that are used for drinking, irrigation, swimming and other recreational activities is very important to be protected against deadly effects of microcystin. Nowadays, many countries monitor cyanobacteria cell density and toxin concentrations in their water sources. Determination the effects of environmental factors on toxin production of cyyanobacteria in experimental conditions facilitated to understand their ecological and physiological roles in their habitat. The aim of this study is to determine the changes in the expression of toxin genes depending on stress factors. Light and iron concentration will be used as a stres factors on *Microcystis aeruginosa* in cultured conditions. Real-time PCR was used to detect the changes in the expression of toxin genes according to different light and iron concentration. The result was revealed that iron starvation and continuous light stress enhanced *mcyB* gene expression and as a result microcystin production, however the growth of *M. aeruginosa* cells were affected negatively.

September, 2014, 127 Pages

Keywords: *Microcystis*, microcystin, environmental stress, iron, light.

1. GİRİŞ

Hayatın kaynağı olan su gerekli önlemler alınmadığı takdirde yakın gelecekte dünyanın en önemli sorunlarından biri olacaktır. Tüm doğal kaynaklar gibi su da sınırsız, kullanmakla bitmeyecek bir kaynak değildir. Ülkemiz, su fakiri olmamakla birlikte su kısıtı bulunan ülkeler arasındadır [1]. Evsel, endüstriyel ve tarımsal faaliyetler sonucu besin elementlerinin ve kirleticilerin göl, rezervuar, akarsu, haliç ve sahil gibi ortamlara deşarj edilmesi su kalitesinde önemli kayıplara neden olur [2]. Su kirlenmesi, sucul ekosistemlerin ekolojik dengesinin bozulmasına, giderek sahip oldukları özümleme kapasitesinin azalmasına ve yok olmasına yol açabilir. Kirlenilen nehir, göl ve diğer su kaynaklarının temizlenmesi ancak çok büyük mali harcamalar ile mümkündür [3]. Ülkemizin mevcut iç su potansiyeli dikkate alındığında su kaynaklarımızın korunması ve su kirliliğinin önlenmesi halk sağlığı ve ülke ekonomisi açısından oldukça önemlidir. İçme suyu kaynağı olarak ihtiyaç duyulan bazı göller ve barajlarda kirlenmenin boyutları giderek artmaktadır. Bu nedenle gölleri besleyen akarsu ve nehirlerin su kalitesinin belirlenmesi ve bu ortamlarda yaşayan canlı gruplarının tespit edilmesi büyük önem arz etmektedir [4].

Evsel ve endüstriyel atıkların yeterince arıtılmadan nehir, göl ve deniz gibi alıcı ortamlara verilmesi ekolojik sistem için ciddi sorunlar oluşturmaktadır. Su kalitesinin bozulmasıyla birlikte aşırı siyanobakteri artışı sonucu meydana gelen ötrofikasyon olayı siyanobakteri türlerinin aşırı çoğalmasına bağlı olarak balık ölümlerine ve halk sağlığının olumsuz etkilenmesine neden olmaktadır. Ötrofik tatlı sularda bulunan alg grupları içinde ürettikleri toksinler nedeniyle en önemli grubu oluşturan siyanobakterilerin en çok karşılaşılan cinsi *Microcystis* olup genellikle toksiktir [5,6]. *Microcystis*, microcystin adlı toksinin primer üreticisidir. Hemen her ülkede ötrofik sularda artış göstermesi nedeniyle ilk siyanotoksin ölçümü *Microcystis* üzerinde yapılmış ve tespit edilen siyanotoksine bu türü refere etmesi için “microcystin” adı verilmiştir. Microcystinler peptid sentetaz enzimleri aracılığıyla ribozom dışı yolla sentezlenen halkasal heptapeptid hepatotoksinlerin bir grubu olan sekonder

metabolitlerdir. Microcystin toksisitesinin hedef organı karaciğerdir. Karaciğere oranla daha az etkili olmakla birlikte gastrointestinal sistemde ve böbrekler üzerinde de toksik etkisi bulunmaktadır. Ayrıca içme suyuyla birlikte sürekli düşük miktarlarda microcystine maruz kalan insanların karaciğerinde tümör oluşumunun tetiklenebileceği düşünülmektedir [7, 8, 9].

Siyanobakteriler tarafından üretilen hepatotoksinlerden kaynaklı insan ölümlerini belgeleyen ilk olay 1996 yılında Brezilya'nın Caruaru şehrinde bir diyaliz kliniğinde gerçekleşmiştir. Klinikte diyaliz işlemi için kullanılan suyun alındığı gölette toksik siyanobakteri artışı olduğu ve su klorlama işlemine tabi tutulduğu için toksik siyanobakterilerin lizisi nedeniyle toksinlerin hücre dışına salındığı anlaşılmıştır. Sonuçta, 100 hastada akut karaciğer yetmezliği gelişmiş ve bu hastaların 52'si ölmüştür [10].

Aşırı miktarda çoğalan toksik siyanobakteri türlerinden dolayı ötrofik sularda bir süre sonra normal sınırların çok üzerinde toksin değerleri görülür. Bu olay gerçekleştiğinde kontamine suyla ilişkide olan tüm canlılar toksinlerin olumsuz etkisine maruz kalır. Microcystinin ölümcül etkilerinden korunabilmek için özellikle içme suları ile yüzme, spor, sulama gibi aktiviteler için kullanılan sulardaki microcystin üreten organizmaların ve üretilen toksin miktarlarının tespiti önemlidir. Dünya Sağlık Örgütü içme suyunda bulunabilecek en yüksek microcystin düzeyini, en yaygın microcystin varyantı olan microcystin-LR üzerinden tespit etmiş ve bu miktarı 1µg/l olarak düzenlemiştir [11].

Çevresel etkenler siyanobakterilerin toksin üretimini etkiler. Özellikle ısı, ışık, besin tuzu ve eser elementler gibi etmenlerin üretilen toksin miktarına direkt etkilerinin olduğunu gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. Örneğin demir siyanobakterilerde solunum, azot yıkımı, fotosentez ve DNA sentezi için gereklidir. Bu nedenle demir siyanobakteriler için önemli bir stres faktörüdür [12]. Yapılan bir çalışmada *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 suşunda demir eksikliğinin microcystin-LR üretimini tetiklediği ve *mcyD* geninin transkripsiyonel cevabını etkilediği tespit edilmiştir. Aynı zamanda, demir stresine maruz bırakılan toksik microcystis suşlarının toksik olmayan suşlara göre daha uzun süre canlılıklarını sürdürdükleri görülmüştür [13]. Ayrıca bakteriyel Fur (Ferrik Uptake Regülatör) ailesine ait proteinlerin yüksek demir konsantrasyonlarında

represör protein gibi davranarak DNA üzerindeki özel bir diziye bağlandığı bilinmektedir. *Microcystis* spp.'de de Fur homologları tanımlanmıştır ve bunların *mcy* gen kümesinin promotör bölgesine bağlandığı gösterilmiştir [14]. Bu nedenle diğer faktörlerin yanında Fur ve demir kullanılabilirliği microcystin sentezininin düzenlenmesinde önemli etmenler olarak kabul edilebilir. Yapılan bir çalışmada çevresel faktörlerden ışığın toksisiteyi primer olarak etkilediği, sıcaklık ve besin tuzlarının ise toksisite üzerinde daha az etkili oldukları anlaşılmıştır [15]. Başka bir çalışmada ise çeşitli çevresel faktörlerin etkisinde bırakılan *Microcystis aeruginosa* suşunun real-time PCR kullanılarak *mcyB* gen ekspresyonuna bakılmış ve toksin biyosentezini kontrol eden ana faktörün optimum sıcaklık olduğu tespit edilmiştir [16]. Literatürde çevresel stres faktörleri üzerine yapılan birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalar genellikle birbirlerini desteklemekle birlikte zaman zaman da farklı sonuçlar ortaya koymaktadır. Bu çalışmalar göstermektedir ki çevresel stres etmenleri organizmanın gelişimiyle birlikte üretilen toksin miktarını ve toksisiteyi doğrudan etkilemektedir. Aynı zamanda sıcaklık gibi toksisite üzerinde birincil etkiye sahip olmayan bir çevresel etmenin dahi popülasyondaki toksik türlerin gelişimleri üzerindeki tesiri nedeniyle toksisiteye dolaylı etkisi bulunmaktadır.

Bir su kaynağında aşırı çoğalan veya daha sonraki dönemlerde aşırı artışa neden olabilecek toksik türlerin belirlenmesi, bu türlerden kaynaklanabilecek tehlikelere karşı önceden önlem alınmasını mümkün kılacaktır. Microcystinin ortaya çıkış mekanizmasını düzenleyen hücre içi organizasyonun genetik düzeyde incelenmesi, toksik *Microcystis* spp. aşırı artışları gerçekleşmeden erken uyarı sistemlerinin oluşturulmasını ve bu duruma özgü etkin ve sürdürülebilir önlem alınmasını kolaylaştıracaktır [17]. Günümüzde birçok ülke su kaynaklarındaki siyanobakteri hücre yoğunluğunu ve toksin konsantrasyonlarını izlemektedir. Bunun için genel olarak HPLC, PPI ve ELISA gibi yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler tespit edilen toksinin hangi siyanobakteri türü tarafından üretildiğini belirleyemez. Çünkü birçok farklı siyanobakteri türü benzer microcystin varyantlarını üretir. Diğer yandan, morfolojiye dayalı mikroskopik analiz ile tür tayini yapılabilmesine karşın, aynı türe ait toksik ve toksik olmayan suşlar bir arada bulunabildiğinden bu suşların toksin üretip üretmediklerini morfolojik özelliklerine bağlı olarak tespit etmek mümkün değildir. Diğer bir yöntem olan MALDI-TOF MS ile siyanotoksin varyantları hassas bir şekilde

tespit edilebilir ancak bu yöntem de kantitatif değildir. Diğer yandan, Gerçek zamanlı PCR gibi kantitatif yöntemler toksik biyomasın oluşum sürecini izlememizi ve toksik suşların gelişimini sağlayan etkenlerin açığa çıkarılabilmesini sağlayabilmektedir [18].

Günümüzde birçok ülke siyanotoksinler için rutin izleme programları geliştirmiştir. Bu çalışmada kullanılan Gerçek Zamanlı PCR yöntemiyle hızlı ve güvenilir şekilde kantitatif olarak toksin tespiti gerçekleştirilebilmektedir. Organizmaların bulundukları habitat içinde maruz kaldıkları çevresel stres etmenleri toksin üretimiyle ilişkilidir. Stres faktörlerinin toksin üretimi üzerindeki etkilerinin laboratuvar koşullarında incelenmesi, doğal ortamlardaki ekolojik ve fizyolojik rollerinin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olacaktır. Ayrıca çevresel faktörlerin genetik düzeyde oluşturduğu etkilerin araştırılması, toksin fonksiyonunun daha iyi anlaşılmasını ve toksin yönetim sistemlerinin geliştirilerek aşırı toksik siyanobakteri artışların önlenmesini veya kontrol altına alınmasını sağlayabilecek bilgi birikimine ulaşılmasını kolaylaştıracaktır. Ülkemizde de özellikle insanların kullandığı su kaynaklarının siyanobakteriler ve ürettikleri toksinler açısından izlenmesi hem erken uyarı sistemlerinin oluşturulmasına hem de restorasyon çalışmalarına büyük katkı sağlayacaktır.

Bu çalışmada microcystin üretiminde rol alan genlerin stres faktörlerine bağlı ekspresyonlarında oluşabilecek değişikliklerin incelenmesi amacıyla *Microcystis aeruginosa* suşları kültür ortamına alınarak farklı stres faktörlerine (demir ve ışık) maruz bırakıldı. Deney düzenekleri yardımıyla demirin varlığında ve yokluğunda, aynı zamanda ışık stresi altında *Microscytis aeruginosa* hücrelerinin verecekleri gelişim cevaplarının ve toksin genlerindeki ekspresyon farklılıklarının Gerçek Zamanlı PCR yöntemiyle incelenmesi amaçlandı. Bu çalışmada elde edilen verilerle suşların kontrollü laboratuvar koşulları altında benzer stres faktörlerine toksin üretimi açısından nasıl yanıtlar verdiklerinin ve farklı coğrafik bölgelerden izole edilen suşların çevresel stres etmenlerine karşı oluşturacakları olası gelişim ve gen anlatımı farklılıkları gözlemlenerek toksin üretimi üzerindeki etkilerinin incelenmesi hedeflendi.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. SU KİRLİLİĞİ VE ÖTROFİKASYON

Su yaşamın sürekliliği için vazgeçilmez bir kaynaktır. Tüm organizmaları temel bileşeni dolayısıyla hayatın kaynağı olan su gerekli önlemler alınmadığı takdirde yakın gelecekte dünyanın en önemli sorunlarından biri olacaktır. Tüm doğal kaynaklar gibi su da sınırsız, kullanmakla bitmeyecek bir kaynak değildir. Dünya yüzeyinin yaklaşık %70'i sularla kaplıdır. Mevcut suyun %97'sini okyanuslar ve denizlerdeki tuzlu su oluşturmaktadır. Geriye kalan %3'lük kısmını ise canlıların ihtiyaçlarını karşılayan tatlı sular oluşturmaktadır. Bu %3'lük su miktarının dünya üzerindeki dağılımı da son derece dengesizdir. Dünyadaki toplam su miktarının ancak % 0,74 kadarı kullanılabilir tatlı sudur. Kullanılabilir tatlı suyun da % 70'inden fazlası şimdiden kirlenmiş durumdadır [19, 20, 21].

Su kaynakları ile ilgili gelenek ve yasalar insanlık tarihi kadar eskidir. Uygarlığın doğup geliştiği bölgelerden biri olan Anadolu ve Ortadoğu, M.Ö. 3000'den itibaren insanlara sağladığı su kaynağı ve su ulaşım yolları ile temel yerleşim ve uygarlık alanlarından birisi olmuştur. Bilinen en eski uygarlık, ilk kez Fırat ve Dicle kıyılarında (Mezopotamya) kurulmuştur. Arkeologlar bu bölgede 4200 yıl önce, 300 yıl boyunca etkisini gösteren bir kuraklığın, Ortadoğu'nun ilk uygarlıklarından Akad Uygarlığı'nı yok ettiğini belirlemişlerdir [19].

Yirmibirinci yüzyılda nüfus artışı ve sanayileşmeye paralel olarak hızla artan su talebi karşısında küresel ısınma ve yanlış kullanım sonucu kullanılabilir su kaynaklarının giderek azalması, uluslararası gündemde suyu ilk sıraya taşımıştır. Su sorununun giderilebilmesi için tarım, sanayi ve evsel amaçlı kullanımlarda su kayıplarının önlenmesi, etkin su kullanımının sağlanması ve havza düzeyinde su kaynaklarının geliştirilmesi gerekmektedir [21]. Türkiye üç tarafı denizlerle çevrili, 8333 km kıyı şeridi, 80.791 km² deniz alanı, 10.000 km² doğal gölü, 15.000 ha göleti, 342.377 ha

baraj gölü ve 177.714 km uzunluğunda akarsuları ile önemli bir potansiyele sahiptir [22]. Bu potansiyelin verimli bir şekilde kullanılması halk sağlığı ve ülke ekonomisi açısından çok önemlidir.

Türkiye, su kaynakları kullanımı ve değerlendirilmesi açısından sorunsuz ülkelerden biri olarak görülmesine rağmen özellikle kişi başına kullanılabilir su potansiyeline bakıldığında, durumun farklı olduğu ortaya çıkmaktadır. Türkiye İstatistik Kurumu 2030 yılı için nüfusumuzun 100 milyon olacağını öngörmüştür. Bu tahmine göre 2030 yılı için kişi başına düşen kullanılabilir su miktarının 1000 m³/yıl civarında olacaktır. Uluslararası standartlar çerçevesinde bir ülkenin su potansiyeli yönünden zengin bir ülke olarak değerlendirilebilmesi için kişi başına su potansiyelinin 10.000 m³/yıl civarında olması gerekmektedir. Su potansiyeli 1000 m³'ten az olan ülkeler su fakiri kabul edilmektedir [23, 21, 1]. Bunun yanında nüfus artışı, kentleşme ve sanayileşme olgularına bağlı olarak artan su tüketim değerleri dikkate alındığında nicelik açısından yenilenebilir tatlı su kaynaklarında bir azalma ile karşı karşıya kalındığı açıktır [21]. Mevcut şartlar (ülkemizin toplam nüfusu, nüfus artış hızı, kullanılabilir su miktarı vs.) göz önüne alındığında gelecek yıllarda temiz su kaynaklarının hiçbiri kirletilmese dahi ülkemizi çok ciddi su sorunlarının beklediği açıktır.

Su, hava, toprak, gürültü kirliliği gibi çeşitli çevresel kirlenme çeşitleri vardır. İnsanlar, yaşamsal ve ekonomik gereksinimleri için suyu hidrolojik çevrimden alırlar ve kullandıktan sonra tekrar aynı döngüye iade ederler. Bu işlemler sırasında suya karışan maddeler suların fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini değiştirerek, "su kirliliği" olarak adlandırılan olguyu ortaya çıkarırlar. Son yıllarda sanayileşme ve endüstrileşmenin artması ve hızlı nüfus artışı ile birlikte çağımızın en büyük problemlerinden biri olan çevre ve su kirliliği ortaya çıkmıştır. Su kirliliği; kullanılacak bir su kaynağının, doğal yapısının olumsuz fiziksel veya kimyasal bir etmene bağlı olarak bozulmasıdır. Artan nüfus ve gelişen endüstrileşme sonucu yoğunlaşan su kullanımı, su kirliliğini hızlandıran bir etken olarak karşımıza çıkmaktadır. Bugün için su kirlenmesinin ana kaynakları evlerden gelen kullanılmış sular ile sanayi kuruluşları tarafından su yataklarına verilen sıvı atıklardır [24, 25, 26].

Genel olarak su kirliliği kentsel atıklardan, sanayiden, tarımsal faaliyetlerden, taşımacılıktan, termik ve nükleer santrallerden kaynaklanmaktadır. Başlıca kirleticiler organik ve inorganik maddeler, tuzlar, mikroorganizmalar, deterjanlar, pestisitler, ağır metaller, askıda katı maddeler, radyoaktivite, yağlar, petrol ürünleri, atıklar, ısı vb.dir. Çeşitli insan aktiviteleri sonucunda oluşan ve çok değişken yapıya sahip olan atıksular, bir yandan nehir, göl ve deniz gibi alıcı ortamlara boşaltıldıklarında ortam suyunun fizikokimyasal ve biyolojik yapısını önemli ölçüde değiştirirken diğer yandan bu alanların dip yapısında da önemli değişikliklere neden olmaktadır [27].

Ülkemizde birçok nedenden dolayı kontrol altında tutulamayan evsel, endüstriyel ve tarımsal etkinlikler sonucu, günümüzde pek çok su havzasında kirliliğin önemli boyutlara ulaştığı bilinmektedir. Özellikle endüstriyel atık sularının kontrolsüz ve bilinçsiz deşarjları nedeniyle Porsuk, Simav, Nilüfer, Ankara Çayları ile Eber, Karamuk, Küçükçekmece ve Burdur Gölleri en çok kirlenmiş yüzey sularıdır. Büyük Menderes, Kızılırmak, Gediz Nehirleri ile Tuz Gölü, Mogan gibi göllere atık su boşaltılması nedeniyle bu su kaynaklarının su kalitelerinde ciddi sorunlar yaşanmaktadır [24].

Göl kirlenmesinde temel taşınım yolları akarsular ve atmosferdir. Akarsularla taşınan çözünmüş ve askıdaki maddelerin miktarının önemli bir bölümü erozyon ve kimyasal çözünme sonucu oluşur. Bu girdilerde arazi kullanımındaki değişim ve yağmurun asitlenmesi gibi nedenlerle artış olabilir. Göle giren kirleticilerin büyük bir kısmı akarsular, endüstriler ve drenaj yoluyla taşınmasına karşılık atmosferle kirlilik taşınımı da küçümsenmemelidir. Atmosfer çeşitli maddelerin (kükürt ve azot oksitleri, hidrokarbonlar, endüstri gaz atıkları, vb) uzun mesafelere taşınımını sağlar [28].

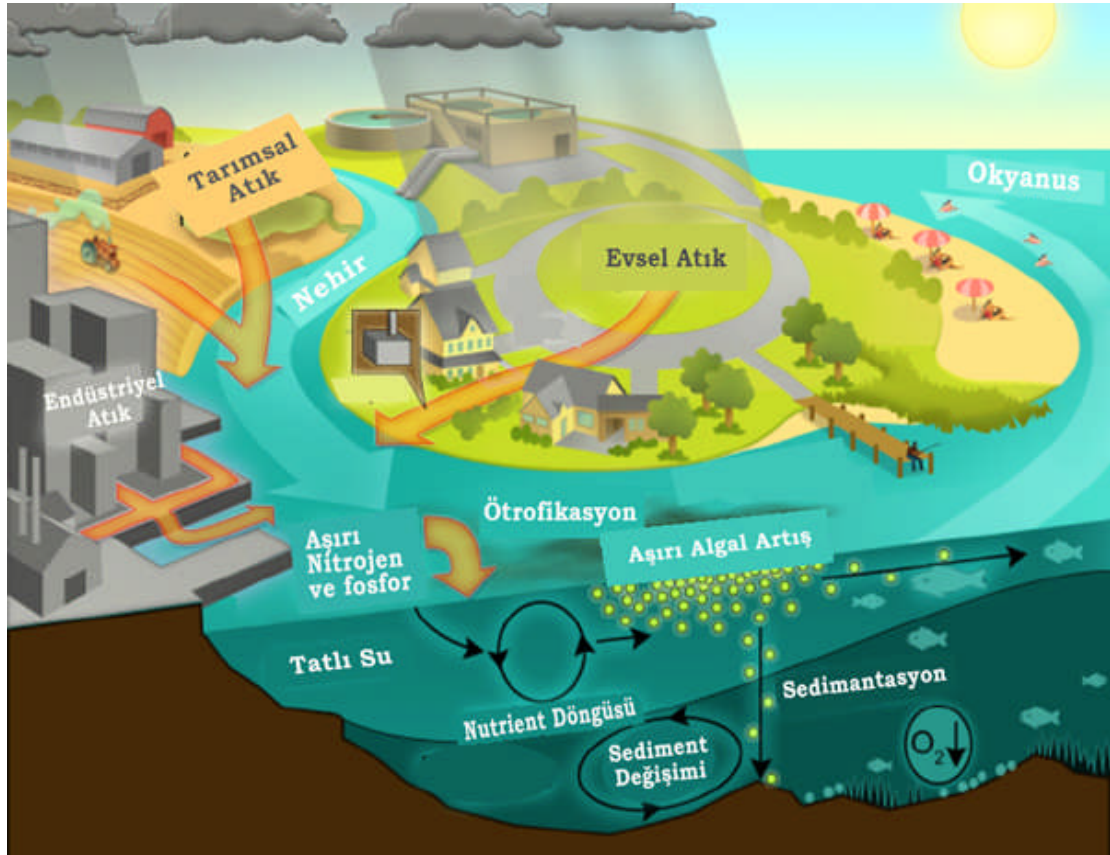
Göller oldukça büyük arazi parçalarının drenaj sularını aldıklarından göl ve gölü çevreleyen kara sistemi arasında sürekli bir alışveriş vardır. Yüzey ve yüzey altı akışları göle girer ve çıkar. Bu akışlar da çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik bileşenleri, organik maddeleri, tortu ve diğer pek çok maddeyi beraberinde sürükler. Bu akışların hızı gölün coğrafi yapısına, iklimine ve mevsimsel şartlarına bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. Akarsulara göre akış kısıtlaması olan göllerdeki kirliliğin boyutları

daha farklıdır. Özellikle dışarıya akışı olmayan göllerde ağır metaller, zor parçalanabilen pestisitler gibi bozunmayan kirleticilerin giderek kirlilik potansiyelini arttırmaları, yüzeysel sular arasında kirlenmeye karşı en hassas su grubunu oluşturan göllerin korunmasında ne denli hassas olunması gerektiğini ortaya koymaktadır [28].

Göllerin evsel, endüstriyel ve tarımsal atıklarla kirlenmesi halk sağlığı açısından büyük sorunlara neden olmaktadır. Sağlık için uygun olmayan su, taşıdığı ve içerdiği birçok maddeyle çeşitli hastalıkların nedeni olabilir. Suda bulunan çözünmüş veya çözünmemiş inorganik tuzlar, bakteriler, parazitler ve viruslar birçok hastalığın oluşumunda rol oynar. Su kaynaklı hastalıklar içinde en sık görülenler mikrobiyal ve paraziter kökenli olanlardır. Bunların başlıcaları kolera (*Vibrio cholera*), tifo ve paratifo (*Salmonella typhi* ve *S. paratyphi*), dizanteri (*Shigella dizanteriae*), turist ishali (*E. coli*), poliomyelit, hepatit A, viral gastroenteritis (Enteroviruslar), amebiasis (*Entamoeba histolytica*), giardiasis (*Giardia intestinalis*) ve criptosporidiosis (*Cryptosporidium parvum*)' dir. Diğer taraftan hayvan hastalıklarından antrax, salmonellose, brucellose, tularemi, pasteurellose, toxoplasmosis, leptospirosis, domuz kızılı, psittacosis, mantar hastalıkları gibi birçok hastalık etkeni kirli su kaynaklarından insanlara geçebilmektedir. Su kirliliği sadece bakteriyolojik açıdan tehlike oluşturmamaktadır. Sulardaki sülfat, nitrat, endüstri atıklarından ya da çeşitli sebeplerle sulara karışan arsenik, kurşun, siyanür, bakır, krom gibi maddelerle, pestisitler, deterjanlar ve radyoaktif maddeler gibi birçok madde zehirlenmelere ve çeşitli hastalıklara neden olabilmektedirler. Bunun yanında içme suyu içerisinde süspansiyon halinde bulunan ince kum ve diğer tanecikler barsak mukozasını tahriş ederek diareye neden olabilmektedir. Kirleticilerin bir kısmı insanlara doğrudan zarar verdiği gibi birçoğu da bitki ve hayvanlarda birikerek besin zinciri yoluyla insanlara geçebilmektedir. Suda yaşayan mikroorganizma, bitki ve hayvan toplulukları da kirliliğe tolerans derecelerine göre zaman içerisinde yok olmaktadır [29, 30, 31].

Sucul ekosistemlerin azot ve fosfor gibi besleyici tuzlarla (nutrientler) zenginleşmesi sonucu birincil üretim miktarı artarak organik madde üretimi ile tüketimi arasındaki denge bozulur. Ötrofikasyon olarak adlandırılan bu durum küresel ölçekteki yaygınlığı, biyoçeşitlilik ve element döngüleri üzerindeki olumsuz etkileri, yol açtığı ekonomik kayıplar ile daha gözle görülebilir sonuçları olan suyun renk ve kokusundaki değişimler,

anoksiya, toplu omurgalı ve omurgasız ölümleri nedenleriyle iklim değişimi ile birlikte en fazla ilgi gören küresel çevre sorunlarından birisidir (Şekil 2.1). Ötrofikasyon olayı ilk kez 19.yy.da göl ekosistemlerinde tespit edilmiş ve bu konu üzerinde çalışılmaya başlanmıştır [32].



Şekil 2.1: Ötrofikasyona neden olan çeşitli nutrient kaynakları ve aşırı algal artışın etkileri [33].

Göl ekosistemleri sürekli ve yavaş bir değişim içindedir. Her yıl rüzgarların etkisiyle dalgaların kıyıları aşındırması, akarsularla taşınan alüvyonların göle girmesi, biyomas atıkları, mineral çökmesi gibi etkenlerle göl dibi yavaş bir tempoda dolar. Göllerin zamanla yok olmaya doğru meyleden bu gidişine “gölün evrimi” adı verilir. Bu evrim büyük ve derin olan oligotrof göllerde yüzyıllar boyu yavaş bir şekilde sürer. Nadir olmakla beraber, bir gölün yok oluşunu izlemeye bir insan ömrü bile yeterli olabilir. Göllerin hızlı evrimleşmesinde ötrofikasyonun önemli bir rolü vardır. Özellikle tarımsal ve evsel atıkların karıştığı göllerde azotlu ve fosforlu besleyici tuzların suda artması ötrofikasyonu hızlandırır [34].

Ötrofikasyon olayının temel maddeleri azot ve fosfordur. Bu olayda ayrıca oligo-elementler, (bor, bakır, molibden, demir, potasyum vb.) silis ve bazı vitaminler rol oynar. Kirleticilerin çoğu göle ve su kanallarına evsel atıklardan, kanalizasyon sularından, yüzey akış sularından, metamorfik kayalardan ve tarımsal üretim yapan çiftliklerden gelmektedir. Evsel ve endüstriyel atıklar, deterjanlar, tarımsal uygulamalardaki atıklar ötrofikasyonda önemli bir yer oluşturmaktadır. Ötrofikasyonun neden olduğu biyolojik değişiklikler doğrudan ve dolaylı değişiklikler olarak iki kısımda incelenmektedir. Doğrudan etkiye, nutrient akışının artmasıyla birlikte algal büyümenin artması, dolaylı etkiye ise oksijen konsantrasyonundaki azalmaya bağlı olarak balık topluluklarının değişmesi örnek olarak gösterilebilir [35].

Algler sucul ortamın birincil üreticileridir ve suyun biyolojik verimliliğinin belirlenmesinde önemli bir yere sahiptirler. Algler fotosentez yaparak sucul yaşam için gerekli oksijeni sağlarlar. Ancak ötrofikasyon olayı nedeniyle aşırı çoğalan alglerin zamanla ölerek suyun dibine çökmesi ve aerobik bozunma ile birlikte sudaki çözünmüş oksijen miktarı azalır ve dip tabakada oksijensiz bir ortam oluşur. Ötrofik sularda yaşayan çözünmüş oksijene gereksinim duyan canlı türleri tolerans derecelerine göre zamanla yok olmaya başlar. Aşırı çoğalan alg türleri içinde toksik olanlar da mevcuttur. Alglerin ürettiği toksinler sucul ekosistemle ilişkili canlıların ölümlerine kadar varan toksisite sorunlarına sebep olmaktadır. Bu nedenle aşırı algal artışların meydana geldiği su kaynakları içme ve kullanma açısından uygun değildir. Bu su ortamlarında yaşayan canlıların sayısında ve biyolojik çeşitlilikte değişimler meydana gelir. Bununla birlikte ötrofik sularda kötü koku ve görünüş sorunlarından kaynaklı estetik kayıplar da yaşanmaktadır [36, 37, 38, 39, 40].

2.2. SİYANOBAKTERİLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Siyanobakteriler (Cyanobacteria), tek hücreli veya çok hücreli olabilen, klorofil-*a* içeren, fotosistem I ve II (PSI, PSII) ile oksijenik fotosentez yapabilen, sistematik terminolojide “siyanobakteriler” veya “mavi-yeşil algler” olarak adlandırılan mikroorganizma grubudur [41]. Siyanobakteriler sıcak su kaynaklarından, Antartika’da geçici olarak donan su habitatlarına kadar geniş bir yayılım gösterirler. Bitki veya mantarlarla simbiyont olarak yaşayabilirler. Siyanobakteri türleri kozmopolitan bir

dağılışı gösterir ve tüm habitatlarda bulunur. Genel olarak deniz ve tatlı sularda su sütununun planktonik üyeleri olarak yaşamlarını sürdürürler. Yapılarındaki pigmentler sayesinde CO₂ ve suyu ışığın etkisi ile karbondhidratlara çevirmekte ve böylece su ortamındaki besin değerinin ve çözünmüş O₂ oranının artmasını sağlamaktadırlar [42, 43]. Siyanobakteriler, 16S rRNA ve klorofil-*a* içeren, karbondioksit ve atmosferik azotu fiske edebilen, fotosentez yapma kabiliyeti olan, organik karbon ve oksijen üretebilen tek prokaryot organizma grubudur [44].

Siyanobakteriler çok eski yaşam formlarıdır. Dünya'nın yaşının yaklaşık 4,6 milyar yıl olduğu kabul edilmektedir. Yerküredeki yaşamın ilk olarak 3,7 ile 3,85 milyar yıl öncesinde ortaya çıktığı bilinmektedir. Bu dönemdeki bilinen en eski organizmalara ait kanıtlar, günümüzden 3,5 milyar yıl önce denizlerde yaşayan, fotosentez yapabilen ve prokaryotik hücre yapısına sahip olan fotosentetik siyanobakterilerdir. Siyanobakteriler kl-*a* yanında birçok yardımcı fotosentetik pigmentlerle birlikte birincil üretimi gerçekleştirirler [44].

Siyanobakterilerin temel yapıları tek hücreli, kolonial veya çok hücreli filamentli biçimlerden oluşur. Hücre çapları 2-40 µm arasında olabilir. Siyanobakteriler sadece aseksüel olarak ürerler. Hücre içinde özelleşmiş organelleri ve nukleus zarları yoktur. Sitoplazmalarında ribozomlar bulunmaktadır. Fotosentetik pigmentler sitoplazmada serbest bulunan ve hücre çeperinin yanında konumlanan tilakoidlerde bulunur. Fikobilizomların içerdiği pigmentler, tilakoidlerin dış yüzeyinde bulunurlar. Hücrelerde bulunan yeşil renkli klorofil-*a* pigmenti genellikle karatenoidleri ve fikosiyanin, fikoeritrin (fikobiliproteinler) gibi pigmentleri maskeler ve hücrenin rengi yeşil olarak görünür. Tüm siyanobakteriler kl-*a* ve fikosiyanin içerirler. Siyanobakteriler, fotosentetik aygıtlarında PSI ve PSII olarak adlandırılan iki tür reaksiyon merkezine sahiptir. Hücrede bulunan pigmentler farklı dalga boylarındaki ışınları soğururlar. Örneğin kl-*a* kırmızı ve mavi ışığı soğururken, yeşil ışığı geçirir ve yansıtır. Bu şekilde siyanobakteriler yapılarında bulunan çeşitli pigmentler sayesinde bulundukları habitatlardaki ışığı çok daha etkili kullanabildikleri için oldukça geniş bir alanda yayılım göstermişlerdir [41, 43]. Sitoplazma içerisinde gaz keseleri, glikojen granülleri, yağ damlacıkları, arginin granülleri, aspartik asit polimerleri ve polihedral karboksizomlar da bulunur. Buyonsi hareketinin gerçekleşmesini sağlayan gaz keseleri

özellikle yüzen akuatik türlerde görülür. Siyanobakteri türleri azotu fikse edebilir. Azot fiksasyonu özelleşmiş heterosist adı verilen hücrelerde meydana gelir. Heterosist hücreleri zarla çevrilidir [6]. Siyanobakteri türleri yüzey sularında aşırı artış olarak adlandırılan birikmeler yaparlar. Algal aşırı artışlarda hücre konsantrasyonları milimetrede milyonlarca hücreye ulaşabilir. Bu aşırı artışların sonucunda algler suyun koku ve rengini değiştirip (renk yeşil, sarı, kahve veya kırmızıya dönüşebilir), su kalitesini bozarlar. Ayrıca siyanobakterilerin toksin üreten türleri bulunduğu için bu aşırı artışlar sucul organizmalar ve suyla ilişkili canlılar için ölüme kadar varabilen toksik etkilere neden olabilmektedir [43].

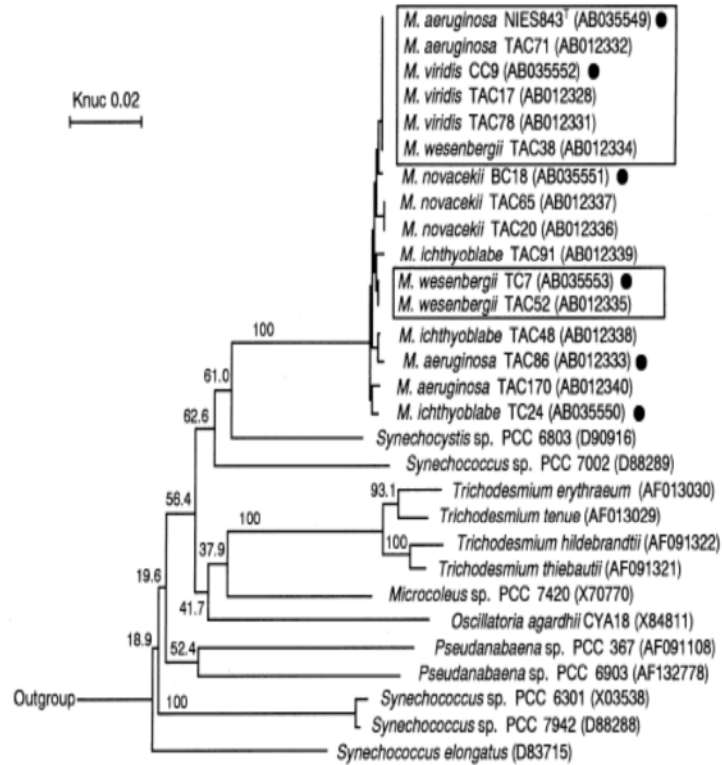
2.3. *MICROCYSTIS* TÜRLERİNİN EKOLOJİSİ

Microcystis kutup bölgeleri dışında tüm dünyadaki durgun tatlı sularda ve denizlerin kıyı bölgelerinde görülen toksik türleri bulunan ve ötrofik sularda aşırı artışlar meydana getiren bir siyanobakteri genusudur. *Microcystis* türlerinde akinet ve heterosist oluşumu yoktur ancak gaz vakuolleri mevcuttur. *Microcystis* genusuna ait hücrelerin çoğalması hücre bölünmesi ile gerçekleşir. *Microcystis* hücreleri kış ve sonbahar aylarında göl sedimentinde bulunurken yaz ve ilkbahar aylarında su sütununa çıkarlar. *Microcystis* spp., kokoid hücreleri veya renksiz bir müsilağ kılıfla çevrili kümeleşmiş düzensiz küresel hücrelerden oluşan koloni yapısıyla karakterizedir. Hücrelerin boyutu, şekli ve kolonilerin hücre tipleri büyük farklılıklar gösterir. Bu farklılıklar *Microcystis* türlerinin morfolojik olarak tanımlanmasında kullanılır (Tablo 2.1) [45, 46, 47, 48, 49].

Tablo 2.1: *Microcystis* spp.'nin taksonomisi [46, 50, 51, 52, 53].

Alan	Prokaryotlar
Alem	Öbakteriler
Alt alem	Negibakteriler
Bölüm	Siyanobakteriler
Sınıf	Cyanophyceae
Takım	Chroococcales
Aile	Microcystaceae
Cins	<i>Microcystis</i>
Tür	<i>Microcystis aeruginosa</i>
	<i>Microcystis flos-aque</i>
	<i>Microcystis ichthyoblabe</i>
	<i>Microcystis novacekii</i>
	<i>Microcystis viridis</i>
	<i>Microcystis wesenbergii</i>
	<i>Microcystis pulvereae</i>
	<i>Microcystis robusta</i>

Microcystis spp., kolonileri kültür ortamında koloni şekillerini değiştirebilir veya bir süre sonra koloni yapılarını kaybedebilirler. Kültür ortamında olduğu gibi doğal ortamlarında da *Microcystis* spp., kolonilerlerinin biçimleri değişebilir. Morfolojik yapıya dayalı tür tanımlamasının yetersiz kalmasından dolayı tür tayinleri için genetik yöntemler kullanılmaya başlanmıştır. Genetik yöntemlerle yapılan tür tayinlerinde morfolojik tanımlamalara göre farklı yaklaşımlar ve sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin 16s rRNA genlerinin karşılaştırılması ve DNA-DNA hibridizasyon sonuçlarına göre *Microcystis* türlerinin birbirleriyle büyük benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 2.2). Bu nedenle tüm *Microcystis* türlerinin tek bir *Microcystis aeruginosa* tipine ait olabileceği yönünde bir fikir ortaya çıkmıştır. *Microcystis* spp., türlerini sınıflandırmak için genetik, biyokimyasal, fizyolojik ve değişmeyen morfolojik karakterlerin birlikte değerlendirildiği bir yaklaşım gerekmektedir [46, 47, 54, 55].



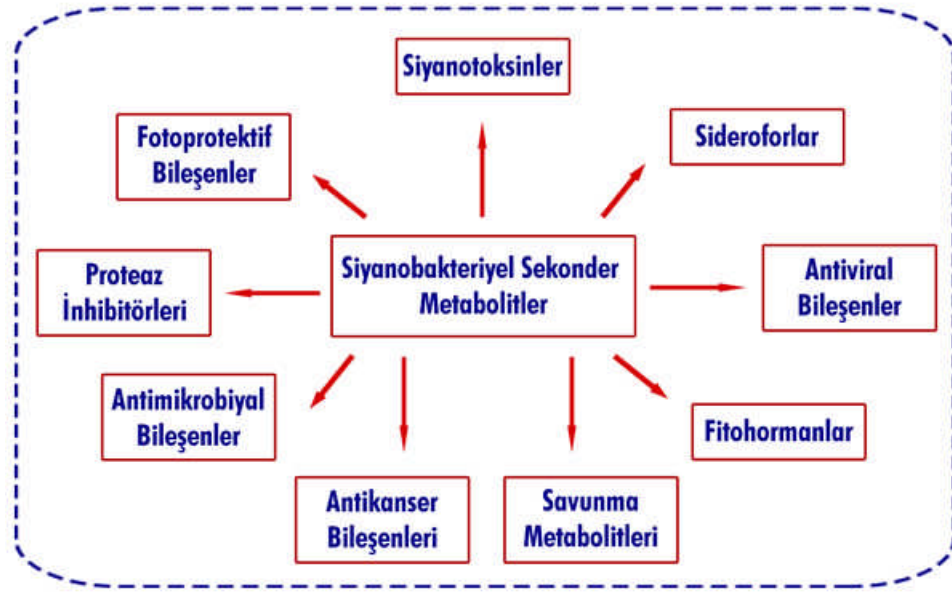
Şekil 2.2: *Microcystis* suşlarının ve *Microcystis* ile ilişkili organizmaların neighbour-joining (komşu birleştirme) ağacı: Siyah noktayla işaretlenen suşlarda DNA-DNA hibridizasyon yöntemi kullanılmış diğer suşlarda ise 16s rRNA genleri dizilenmiştir [55].

Microcystis aeruginosa tatlı su karakterindeki birçok ötrofik göl, havuz ve rezervuarda tehlikeli toksik aşırı artışlara neden olan bir *Microcystis* türüdür. Tablo 2.1’de gösterilen türler ve bunların çeşitli formları microcystin adlı toksinin primer üreticileridir. *Microcystis aeruginosa* şu ana kadar bilinen en toksik microcystin varyantı olan microcystin-LR’la birlikte microcystin-YR, microcystin-RR gibi microcystin varyantlarını üretmektedir. Bununla birlikte *Microcystis aeruginosa*, aeruginosin, cyanopeptolin, microginin ve mikroviridin adlı proteaz inhibitör özelliği olan biyoaktif bileşenleri de sentezleyebilmektedir [46, 47, 56, 57].

Microcystis aeruginosa özellikle ötrofik tatlı sularda aşırı artış göstererek tüm su yüzeyini kaplayıp suyun rengini, kokusunu ve karakteristiğini değiştirebilir. *Microcystis aeruginosa* suşları çoğunlukla toksiktir. Toksik özellikteki *Microcystis aeruginosa* suşlarının aşırı artışı su kalitesini bozmakla birlikte kontamine su kaynağıyla ilişkili tüm canlılar ve insanlar için ölümcül sonuçlara varabilen toksik etkilere neden olmaktadır [46, 58, 59].

2.4. SİYANOBAKTERİ SEKONDER METABOLİTLERİ

Son yıllarda farklı coğrafik bölgelerden kökenli birçok siyanobakteri genusundan çok sayıda siyanobakteri sekonder metaboliti izole edilmiştir. Araştırmacıların siyanobakteri sekonder metabolitlerinin üzerinde çalışmalarının en önemli nedenleri toksik siyanobakterilerin ürettiği toksinlerin canlılar ve insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri ve bu metabolitlerin potansiyel tedavi edici özellikleridir. Şu ana kadar siyanobakterilerden elde edilen 800’den fazla sekonder metabolitin antibakteriyel, antikoagülant, antifungal, antienflamatuar, antitümör, antiviral, antiprotozoal, sitotoksik ve toksik etkileri yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir (Şekil 2.3). Bu metabolitlerin yapıları coğrafik orjinlerine ve ait oldukları gruba göre çok büyük farklılıklar gösterir. Siyanobakteri sekonder metabolitlerinin çok büyük bir bölümü peptiddir veya peptidik yapılar içerir. Bu oligopeptidlerin büyük bir çoğunluğu non-ribozomal peptid sentetaz (NRPS) veya poliketid sentaz (PKS) mekanizması tarafından sentezlenir [60, 61].

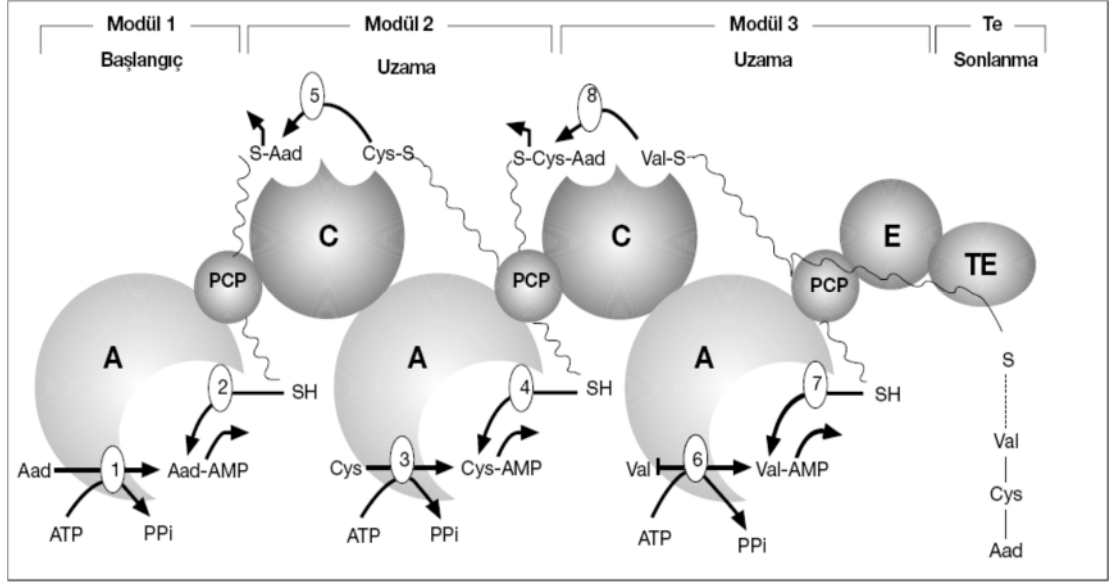


Şekil 2.3: Siyanobakteri sekonder metabolitleri [61]

Sekonder metabolitler organizma herhangi bir stres durumuyla karşılaştığında faaliyete geçen özelleşmiş metabolit yollar tarafından üretilir. Bu ürünlerin ara metabolizma ürünlerinden farkı organizmanın büyümesi ve üremesi için mutlak gerekli olmamalarıdır. Buna rağmen organizma için önemli bir takım fonksiyonlar üstlenirler. Atıkların uzaklaştırılması, detoksifikasyon, savunma ve hücreler arası haberleşme bu fonksiyonlar arasındadır. Üretildikleri organizma için üstlendikleri bu görevlerin dışında antibiyotik, kemoterapötik, pestisid, immünsüpresif, antilipolitik ajan gibi çok çeşitli farmasotik fonksiyonlara da sahiptir ve bu etkileri nedeniyle yaygın şekilde kullanılmaktadır. Fonksiyonlarındaki çeşitliliğe benzer şekilde bu bileşikler kimyasal yapıları bakımından da çok büyük çeşitlilik gösterirler [62].

Ribozom dışı protein sentez sisteminde peptidler yüksek molekül ağırlıklı çoklu enzimler (NRPS) aracılığıyla yağ asidi sentezine benzer bir mekanizmayla sentezlenirler. Ribozom dışı sentez mekanizmasında ribozomal protein sentezinde olduğu gibi aktivasyon, başlama, zincir uzaması ve sonlanma aşamaları bulunmasına ve gerekli enerji ATP hidrolizinden sağlanmasına rağmen kalıp görevini mRNA yerine peptid sentetazlar üstlenir ve oluşan ürünlerde standart L-aminoasitlere ek olarak D-aminoasitler, çok çeşitli sıradışı modifiye aminoasitler ve yağ asitleri de bulunur. Bu yolla sentezlenen oligopeptidlerin yapısında 300'den fazla amino ve yağ asidi türevinin yer aldığı tespit edilmiştir. Bu yapı taşları tiyoesterler şeklinde aktive edilirler. Peptid

bağı oluşumu ve zincir uzaması enzime kovalent olarak bağlı fosfopantetein grubu yardımıyla yağ asidi sentezine benzer bir mekanizma ile gerçekleşir. Oluşan ürünlerdeki aminoasit sayısı genellikle 3-15 arasındadır (Şekil 2.4) [62].



Şekil 2.4: Lineer tripeptid ACV'nin [Δ -(L- α -aminoadipil)-L-sisteinil-D-valin] sentez mekanizması: A, Adenilasyon bölgesi; C, Kondensasyon bölgesi; PCP, peptidil taşıyıcı protein; E, Epimerizasyon bölgesi; TE, Tiyoesteraz; Aad, Aminoadipil; -SH, Sülfhidril grubu; ATP, Adenozin tri fosfat; AMP, Adenozin mono fosfat; PPi, Pirofosfat [62].

Siyanotoksinler siyanobakteriler tarafından üretilen yüksek etkinlikte toksik bileşenlerden oluşan sekonder metabolitlerdir. Siyanobakterilerden kaynaklı aşırı alg çoğalmaları sonucu sularda siyanotoksin konsantrasyonunun aşırı artışı en önemli çevre sorunlarından birini oluşturmaktadır. Toksik siyanobakteriler dünyanın her yerinde tüm iç sular ve denizlerde bulunmaktadır. Toksik siyanobakteri türlerinden en önemlileri; *Microcystis* spp., *Planktothrix* spp., *Anabaena* spp., *Aphanizomenon* spp., *Oscillatoria* spp., *Cylindrospermopsis* spp., *Synechococcus* spp., *Gloeotrichia* spp., *Lyngbia* spp., *Nostoc* spp., *Schizothrix* spp., ve *Synechocystis* spp.'dir [45, 63].

Siyanotoksinler kimyasal yapılarına ve toksisitelerine göre çeşitlilik gösterirler. Siyanotoksinler kimyasal yapılarına göre siklik peptidler (microcystin, nodularin), alkaloidler (anatoxin-a, anatoxin-a(s), saxitoxin, cylindrospermopsin, aplysiatoxins, lyngbyatoxin-a) ve lipopolisakkaritler (LPS) olarak adlandırılırlar. Siyanotoksinler insanlarda etkiledikleri bölgeye göre ise hepatotoksinler, nörotoksinler, sitotoksinler,

dermatotoksinler ve gastrointestinal irritantlar olarak gruplandırılırlar (Şekil 2.5). [64, 65].



Şekil 2.5: Siyanotoksinlerin sınıflandırılması [61].

Hepatotoksinler birçok siyanobakteri türü (*Microcystis* spp., *Oscillatoria* spp, *Nostoc* spp., *Anabaena* spp., *Anabaenopsis* spp. *Nodularia spumigena*, *Cylindrospermopsis raciborskii*., *Aphanizomenon* spp.) tarafından üretilmektedir. Bu toksinler karaciğer hücrelerini hedef alırlar. Hepatotoksik siyanobakteri aşırı artışları tüm dünyada yaygındır ve hepatotoksinlerle etkileşimde olan tüm canlılar toksik etkilere maruz kalırlar. Çiftlik hayvanlarının, kuşların ve vahşi hayvanların zehirlenmesine ve ölümüne neden olurlar. Ayrıca Çin, Hindistan, Avusturalya ve Brezilya’da insanlarda hastalık ve ölümlere neden oldukları da rapor edilmiştir [64, 66].

Nörotoksinlerin nikotinik asetilkolin reseptörlerine karşı yüksek afiniteleri vardır. Reseptörlere bağlandıkları zaman post sinaptik reseptör iyon kanallarında konformasyonel değişikliklere neden olurlar ve bu durum da nöromuskular depolarizasyonun blokajına sebep olur. Nörotoksin içeren sulardan içen hayvanlar tipik bulgular olan çırpınma ve nefes alamama durumunun hemen ardından solunum durmasına bağlı olarak dakikalar içinde ölürlar [67, 68]. Nörotoksin üreten siyanobakteri türlerinin (*Anabaena* spp., *Oscillatoria* spp., *Aphanizomenon* spp.,

Lyngbya spp., *Cylindrospermopsis* spp.) aşırı çoğalması çiftlik hayvanları, balık çiftlikleri, vahşi hayvanlar ve insanlar için oldukça büyük bir sorun oluşturmaktadır. 1990 yılında Darling nehrindeki *Anabaena* spp., kaynaklı aşırı çoğalma sonucunda yaklaşık 1600 koyun ve büyükbaş hayvan ölmüştür [69].

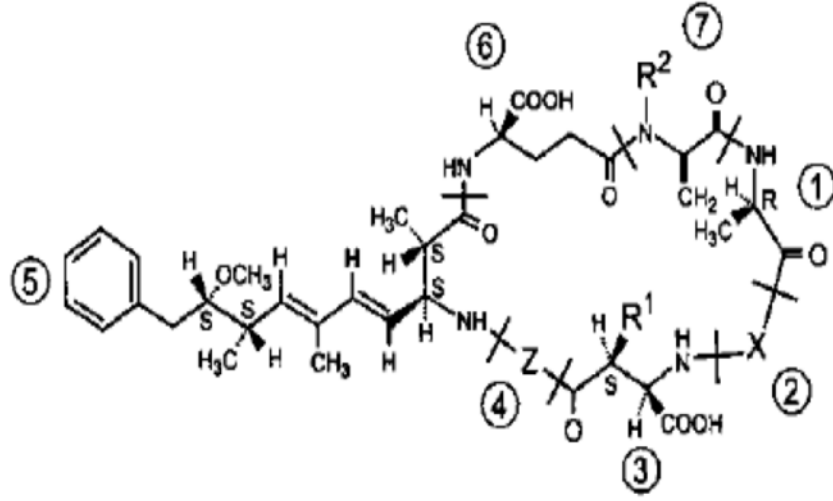
Dermatotoksinleri üreten siyanobakteri türleri (*Lyngbya* spp., *Schizothrix* spp., *Oscillatoria* spp.) deri irritasyonlarına, allerjik reaksiyonlara ve gastroenterite neden olur. Ayrıca karaciğerde küçük granulomalara ve artmış mitozise neden oldukları da bilinmektedir [70, 71].

Bilimsel literatüre geçen ilk toksik siyanobakteri artışı 1878 yılında Francis tarafından Avustralya’da rapor edilmiştir. Bu olayda siyanobakterilerle kontamine olan bir gölden su içen sığırlar zehirlenmiştir. Bu çalışmanın ardından bilim adamları toksik siyanobakterileri daha dikkatli incelemeye başlamış ve siyanobakteriler ile ilgili çalışmalar artmıştır [72]. Yapılan çalışmalar siyanobakterilerin ürettiği toksinlerden sadece çiftlik hayvanlarının değil sucul organizmaların ve insanların da etkilendiğini göstermiştir. Örneğin 1996 yılında Brezilya’nın Caruaru şehrinde bir diyaliz kliniğinde toksik siyanobakterilerle kontamine olan su kullanılarak hazırlanan serum nedeniyle 100 hastada akut karaciğer yetmezliği gelişmiş ve bu hastaların 52’si ölmüştür [10]. Avrupa, Kuzey Amerika, Avustralya, Asya ve Afrika’da yapılan araştırmalar göstermektedir ki aşırı siyanobakteri çoğalmaları geniş çaplı çevre koşulları altında hemen hemen tüm dünyada özellikle tropik ve subtropik bölgelerde meydana gelmektedir. Yine bu çalışmalar doğrultusunda aşırı siyanobakteri artışlarının %25-%75’inin toksik olduğu anlaşılmıştır. Siyanobakteriyel aşırı çoğalmaların sebebi ötrofik sulardır. Ancak tüm siyanobakteri artışlarının ötrofikasyonla ilgili olmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. Örneğin Avusturya’da insan etkilerine maruz kalmamış su kaynaklarında ve İsviçre’nin oligotrofik Alp sularında aşırı siyanobakteri artışlarının meydana geldiği görülmüştür [66]. Toksik olduğu tespit edilen siyanobakteri türlerinin bazı suşlarının ve bazı siyanobakteri türlerinin toksin üretmediği bilinmektedir. Birçok siyanobakteri suşundan ve türünden izole edilen microcystin şu ana kadar üzerinde en çok çalışılan siyanotoksindir. Buna rağmen bu toksinin neden üretildiği ve organizma için avantajı veya dezavantajının ne olduğu hala açıklanamamıştır [72].

Ülkemizdeki tatlı su ve denizel ekosistemlerde aşırı siyanobakteriyel artışlar görülmektedir. Özellikle tatlı su kaynaklarımıza ve denizel sistemlere kontrolsüzce yapılan evsel ve endüstriyel atık su deşarjları nedeniyle su kalitesi bozulmakta ve ötrofikasyonun bir sonucu olarak aşırı siyanobakteri artışlarıyla karşılaşmaktadır. Ülkemizde karşılaşılan ilk siyanobakteriyel artış, Kurtboğazı Baraj Gölü'nde (Ankara) 1981 yılında *Aphanizomenon* spp.'nin yüksek sayılara ulaşması sonucu yüzeyde bir tabaka oluşturması şeklinde görülmüştür [73]. 1997 yılında içme suyu kaynağı olarak kullanılan Sapanca Gölü'nde *Planktothrix rubescens* aşırı artışı kaydedilmiştir. Siyanobakteriyel toksinlerin tespitine yönelik ilk çalışma ise 2003 yılında Albay ve diğ. [74] tarafından yapılmış, Sapanca, İznik ve Taşkısığı göllerinde siyanotoksin varlığı tespit edilmiştir. İçme suyu kaynağı olarak kullanılan Ömerli Baraj Gölü'nde (İstanbul) 1999 yılında *Microcystis aeruginosa* artışı meydana gelmiş ve suda 5.84 µg microcystin-LR equiv. mg⁻¹ microcystin tespit edilmiştir [75]. Küçükçekmece Gölü'nde (İstanbul) 2000 yılında toksik *Microcystis aeruginosa* aşırı artışı görülmüş ve dikey değişimi incelenmiştir [76]. 2005 yılında İznik gölünde meydana gelen *Nodularia spumigena* artışı kaydedilmiş ve bu türün nodularin adlı toksini ürettiği tespit edilmiştir [77]. Haliç (İstanbul), Eğirdir Gölü (Isparta) ve Kovada Gölü'nde de toksik siyanobakteri aşırı artışları rapor edilmiştir [78, 79, 80]. Ülkemizde meydana gelen siyanobakteri aşırı artışları ve üretilen toksinlerle ilgili çalışmalar son yıllarda artmaktadır. Ancak Türkiye'deki içme ve kullanma sularındaki siyanotoksin kaynaklı tehlikenin boyutlarının net olarak ortaya konması için çalışmaların artarak devam etmesi gerekmektedir.

2.5. MICROCYSTİNİN YAPISI VE CANLILAR ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Siyanotoksinlerin bir grubu olan microcystinler, *Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc* ve *Oscillatoria* genuslarına ait siyanobakteriler tarafından üretilen siklik heptapeptid yapıda hepatotoksinlerdir. Microcystin üretimi en fazla *Microcystis* genusunda görülür. Microcystin ribozom dışı peptid sentetaz mekanizmasıyla sentezlenir ve genel yapısı 7 aminoasitten oluşan tek halkalı bir yapı şeklindedir (Şekil 2.6). Microcystinin şu ana kadar seksenin üzerinde varyantı tespit edilmiştir. [81,82, 83, 84, 85].



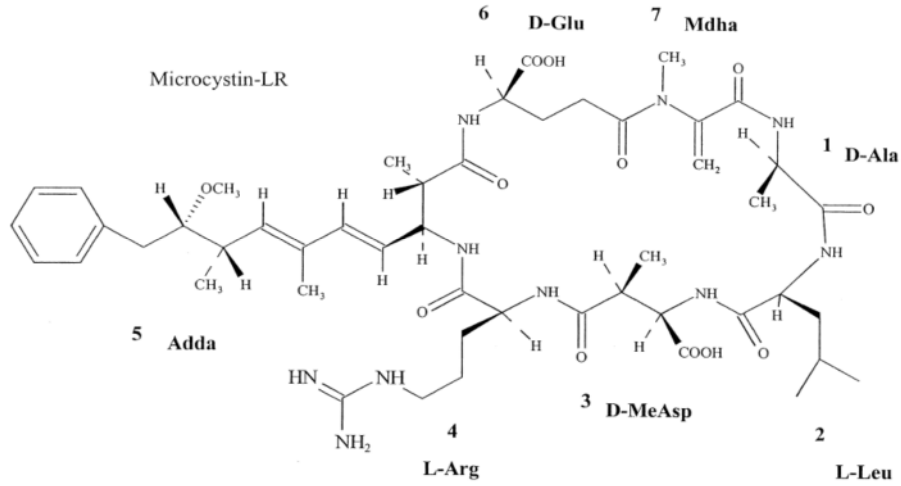
Şekil 2.6: Microcystinin genel yapısı: X, Z, R¹ ve R² ile gösterilen yerler microcystinin değişken bölgelerini temsil etmektedir [81].

Microcystin varyantlarının birçoğu yüksek derecede toksiktir. Şekil 2.6’da gösterilen X ve Z pozisyonlarına farklı aminoasitler gelebilirken R¹ ve R² pozisyonlarına metil grupları bağlanabilir. Microcystinlerin en çok bilinen 4 genel varyantının isimlendirilmesi X ve Z pozisyonlarına yerleşen aminoasitlerin kısaltmaları kullanılarak yapılır (Tablo 2.2) [81, 82, 84].

Tablo 2.2: Microcystinlerin isimlendirilmesi [81].

İsim	X pozisyonundaki aminoasit	Y pozisyonundaki aminoasit	Moleküler ağırlık
Microcystin LA	Lösin (L)	Alanin (A)	910,06
Microcystin YR	Tirozin (Y)	Arginin (R)	1045,19
Microcystin RR	Arginin (R)	Arginin (R)	1038,2
Microcystin LR	Lösin (L)	Arginin (R)	995,17

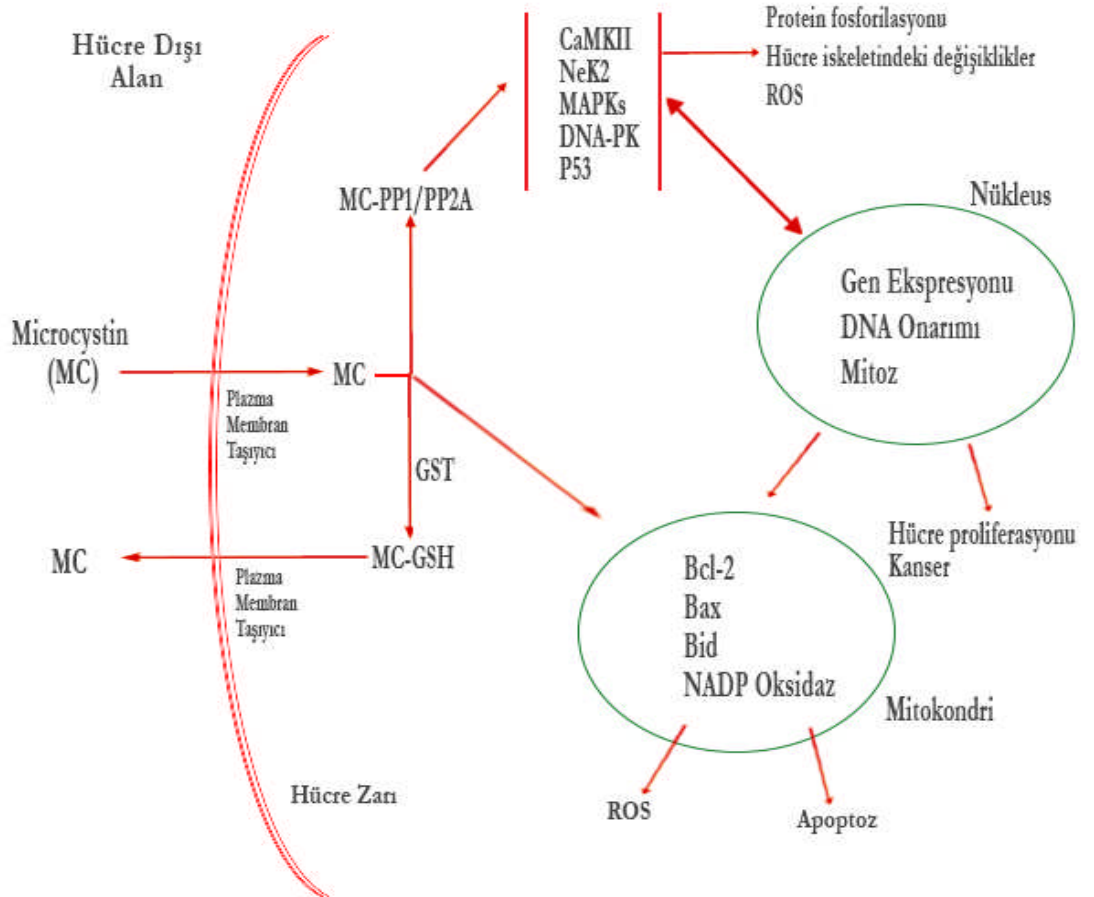
Microcystinin varyantları arasında doğada en çok karşılaşılan ve üzerinde en çok çalışılan izoform microcystin-LR’dır (Şekil 2.7). Microcystin LR, en toksik microcystin varyantıdır. Özellikle sürekli toksine maruz kalma durumunda çok düşük konsantrasyonlarda (ng/l) dahi toksik etkisini göstermektedir Diğer microcystin varyantlarının (LA, YR, RR) toksisiteleri birbirine benzerdir. [81, 86, 87, 88].



Şekil 2.7: Microcystin-LR'nin yapısı ve konfigürasyonu [88].

Microcystin aktivitesinin en çok çalışılan yollarından biri serin/treonin protein fosfatazların katalitik alt ünitesi ile etkileşime girerek bu enzimleri inhibe etmesidir. Tersinir protein fosforilasyonu dinamik bir işlemdir ve hücrelerin protein aktivitesinin düzenlenmesi için önemli bir yoldur. Fosforilasyon işlemi serin, treonin ve tirozin rezidülerinde meydana gelir ve metabolizma, membran transportu, hücre bölünmesi, transkripsiyon ve translasyon gibi hücre içi olayların kontrolü için gerekli temel mekanizma olarak tanımlanır. Microcystin toksik etkisini serin/treonin fosfataz ailesine dahil olan protein fosfataz 1 ve 2A (PP1, PP2A) üzerinde gösterir. Protein fosfataz 2B üzerinde çok az etkisi vardır. Microcystin, safra asidi organik anyon taşıyıcı sistemi yoluyla hepatositlerin içine aktif olarak taşınır. Hücre içine geçen microcystin protein fosfatazlara bağlanır ve bu enzimleri inaktive eder. PP2A önemli bir tümör baskılayıcı enzimdir. Bu enzimin inhibe olması karaciğer hücrelerinde tümör oluşumunu tetikleyebilmektedir. Protein fosfataz 1 ve 2A aktivitesiyle ilişkili hücre iskeleti yapısı bu enzimlerin inaktif olmasından etkilenir ve hücre iskeleti proteinlerinin fosforilasyonu artar. Enzimlerin aktivitesini kaybetmesi hücre iskeleti komponentlerinin yıkılmasına, hücrenin deforme olmasına ve ardından karaciğerde hemoraji görülmesine yol açar. DNA tamir yolları fosforilasyon ile düzenlenir ve PP1, PP2A'nın inhibisyonu bu tamir sistemlerinin aktivitesinin düşmesine neden olur. PP2A tipi enzimlerin direk inhibisyonları DNA onarım sistemlerinin çalışması için gerekli DNA bağlı protein kinaz (DNA-PK) aktivitesinin kaybolmasına neden olur. Bununla birlikte apoptozda görev alan CaMKII (Kalsiyum-kalmodulin bağlı protein kinaz II), Bcl-2, Bax, Bid ve NADP oksidaz enzimleri, mitotik işlemin ve kromozom ayrılmasının kontrolüne katılan Nek2,

hücre büyümesinde rolü olan MAPKs (mitojen aktiviteli protein kinazlar) ile apoptoz, DNA onarım sistemi ve tümör baskılayıcı yollarda rol oynayan nükleer fosfoprotein P53 proteinlerinin aktivitelerinin protein fosfatazlarla direkt ilişkili olması hücre metabolizması açısından olumsuz sonuçlar oluşturmaktadır. Microcystin toksisitesi reaktif oksijen türlerinin oluşumuna da neden olmaktadır. Reaktif oksijen türlerine karşı bir savunma mekanizması olan glutasyon (GSH) enziminin microcystine bağlanarak toksinin hücre dışına atılmasını sağladığı bilinmektedir ve organizmalar tarafından detoksifikasyon için kullanılmaktadır (Şekil 2.8). Microcystin toksisitesi çoklu metabolik yollar içeren kompleks bir süreçtir. Bu nedenle microcystinin toksik mekanizması hala tam olarak anlaşılamamıştır ve microcystin toksisitesinin karakterizasyonu için yapılan çalışmalar devam etmektedir [52, 84, 85, 86, 89, 90].



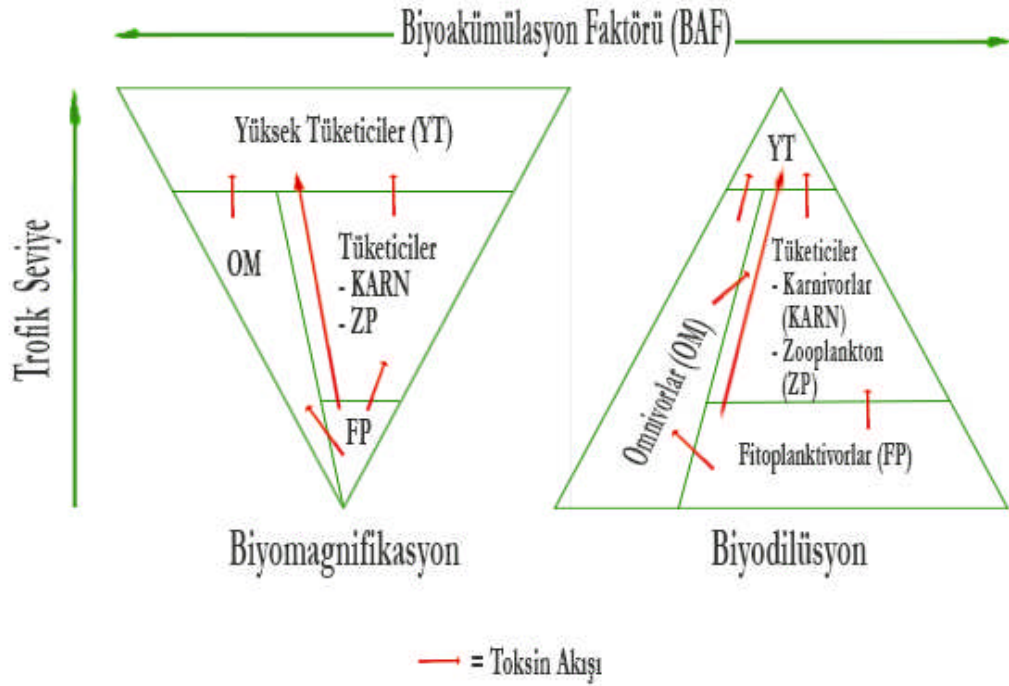
Şekil 2.8: Microcystinin hayvan hücreleri üzerindeki toksik etkisi [90].

Microcystin bir endotoksindir ve hücre stres altında olmadığı sürece hücre dışına çok az salınır. Microcystin üreten hücrelerin ölmesi veya hücre duvarlarının hasar görmesi sonucu hücre içeriğindeki toksin suya geçer. Özellikle aşırı toksik siyanobakteri artışlarının görüldüğü ötrofik sularda hücrelerin ölümüyle birlikte sudaki toksin konsantrasyonu giderek artar ve normal sınırların çok üzerinde toksin değerleri görülür. İçme sularının dezenfeksiyonu için kullanılan klor gibi kimyasal maddeler toksik hücrelerin içeriğindeki microcystinin suya geçmesine neden olur ve toksin konsantrasyonunda hızlı artışlar görülebilir. Bu tip olaylar gerçekleştiğinde kontamine suyla ilişkili sucul canlılar, vahşi hayvanlar, çiftlik hayvanları, evcil hayvanlar ve insanlar toksinlerin olumsuz etkilerine maruz kalır. Dünya Sağlık Örgütü, bilinen en toksik microcystin varyantı olan microcystin-LR konsantrasyonunun içme suyunda insan sağlığı açısından 1µg/l'yi aşmaması gerektiğini belirtmiştir. Microcystin suda uzun süre stabil kalır ve dezenfeksiyon için kullanılan kimyasal maddelerin çoğuna karşı dirençlidir. Microcystin yüksek sıcaklıkta (40 °C), düşük veya yüksek pH değerlerinde (pH<1, pH>9) ve gün ışığında yavaş bir şekilde degrades olur. Microcystinin pH=1 değerinde 40 °C sıcaklıkta yarılanma ömrü 3 hafta, normal çevre koşullarında ise 10 haftadır. Microcystin *Sphingomonas* spp. gibi bazı bakteri türlerinin proteazları tarafından parçalanabilir ancak bu bakteriler her ortamda bulunmaz. Microcystin soğuk ve karanlık sularda aylarca hatta yıllarca bozulmadan kalabilir. Microcystin kaynatmaya karşı dirençlidir. Bu nedenle microcystin içeren sularla yapılan yemeklerle de toksin vücuda alınabilir. Kontamine su kaynakları toksin uzaklaştırma işlemi yapılmadan kullanıldığında insanlar bu toksinin ciddi toksik etkilerine maruz kalırlar. [6, 81, 91, 92, 93, 94].

Microcystin stabilitesinin yüksek olması nedeniyle microcystini sudan uzaklaştırmak zordur. Microcystini içme sularından uzaklaştırmak, degrades etmek veya inaktif hale getirmek için kullanılan koagülasyon, kum filtrasyonu, klorlama, aktif karbon gibi geleneksel yöntemler ile ozonlama, fenton oksidasyonu, UV filtrasyonu ve membran filtreleme gibi gelişmiş yöntemler mevcuttur. Bu uygulamaların arasından en iyi sonuç alınan yöntemlerden biri membran filtrasyon yöntemleridir. Membran filtrasyon yöntemlerinden mikrofiltrasyon ve ultrafiltrasyon siyanobakterileri sudan uzaklaştırmak için kullanılır. Siyanotoksinleri sudan uzaklaştırmak için ise nanofiltrasyon ve ters

ozmoz etkili yöntemlerdir. Hücre içi ve hücre dışı toksinleri uzaklaştırabilmek için bu yöntemlerin birlikte kullanılması gerekmektedir [95, 96].

Sucul ortamdaki besin zincirinde ilk basamakta fitoplankton bulunur. Siyanobakteriler fitoplankton içinde yer alır ve birincil üretim açısından önemli organizmalardır. Toksik siyanobakterilerin besin zincirinde daha üst seviyede bulunan tüketiciler tarafından tüketilmeleri trofik transfer yoluyla bu toksinlerin en üst seviyedeki tüketicilere kadar ulaşmasına neden olmaktadır. Bunun yanında birçok bitki türü siyanobakteriyel toksinlerle kontamine olan sulardan siyanotoksinleri alıp akümüle ederek bu bitkileri tüketen canlılara siyanotoksinlerin geçmesine neden olmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda *Phragmites australis*, *Ceratophyllum demersum* ve *Elodea canadensis* makrofitlerinin microcystin-LR'ı, *Vallisneria natans* adlı makrofitin microcystin-RR'ı absorbe ettiği tespit edilmiştir. Microcystinle kontamine olan suyla sulanan tarım bitkileri de microcystin varyantlarını absorbe edebilmektedir ve bu bitkilerin gelişim aşamalarında sorunlar görülmektedir. Tarım bitkilerinin kontamine sularla sulanması bitkiler tarafından akümüle edilen toksinin bu bitkileri tüketen insanlara geçmesi nedeniyle halk sağlığı açısından da ciddi bir tehlike oluşturmaktadır. Bu şekilde kontamine sularla direkt ilişkide olmayan insanlar dahi microcystinin olumsuz etkilerine maruz kalmaktadır. Siyanotoksinler tatlı su besin zinciriyle ilişkilidirler. Ancak bu konuyla ilgili yeterli çalışma bulunmadığı için siyanobakteriyel toksinlerin biyoakümülyasyon ve biyomagnifikasyon mekanizmaları henüz net olarak açıklanamamıştır. Toksik siyanobakteriler fitoplanktivorlar, zooplankton ve suyu filtre ederek beslenen canlılar tarafından tüketilirler ve bu canlılar hücre içindeki siyanotoksinleri direkt olarak akümüle ederler. Ayrıca bazı türler suda serbest halde bulunan toksinleri de akümüle edebilirler (biyokonsantrasyon). Yapılan birçok çalışma siyanotoksinlerin besin zinciri yoluyla biyoakümülyasyonunun gerçekleştiğini ancak bu toksinlerin trofik seviyedeki biyodilüsyon olayının biyomagnifikasyondan daha yüksek olduğunu göstermektedir (Şekil 2.9). Bu nedenle insanların tatlı sulardaki düşük trofik seviyelerdeki canlıları (kabuklular, fitoplankton tüketen balıklar) tüketmeleri sağlık açısından daha fazla risk oluşturmaktadır [49, 97, 98, 99].



Şekil 2.9: Besin zincirindeki siyanotoksinlerin biyomagnifikasyonu ve biyodilüsyonu [98].

Zooplankton türleri fitoplankton, bakteriler ve detritustan oluşan karışık süspansiyonlardan beslenen tüketicilerdir. Bu besinler içindeki toksik *Microcystis* türlerini sindirebilen zooplankton türleri hücre içeriğindeki toksinlerin olumsuz etkilerine maruz kalır. Bununla birlikte suda serbest halde bulunan toksinlerden de etkilenirler. Zooplankton gruplarından Kopepod ve Rotiferlerin toksik siyanobakterilere karşı seçici olabildikleri, Dafniidler gibi Kladoserlerin ise bu yeteneklerinin olmadığı bilinmektedir. Bazı *Daphnia* türlerinin toksik siyanobakteri varlığında beslenmeyi bıraktıkları, bazı zooplankton türlerinin ise toksik siyanobakteri türlerini tolere edebildikleri gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada *Daphnia magna* türünün suda 0,05 mg/l miktarda çözünmüş toksinin varlığında 48 saat içinde öldüğü gözlenmiştir. Ancak bu toksin değeri her zooplankton için öldürücü etkiye yol açmamaktadır [100,101].

Ötrofikasyon kaynaklı aşırı siyanobakteri artışlarına bağlı olarak suda hızlı bir şekilde artan siyanotoksin konsantrasyonundan en çok etkilenen organizmaların başında balıklar gelmektedir. Tüm dünyada siyanotoksin kaynaklı birçok balık ölümü rapor edilmiştir. Örneğin İstanbul'un en önemli içme suyu rezervuarı olan Ömerli Baraj Gölü'nde (İstanbul) 1999 yılında *Microcystis aeruginosa*'nın aşırı artış gösterdiği

dönemlerde balık ölümleri görülmüştür. Küçükçekmece Gölü'nde meydana gelen ileri derecede ötrofikasyon olayları sonucunda avlanan balık miktarı önemli oranda azalmış ve bu durum ciddi ekonomik kayıplara neden olmuştur. İnsanlar microcystin birikimine maruz kalan balıkları tükettiklerinde (özellikle balık karaciğerinin tüketilmesi) bu canlılarda biriken toksinlerin insanlara geçtiği tespit edilmiştir. Besin zincirinin en üst seviyesinde olan insan bitkileri, omurgalı (balık, çiftlik hayvanları) ve omurgasız (midye, kerevit) canlıları tüketerek microcystini vücutlarına alırlar ve toksinin olumsuz toksik etkilerine maruz kalırlar [75, 91, 102, 103].

Microcystin balıklarda çok düşük konsantrasyonlarda ($\mu\text{g/l}$) toksik etki gösterir. Balıklar microcystini siyanobakterileri tüketerek alabilecekleri gibi genellikle toksini sudan direkt absorbe ederek alırlar. Balıklar doğal ortamlarında günler hatta haftalar boyunca microcystinine maruz kalabilir ve subletal etkilerden ölüme kadar varan toksik etkiye maruz kalırlar. Yapılan bazı çalışmalarda microcystinin subletal dozları oral yolla balıklara verilmiş ve balıklar üzerindeki etkileri incelenmiştir (Tablo 2.3). Microcystin organizma tarafından alındıktan sonra karaciğer hücrelerinde birikir ve protein fosfatazları inhibe eder. Bunun sonucunda karaciğer yapısında değişimler ve yaygın hücre ölümleri gözlenir. Balıklarda microcystinin toksik etkileri sadece karaciğerde değil böbrek, solungaç, kalp, bağışıklık sistemi üzerinde de görülür [81, 104].

Tablo 2.3: Balıklara uygulanan subletal oral microcystin dozlarının toksik etkileri [81].

Balık türü	Doz (μg MC/kg) ¹	Doz sayısı	Uygulama süresi (gün)	Toplam doz (μg MC/kg) ¹	Subletal etki
Sazan (yetişkin)	2.5	16	16	40	Yaygın karaciğer hasarı
Sazan (yetişkin)	50	28	28	1400	Ağır karaciğer hasarı
Sazan (juvenil)	400	1	1	400	Ağır karaciğer ve böbrek hasarı
Alabalık	550	8	4	4400	Ağır karaciğer hasarı
Tatlı su levreği	1150	8	4	9200	Ağır karaciğer hasarı
Tatlı su çipurası	1200	21	21	25200	Karaciğerde oksidatif stres

Microcystinle kontamine olan su kaynaklarıyla ilişkide olan vahşi hayvanlar, çiftlik hayvanları ve kedi, köpek gibi evcil hayvanlar da microcystinin toksik etkilerine maruz kalmaktadırlar. Aşırı toksik siyanobakteri artışının görüldüğü bir gölden su içen çiftlik hayvanlarında görülen ölümcül intoksikasyon olayı ilk olarak 1878 yılında belgelenmiştir. Bu ölümcül olay sadece koyun, at, sığır, domuz gibi çiftlik hayvanlarını değil köpekleri, balıkları, amfibileri, kemirgenleri, su kuşlarını, yarasaları, zebraları ve

gergedanları da etkilemiştir. Bununla birlikte microcystin içeren su kaynaklarını kullanan birçok kuş türü için sayıları binlere varan toplu ölüm olayları rapor edilmiştir. Yapılan bir çalışmada bir veteriner kliniğine anoreksiya, kusma ve depresyon şikayetleriyle getirilen dişi bir Minyatür Avustralya Çoban Köpeğinin aşırı siyanobakteriyel artışın görüldüğü bir gölden kliniğe getirilmeden iki gün önce su içtiği anlaşılmış, köpeğin dışkısında microcystin LA tespit edilmiş ve akut hepatit teşhisi konulmuştur. Yapılan detoks uygulamaları ile köpek 17 gün sonra klinik olarak normal duruma gelmiştir. [43, 104, 105].

Microcystinin insanlar üzerindeki etkileri hakkında bilinenler temelde epidemiyolojik verilere dayanır. Laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan birçok intoksikasyon ve toksikoloji çalışmaları mevcuttur. Özellikle memeli hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda görülen semptomların insanlarda da benzer şekilde gelişeceği düşünülmektedir. Microcystinin insanlar üzerinde ölüme kadar varabilen akut ve kronik etkilere sahip olduğunu gösteren birçok çalışma vardır. Microcystin kaynaklı akut intoksikasyon olayları genellikle bir su kaynağında aşırı miktarda çoğalan toksin üreten siyanobakteri türlerinin lizisi sonucu toksinlerin suya geçmesinin ardından sudaki toksin konsantrasyonunun yüksek miktarlara ulaşması ve bu suyun insanlar tarafından kullanılması nedeniyle gerçekleşir. Siyanobakteri hepatotoksinlerinden kaynaklı insan ölümlerini belgeleyen ilk olay 1996 yılında Brezilya'nın Caruaru şehrinde bir diyaliz kliniğinde gerçekleşmiştir. Rutin renal diyaliz uygulaması yapılan 131 hastanın 116'sında baş ağrısı, bulanık görme, mide bulantısı ve kusma şikayetleri oluşmuştur. Bu şikayetlerin ardından 20 Şubatta ilk ölüm vakası gerçekleşmiş ve ardından 100 hastada akut karaciğer yetmezliği gelişmiştir. Bu hastaların 52'si, şu anda Caruaru sendromu olarak adlandırılan genel bir sendromla Aralık 1996'da ölmüştür. Mağdurların karaciğer dokuları incelendiğinde, hücre deformasyonu, nekroz, apoptoz, kolestaz, vakuolizasyon, lökosit infiltrasyonu ve multinükleer hepatosit oluşumları gözlenmiştir. Bu patolojik tablonun microcystine maruz bırakılan deney hayvanlarında gelişen patolojiyle büyük benzerlikler taşıdığı görülmüştür. Pernambuco eyaleti sağlık uzmanlarının raporuna göre diyaliz işlemi için kullanılan suyun klorlandığı ve bu işlemde dolayı suda bulunan toksik siyanobakteri hücrelerinin lizisi nedeniyle toksinlerin (microcystin ve cylindrospermopsin) hücre dışına salındığı anlaşılmıştır. Bu

nedenle serum yapımı için kullanılan suyun toksin miktarı ölümcül boyutlara ulaşmıştır [10, 97].

Microcystin üretiminin görüldüğü ötrofik suların su damlacıkları halinde solunması solunum sistemi üzerinde olumsuz toksik etkilere neden olur. Yapılan bir çalışmada farelere 7 gün boyunca microcystin içeren su aerosol halinde solutulmuş ve farelerde nazal lezyonlarla birlikte solunum epitellerinde nekrozların geliştiği tespit edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada düşük miktarda microcystin (2-5 µg/l) içeren ötrofik bir gölde yüzen ve su sporları yapan insanların kanlarındaki microcystin düzeylerine bakılmış ve kanlarında ortalama 0.147 µg/l microcystin tespit edilmiştir. Bu çalışmaya göre insanlar soluma yoluyla microcystini vücutlarına alabilmektedir ve muhtemelen daha yüksek miktarlarda toksin içeren suların solunması insanların vücutlarında daha yüksek miktarlarda toksin bulunmasına neden olacaktır. Bu nedenle microcystinle kontamine olan sularda yapılan yüzme, su sporları ve benzeri aktiviteler ile kontamine olan su kaynakları kullanılarak yapılan banyo esnasında microcystin içeren su damlacıklarının solunması sağlık açısından risk oluşturmaktadır. [97, 106, 107].

Microcystinin protein fosfataz 1 ve 2 A'yı inhibe etmesi nedeniyle gelişen hücre iskeleti deformasyonu sağlıklı bir hücrenin tümör hücresine dönüşmesine neden olabilir. Yapılan hayvan deneylerinde microcystinin potansiyel kanser promotörü olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle kontamine içme suları ile birlikte sürekli olarak alınan düşük dozda microcystinin uzun vadede halk sağlığı açısından kanser riski gibi ciddi sorunlar oluşturabileceği düşünülmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar microcystin ile kontamine suları kullanan topluluklarda kolorektal kanser ve primer karaciğer kanserinin görülme sıklığının daha fazla olduğunu ve bu topluluklardaki çocukların, yaşlıların ve hepatit-B hastalarının microcystin toksisitesinden daha çok etkilendiğini göstermektedir. Yapılan çalışmalarda microcystin ekstraktı verilen farelerde deri kanserinin, sıçanlarda ve tavşanlarda karaciğer kanserinin geliştiği tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada ise insanlarda görülen kolorektal ve karaciğer kanserinin sulardaki microcystin konsantrasyonuyla doğru orantılı olarak arttığı tespit edilmiştir. Microcystin intoksikasyonunun insanlarda neden olduğu en belirgin semptomlar diare, kusma, zayıflama ve solgunluktur. Microcystinin karaciğer hücrelerinde neden olduğu protein fosforilasyonu sonucunda hepatositlerin yapısı bozulur, nekroz ve intrahepatik

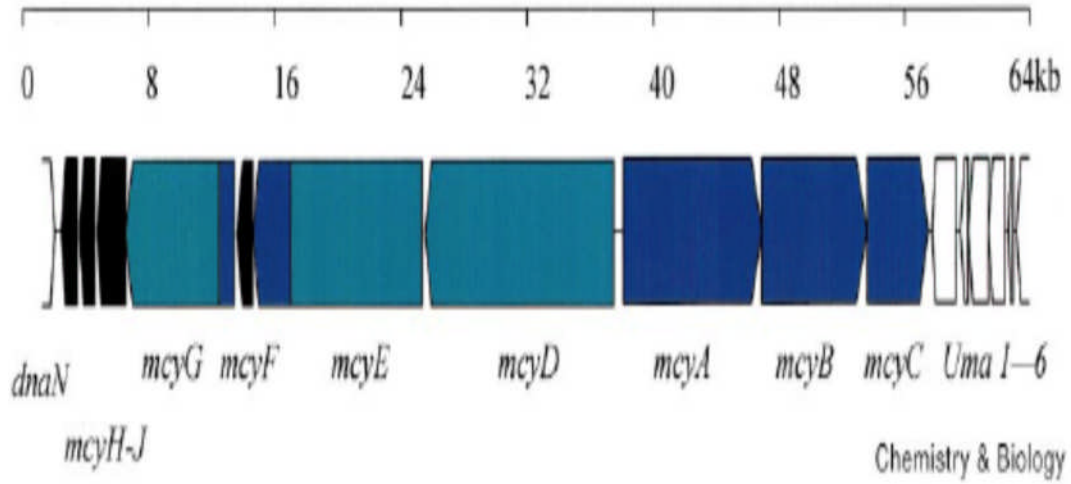
hemoraji gelişir ve yüksek dozda toksine maruz kalınmışsa bu olayların ardından ölüm gerçekleşebilir. Microcystinin primer hedef organı karaciğer olsa da gastrointestinal sistem ve böbrekler üzerinde toksik etkisinin olduğu ve allerjik reaksiyonlarla deri irritasyonlarına neden olduğu bilinmektedir. Microcystinin gastrointestinal sistem üzerindeki etkisi enterosit deformasyonu, gastroenterit ve hemorajidir. Microcystin böbreklerde glomerulus ve toplama tubullerinde lezyonlara ve hücre hasarına neden olur ve bu olayın sonucunda kandaki üre, kreatinin, azot ve potasyum değerlerinde anlamlı artışlar görülür. Microcystinin toksik etkisini inhibe eden inhibitörler bulunmaktadır. Bunlardan en etkili insanlarda tüberküloz ve diğer bakteriyel infeksiyonlara karşı kullanılan rifampin adlı antibiyotiktir. Yapılan çalışmalarda bu antibiyotığın fare ve tavşanları microcystinin ölümcül etkilerinden koruduğu gözlenmiştir. Dünya Sağlık Örgütü halk sağlığı açısından içme suyunda bulunabilecek en yüksek microcystin düzeyini, en yaygın microcystin varyantı olan microcystin-LR üzerinden tespit etmiş ve bu miktarı 1µg/l olarak düzenlemiştir. Bu düzenlemeye birçok ülke uymaktadır ve su kaynaklarındaki microcystin konsantrasyonunu izlemektedir [30, 43, 97, 108, 109, 110, 111].

2.6. MICROCYSTIN BİYOSENTEZİNİN ORGANİZASYONU

Siyanobakteriler kromozomal DNA ve bağımsız ekstrakromozal moleküller olmak üzere iki tip DNA içerir ve genom boyutu türlere göre farklılık gösterir. Tek hücreli siyanobakterilerin genom boyutu bakterilerin genom boyutuyla benzerdir. Filamentli siyanobakteri türlerinin genom boyutu tek hücreli türlerin genom boyutundan daha büyüktür. Büyük genomu olan filamentli siyanobakteri türlerindeki genomik DNA'nın büyük bir kısmının kodlama kapasitesi olmayan bazı DNA dizilerinden meydana geldiği görülmüştür. Hemen hemen tüm siyanobakteri türleri plazmid içermektedir [112].

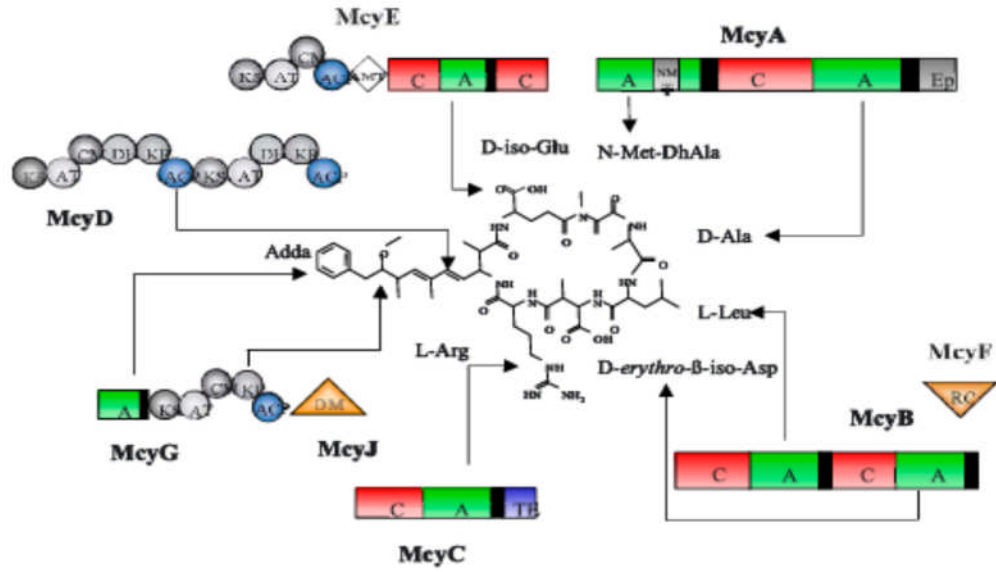
Aşırı siyanobakteri artışlarında görülen birçok siyanobakteri türü insanlar üzerinde toksik etki gösteren çok sayıda sekonder metabolit üretir. Sekonder metabolitler, büyük çok modüllü ribozom dışı peptid sentetaz (NRPS), poliketid sentaz (PKS) ve bu iki enzimatik sisteminin karışımı (NRPS-PKS) şeklindeki sistemler tarafından sentezlenir. Siyanobakteriyel sekonder metabolitlerin büyük bir bölümü poliketid-ribozom dışı

Microcystinler *mcy* gen kümesi tarafından kodlanan peptid sentetazlar olarak bilinen büyük modüler multifonksiyonel enzim kompleksleri ve poliketid sentaz enzimleri tarafından ribozom dışı yolla sentezlenen birçok sıradışı amino asit içeren küçük halkasal heptapeptid yapıda sekonder metabolitlerdir. Microcystin sentezini gerçekleştiren *mcy* gen kümesinin tüm NRPS genleri ilk olarak *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 suşundan dizilenmiştir. *Mcy* gen kümesinde NRPS genlerine ek olarak poliketid sentaz genleri ve modifiye edici enzimleri kodlayan genler bulunmaktadır (Şekil 2.11) [85].



Şekil 2.11: *Mcy* gen kümesinin organizasyonu: Koyu mavi, NRPS; açık mavi, PKS; siyah, diğer açık okuma çerçeveleri; beyaz, non-microcystin sentetaz açık okuma çerçeveleri [85].

Dizi analizleri *mcy* gen kümesinin 10 açık okuma çerçevesinin (*mcyA*, *mcyB*, *mcyC*, *mcyD*, *mcyE*, *mcyF*, *mcyG*, *mcyH*, *mcyI*, *mcyJ*) olduğunu ve 750 baz çifti uzunluğunda bir promotör bölgeyle iki operona (*mcyA-C* ve *mcyD-J*) ayrıldığını göstermiştir. İki operondan daha büyük olanı (*mcyD-J*) pentaketid kaynaklı β -aminoasit ADDA'nın (3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyl-4,6-decadienoic asit) oluşumunu katalizleyen ve D-glutamata bağlanmasını sağlayan poliketid sentazları (*mcyD*), hibrid enzimlerini (*mcyE*, *G*), ek *tailoring* enzimlerini (*mcyF*, *I*, *J*) ve ABC taşıyıcısının (*mcyH*) bir bileşenini kodlarken, küçük olanı (*mcyA-C*) dipeptidilleri heptapeptidile çevirerek peptid siklizasyonunu tamamlayan 5 modülü 3 adet NRPS genini kodlar (Şekil 2.12) [50, 52, 85, 113, 114, 116, 117].



Şekil 2.12: Microcystin sentetaz bileşenlerinin rolü ve fonksiyonel analizleri: PKS domeynleri: AT, açıl transferaz; ACP, açıl taşıyıcı protein; KS, β-ketoaçıl sentaz, KR, ketoaçıl reduktaz; DH, dehidrataz; CM, C-metiltransferaz; AMT, aminotransferaz. NRPS domeynleri: A, aminoaçıl adenilasyon; C, kondensasyon; NMT, N-metiltransferaz; EP, epimeraz, TE, tioesteraz; McyF, rasemaz; OM (McyJ), O-metiltransferaz. Siyah kutular NRPS modülleri tiolasyon motiflerini göstermektedir. Oklar microcystin biyosentezinin adımlarındaki özel proteinlerin görevini göstermektedir [113].

Microcystin toksisitesinin asıl kaynağı olan ADDA, *mcyG*, *J*, *D* ve *E* genlerinin oluşturduğu enzimlerin aktivitesiyle sentezlenir. *McyG*, hibrit bir enzimdir ve microcystin sentezini başlatır. *McyJ*, O-metilasyon aşaması için gereklidir. *McyD*, ADDA sentezinde yardımcı iki poliketid sentaz modülünden oluşur. *McyE*, ADDA'yı aktive glutamat ile kondanse eden hibrit bir enzimdir. *McyF* epimerizasyondan, *mcyI* dehidrasyon, *mcyH* lokalizasyondan sorumludur. *McyA*, *B* ve *C* genlerinin NRPS modülleri kalan 5 amino asiti aktive eder ve bu amino asitleri oluşan peptid yapısına ekler. *McyC* geninde bulunan tiyoesteraz (TE) domeyni sentezlenen lineer peptid zincirinin halkasal hale gelmesini ve microcystin sentataz kompleksinden ayrılmasını sağlar [85, 113].

Ribozom dışı peptid sentetaz genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucunda toksik özelliği olmayan mutant suşların oluştuğu görülmüştür. *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 suşunun *mcyABC* operonundaki ikinci açık okuma çerçevesi olan 6318 baz çifti uzunluğundaki *mcyB* geninin insersiyonal inaktivasyonu sonucu toksik özelliğini kaybetmesi bu genin bir microcystin sentetaz kodlayıcısı olduğunu göstermiştir. *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 suşu bilinen en toksik microcystin varyantı olan microcystin LR'ı sentezler ve değişken amino asit konumlarında L-arginin ve L-lösin

Figure 1 illustrates the organization of the *mcy* gene cluster and the chemical structures of microcystin-LR and its precursors. The top panel shows the *mcy* gene cluster map, with genes *mcyJ*, *mcyG*, *mcyF*, *mcyE*, *mcyD*, *mcyA*, *mcyB*, and *mcyC* arranged in a linear fashion. The middle panel displays the chemical structures of the microcystin-LR precursors, including the mcyG, mcyJ, mcyD, mcyE, mcyF, mcyA, mcyB, and mcyC subunits. The bottom panel shows the chemical structure of microcystin-LR, a cyclic peptide composed of D-Glu, Dha, D-Ala, L-Leu, D-MeAsp, L-Arg, and Adda residues.

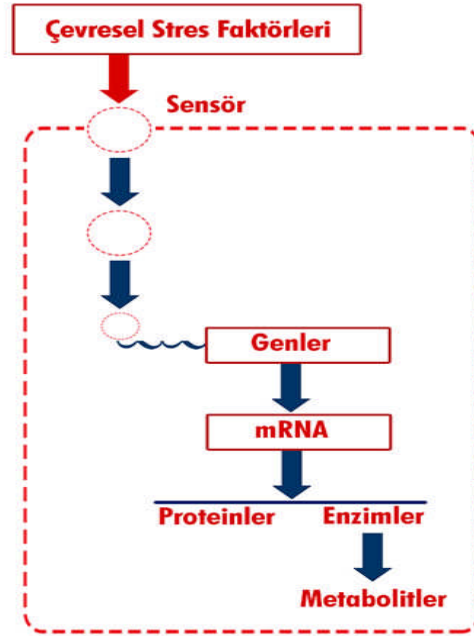
Şekil 2.13: Microcystin-LR'ın biyosentetik modeli ve *mcyA, B, C, E'*'nin domeyn yapıları: Her bir daire ve dikdörtgen sırasıyla bir PKS veya NRPS enzimatik domeynini gösterir. KS, β -ketoasil sentaz; AT, açıltransferaz; CM, C-metiltransferaz; ACP, açıl taşıyıcı protein; A, aminoasil adenilasyon; C, kondensasyon; NM, N-metiltransferaz; Ep, Epimerizasyon; TE, tiyoesteraz; AMT, aminotransferaz Aminoasil aktivasyon ve kondensasyon düzeni: L-Z-Adda, L-glutamat, L-metilserin, D-alanin, L-lösin, D-metil-aspartat, L-arginin, siklizasyon [114].

2.7. ÇEVRESEL STRES FAKTÖRLERİNİN MICROCYSTIN ÜRETİMİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Siyanobakteriler ekstrem koşullarda yaşayabilen bu nedenle geniş habitatlara yayılmış organizmalardır. Bu durum çevresel stres etmenlerine tolerans gösterebildiklerini ve çevresel koşullara adapte olma yeteneklerinin yüksek olduğunu göstermektedir. Siyanobakterilerin kuraklık veya yüksek sıcaklığın yanı sıra düşük sıcaklıklar gibi sert ve değişen çevre şartlarını da tolere ettiği bilinmektedir. Örneğin karasal bir siyanobakteri türü olan *Nostoc commune*'nin kurumuş hücreleri 100 yıldan fazla bir süre sonra bile hücre gelişim kapasitesini korumaktadır. Bununla birlikte siyanobakterilerin bazı türleri çevrenin yüksek ozmolaritesine karşı sitoplazmalarının ozmotik dengesini sağlamak için ozmotik koruyucular olarak adlandırılan hücre içi bir veya daha fazla düşük molekül ağırlıklı organik bileşikler biriktirirler. Bu şekilde halotolerant *Aphanothece halophytica* gibi bazı siyanobakteri türleri aşırı tuzlu ortamlarda canlılıklarını sürdürebilirler [119].

Çevresel stres faktörleri canlı organizmaların birçok fizyolojik aktivitesini etkiler. Çevresel koşulların optimum değerlerinde aşırı değişiklikler meydana gelirse bazı enzimlerin aktiviteleri durabilir veya yok olabilirken bazılarının da aktiviteleri artabilir. Birçok organizma stres etmenlerinin etkilerini hafifletmek için stres tiplerine özgü gen setlerini aktive ederler. Bu durumda özel proteinler sentezlenir ve bu proteinlerin bazıları stres spesifik metabolitlerin sentezine katılır. Stres spesifik metabolitlerin ve proteinlerin sentezi organizmanın veya hücrenin yeni ortam koşullarına adaptasyonu açısından oldukça önemlidir. Siyanobakteri hücrelerinin çevresel şartların değişimini algılayabilmek için sensörleri ve sinyal dönüştürücüleri vardır ve bunlar stres etmenlerinin tiplerine özgüdür (Şekil 2.14). Tek hücreli siyanobakteriler moleküler seviyede stres faktörlerine verilen cevapları araştırmak için sahip oldukları birçok özelliğinden dolayı oldukça uygun organizmalardır. Örneğin, plazma membranlarının genel özellikleri ve siyanobakteri hücrelerinin tilakoid membranları yüksek bitkilerin kloroplastlarının lipid kompozisyonları ve membranları ile benzerlik göstermektedir. Bu nedenle siyanobakterilerle yapılan çalışmalar farklı türlerdeki organizmalar için de model oluşturabilir. Bu nedenlerle siyanobakteriler çevresel strese uyum ve moleküler

seviyede geliştirilen cevaplar açısından çevresel stres etmenleri ile ilgili yapılan çalışmalarda oldukça önemli ve güçlü model sistemlerdir [120].



Şekil 2.14: Siyanobakteri hücrelerinin çevresel strese verdikleri yanıtın genel şeması [120].

Normal koşullar altında, hücre içi toksin üreten birçok alg türü çevrelerine az miktarda toksin salgılar. Stresli koşullar altında (örneğin tuzluluk değişimi, rüzgâr hareketleri ve akıntı veya aşırı algal çoğalmanın son aşamasında) toksik alglerin hücreleri parçalandığı için toksinler dış ortama verilir. Bu nedenle organizmaların yaşadığı ortamdaki kimyasal değişimler veya çevresel koşulların insan eliyle değiştirilmesi sucul ortama toksin salınımını arttırabilir ve sucul organizmalarla birlikte suyla ilişkide olan tüm canlıların zarar görmesine neden olabilir [121].

Çevresel etkenler siyanobakterilerin toksin üretimini etkiler. Özellikle ısı, ışık, besin tuzu ve eser elementler gibi etmenlerin üretilen toksin miktarına direkt etkilerinin olduğunu gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. Örneğin demir siyanobakterilerde solunum, azot yıkımı, fotosentez ve DNA sentezi için gereklidir. Bu nedenle demir siyanobakteriler için önemli bir stres faktörüdür [12]. Yapılan bir çalışmada *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 suşunda demir eksikliğinin microcystin-LR üretimini tetiklediği

ve *mcyD* geninin transkripsiyonel cevabını etkilediği tespit edilmiştir. Aynı zamanda, demir stresine maruz bırakılan toksik *Microcystis* suşlarının toksik olmayan suşlara göre daha uzun süre canlılıklarını sürdürdükleri görülmüştür [13]. Başka bir çalışmada ise çeşitli çevresel faktörlerin etkisinde bırakılan *Microcystis aeruginosa* suşunun real-time PCR kullanılarak *mcyB* gen ekspresyonuna bakılmış ve toksin biyosentezini kontrol eden ana faktörün optimum sıcaklık olduğu tespit edilmiştir [16]. Japonya’da yapılan bir çalışmada doğal ötrofik su kaynaklarında *Microcystis aeruginosa* ve *Microcystis wesenbergii* türlerinin genellikle birlikte bulunduğu görülmüştür. Aynı habitatta bulunan bu iki türden hangisinin dominant olacağını belirleyen mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır. Bu iki türün gelişimlerdeki farklılıkları anlayabilmek için sıcaklık, ışık ve besin konsantrasyonları gibi çeşitli çevresel etmenlerin etkisine bakılarak gelişimleri incelenmiştir. Yüksek su sıcaklıklarında (30-35 °C) *Microcystis aeruginosa* türünün daha iyi geliştiği görülmüştür. Düşük sıcaklıklarda ise (20-25 °C) iki türün de benzer gelişim gösterdikleri tespit edilmiştir. Diğer çevresel faktörlerdeki değişikliklerin ise bu türlerin gelişimlerinde önemli farklılıklara neden olmadığı anlaşılmıştır [122]. Ayrıca *Microcystis aeruginosa*’nın microcystin kaynaklı toksisitesinin mevsimsel veya yıldan yıla değişim gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun nedeninin çevresel faktörlerden veya *Microcystis* populasyonun kendi içindeki değişikliklerinden (toksik olmayan *Microcystis* suşların artışı veya azalışı) kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Bunun üzerine yapılan çalışmada çevresel faktörlerden ışığın toksisiteyi primer olarak etkilediği, sıcaklık ve nutrientlerin ise toksisite üzerinde daha az etkili oldukları anlaşılmıştır [15]. Bu çalışmalar göstermektedir ki çevresel stres etmenleri organizmanın gelişimiyle birlikte üretilen toksin miktarını ve toksisiteyi doğrudan etkilemektedir. Aynı zamanda sıcaklık gibi toksisite üzerinde birincil etkiye sahip olmayan bir çevresel etmenin dahi populasyondaki toksik türlerin gelişimleri üzerindeki tesiri nedeniyle toksisiteye dolaylı etkisi bulunmaktadır.

2.7.1. Demir Stresinin Microcystin Üretimi Üzerine Etkileri

Laktobasiller dışında hemen hemen tüm organizmalar açısından demir, hücrelerin içindeki oldukça fazla sayıdaki demir içeren bileşenin ve birçok reaksiyonun demir tarafından katalizlenmesi nedeniyle canlılığın sürdürülebilmesi için kesinlikle gerekli bir eser elementtir. Fotosentez, solunum, azot asimilasyonu ve fiksasyonu, fotopigment sentezi ve daha birçok biyosentetik ve degradedik reaksiyon demir içeren proteinler

tarafından katalizlendiği için demir hücre gelişiminde asli unsurdur. Demirin yokluğu hücre gelişimini, azot fiksasyonunu, enzimatik işlemleri durdurur ve fotosentetik pigmentlerin modifikasyonuna neden olur. Fe(III) ve Fe(II) arasındaki yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonları demir biyolojisi açısından önemli bir rol oynar. Denizlerde Fe(II) konsantrasyonu çok hızlı okside olduğu için oldukça düşüktür (10^{-13} M). Oksijenli koşullar altında demir Fe(III) olarak bulunur ve inorganik çözünürlüğü çok düşüktür. Yüzey sularındaki demirin %99'unun organik ligandlara bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu durum demirin fitoplanktonlar tarafından kullanılabilirliğinin azalmasına neden olmaktadır. Demirin organizmalar açısından kullanılabilir olması çözünmemiş organik ligandların bulunmasına ve ışığın varlığına bağlıdır. Denizlerde birincil üretimin üzerinde demirin sınırlayıcı etkisinin bulunması uzun zamandır dikkat çekmektedir. Laboratuvar ortamlarında yapılan çalışmalar ortamdaki demir miktarının artırılmasının algal büyümeyi tetiklediğini göstermektedir. Limnetik sistemlerde demirin konsantrasyonu genellikle okyanus sistemlerinden çok daha fazladır. Bu nedenle göllerde demir sınırlaması veya zenginleştirilmesi uygulamaları fitoplankton üzerindeki etkileri nedeniyle göl yönetimi çalışmaları için uzun zamandır önerilmektedir. Örneğin demir sülfat ötrofik sularda genellikle birincil faktör olan fosforun konsantrasyonunu düşürmek için kullanılır. Fitoplankton çoğalmasında demirin önemi nedeniyle ötrofikasyon olayı sonucunda gelişen algal aşırı artışlarda demir miktarı kritik bir rol oynayabilir [123, 124].

Karasal ortamlarda demirin biyoloji olarak kullanılabilirliği yüksekken, sucul ortamlarda ve oksijenik şartlarda çözülmez hidroksit formunda Fe(III) durumunda olduğu için biyolojik kullanılabilirliği oldukça azdır. Organizmalar demir kazanımı için iki sofistike sistem geliştirmiştir. Bunlardan biri demir-şelat bileşenlerinin kullanımıyla demirin şelatlı halini hücre içerisine almak diğeri ise plazma membranındaki redoks sistemi ile Fe(III)'ün, Fe(II)'ye indirgenmesi ve özel taşıyıcı sistemlerle hücre içine alınmasıdır [125]. Demirin geri kazanımını sağlamak için bir çok bakteri ve siyanobakteri siderofor olarak bilinen hücre dışı demir spesifik şelatörler üretirler [126]. Yüzey sularında Fe(III)'ün Fe(II)'ye indirgenmesi fotokimyasal ve biyokimyasal işlemlerle gerçekleşir. Bu nedenle yüzey sularında Fe(II) konsantrasyonunun ölçülmesi çözülmemiş Fe(III)'e göre daha kullanışlıdır. Işık aracılığıyla olan Fe redoks reaksiyonları gün içerisinde oluşan Fe(II) konsantrasyonu açısından önemlidir.

Labaratuvar çalışmaları göstermiştir ki gün ışığı altında oluşan şelatörsüz Fe(II) formu, çeşitli organik ligandlara (siderofor, şelatör) bağlanan Fe(II) formuna göre organizma açısından demirin kullanılabilirliğini arttırmaktadır. Yapılan bir çalışmada *Microcystis aeruginosa* suşunun demir kazanımında ve gelişiminde demir fotokimyasının önemli bir faktör olduğu anlaşılmıştır [127]. Demir kullanılabilirliği toplam demir konsantrasyonuna değil şelatlanmamış demir konsantrasyonuna bağlıdır ve Fe(III)'ün ışık aracılığıyla indirgenmesi ve şelatlanmamış demirin ne kadarının oksitlenen demire dönüşeceği ile ilgilidir [128].

Yapılan çalışmalar *Microcystis aeruginosa* türlerinin fotosentetik aktivitelerinin ve gelişimlerinin devamı için minimum 10 μM demire ihtiyaç duyduklarını, microcystin toksisitenin ise farklı demir konsantrasyonlarına göre değişim gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Microcystin üreten *Microcystis aeruginosa* türleri canlılıklarını toksin üretmeyen türlere göre daha uzun sürdürebilmişlerdir. Bu durum toksik *Microcystis aeruginosa* hücrelerinin demir alımını veya depolamasını daha etkili yapabildikleri hipotezini destekler niteliktedir. Laboratuvar koşullarında yapılan çalışmalarda toksinlerin divalent metal iyonlarıyla (Cu^{+2} , Zn^{+2} gibi) zayıf bağlar kurabildikleri gösterilmiştir. Demir sınırlaması altındayken microcystin üretiminin artması ve microcystinin metal bağlama özelliği ile birlikte diğer hetetrofik bakterilerde demirin peptid sentetaz sistemlerini düzenlemesi, microcystin sentezinin demir kullanılabilirliği ile düzenlenmesi ihtimalini arttırmaktadır. Bununla birlikte microcystinin halkasal yapısı diğer organizmalar tarafından sentezlenen peptid sideroforlarına benzerlik göstermektedir. Ayrıca bakteriyel Fur (Ferric Uptake Regulator) ailesine ait proteinlerin yüksek demir konsantrasyonlarında represör protein gibi davranarak DNA üzerindeki özel bir diziye bağlandığı bilinmektedir. *Microcystis* spp.'de de Fur homologları tanımlanmıştır ve bunların mcys gen kümesinin promotör bölgesine bağlandığı gösterilmiştir [14]. Bu nedenle diğer faktörlerin yanında Fur ve demir kullanılabilirliği microcystin sentezininin düzenlenmesinde önemli etmenler olarak kabul edilebilir. Yapılan bir çalışmada demir yükseltme oranının microcystin üreten *Microcystis aeruginosa* suşlarında toksin üretmeyen *Microcystis aeruginosa* suşlarına oranla oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Bu nedenlerden dolayı microcystinin aslında bir metal şelatörü olduğu, demiri hücre içinde depoladığı veya demir metabolizmasında taşıyıcı bir peptid olduğu yönünde fikirler ortaya çıkmıştır [14, 129].

2.7.2. Işık Stresinin Microcystin Üretimi Üzerine Etkileri

Solar radyasyon siyanobakterilerin doğal ortamlarında gelişmeleri için ihtiyaç duydukları en önemli faktörlerden biridir. Fotosentez sistemleri ile güneş enerjisini kimyasal enerjiye çevirirler. Işık stresi gün ışığının siyanobakterilerde oluşturduğu stres olup öncelikle fotosentez üzerine etkilidir. Işık şiddetinin azlığı ya da fazlalığı organizmada metabolik işlevler üzerinde de önemli etkiler yapar. Yüksek ışık stresi zararlı reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı artışına neden olduğundan fotosentetik organizmalar için ölümcül sonuçlar doğurabilir. Bu nedenle fotosentetik organizmalar ışığın zararlı etkilerinden korunmak için birçok koruyucu yöntem geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalardan biri fazla miktarda absorbe edilen enerjinin ısı olarak kaybını sağlayan antenna olarak adlandırılan ışık toplayıcı pigment protein kompleksidir. Bitkilerde bu işlem fotosistem II'deki LHCII (klorofil içeren ışık toplayıcı kompleks) ile gerçekleştirilir. Işık şiddetinin azalması ise karbonhidrat miktarında azalmaya neden olur. Karbonhidratlar hücrede kullanılmaya devam ettiğinden bir süre sonra organizmanın gelişiminin yavaşladığı görülür. [130, 131].

Yapılan bir çalışmada ışık şiddetinin ve kalitesinin toksin üretimi üzerinde etkisinin olduğu anlaşılmıştır. Buna göre ışık şiddetinin toksisite ve toksin üretimi üzerinde direkt etkisi varken ışık kalitesinin toksisite üzerinde zayıf bir etkisi vardır [132].

Birçok fotosentetik organizma fizyolojik olarak ışık şiddetindeki değişikliklere adapte olur. Bu adaptasyon yeteneği genellikle ışık toplayıcı bileşenlerle karakteristiktir. Siyanobakteriler ökaryotik algler ve yüksek bitkilere benzer olarak klorofil-*a*, iki fotosentetik reaksiyon merkezi, karotenoidler ve küçük elektron taşıma birimlerini içerirler ve hepsi membranla ilişki halindedir. Bununla birlikte ışık toplayıcı klorofil-*a/b* proteini prokaryotlarda bulunmaz. Bunun yerini fikobilizomlarda organize olan fikobiliproteinler almıştır. Yapılan bir çalışmada ışık şiddeti artırıldığında klorofil-*a* ve fikosiyanın konsantrasyonlarının düştüğü karotenoid, hücresel karbon ve nitrojen içeriğinde değişim görülmediği belirtilmiştir [133].

Microcystis aeruginosa türünün yıllık yaşam döngüsü iki farklı fazla karakterize olmuştur. Kış ve bahar aylarında sedimentin üzerinde yaşarlar ve buna bentik faz adı

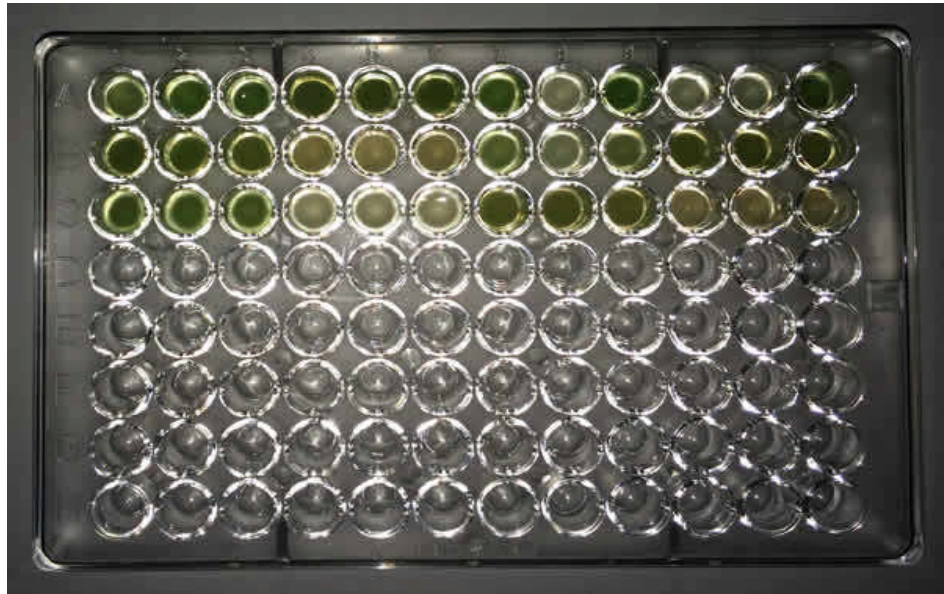
verilir. Yaz ve sonbahar aylarında ise su sütununda yaşarlar buna da planktonik faz adı verilir. Planktonik fazda hücreler koloni olarak organize olurlar ve su sütununda dikey göçler yaparlar. Yaz aylarında aşırı siyanobakteri artışlarının gerçekleştiği göllerde su yüzeyini kaplayan siyanobakteriler ışığın geçişini azaltırlar ve dikey göç yapan organizmalar için ışık stresi oluşur. Ancak siyanobakterilerin ışıkla ilgili adaptasyon mekanizmaları ışığı optimum şekilde kullanmalarını sağlar. Örneğin *Microcystis aeruginosa* üzerine yapılan bir çalışmada bu türün ışığın yokluğunu yeşil algilere göre daha iyi tolere ettiği görülmüştür. Yapılan bir çalışmada üretilen microcystin oranının ışık şiddeti artırıldığında arttığı, diğer bir çalışmada ise ışık şiddetinin artmasıyla toksin konsantrasyonunun düştüğü gözlemlenmiştir. Başka bir çalışmada ise ışığın toksin üretiminde etkili olduğu ve ışık kalitesinin *mcyB* ve *mcyD* genlerinin kopya sayılarını etkilediği belirtilmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada ise *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 suşunun optimum ışık şiddetinin microcystin üretimini pozitif yönde etkilediği suşun maksimum büyüme oranına ulaştığı ancak yüksek ışık şiddetinde microcystin üretiminin inhibe olduğu tespit edilmiştir [132, 134, 135, 136, 137].

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. *MICROCYSTIS* SPP.'NİN İZOLASYONU

Küçükçekmece Gölü'nden Eylül 2007 tarihinde plankton kepçesi kullanılarak alınan su örnekleri mikroskop altında incelendi ve yoğun olarak ve *Microcystis* spp.'nin baskın organizma olduğu tespit edildi.

Microcystis spp. izolasyonu için, binoküler mikroskop kullanılarak her bir koloni steril koşullar altında pastör pipeti yardımıyla alındı ve BG-11 kültür ortamına konularak yıkandı. Yıkama işlemi üç kez tekrarlandıktan sonra alınan *Microcystis* kolonisi içinde BG-11 kültür ortamı bulunan 250 mikrolitre hacimli kuyucuklara konuldu (Şekil 3.1).



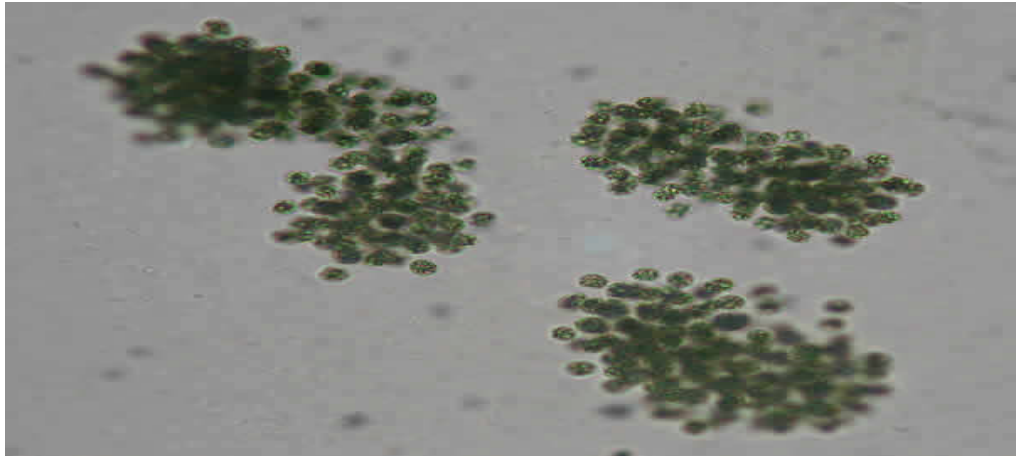
Şekil 3.1: *Microcystis* spp.'nin izolasyon sonucu konulduğu kuyucuklar.

Microcystis kolonilerinin gelişimleri takip edildi ve gelişim gösteren *Microcystis* kolonileri önce içerisinde BG-11 kültür ortamı bulunan küçük hacimli erlenlere, daha sonra da büyük hacimli erlenlere aktarıldı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: Büyük hacimli erlenlere aktarılan *Microcystis* spp. suşları.

Çoğalan *Microcystis* spp. kolonileri mikroskop altında incelendi ve fotoğrafları çekildi. İyi gelişim gösteren suşlar İ.Ü. Su Ürünleri Fakültesi İçsular Biyolojisi Alg Kültür Koleksiyonuna dahil edildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: Tez çalışmasında kullanılan *Microcystis* spp. suşu.

İyi gelişim gösteren *Microcystis* spp. suşlarından biri PCR yöntemiyle toksik olduğu tespit edildikten sonra tez çalışması için seçildi. Birçok çalışmada referans olarak kullanılan ve microcystin gen kümesi dizilenmiş olan toksik *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 suşunun, tez çalışmasında referans suş olarak kullanılmasına karar verildi.

3.2. BG-11 KÜLTÜR ORTAMI

Birçok siyanobakteri türünün kültüre edilmesinde kullanılan BG-11 ortamı 1958 yılında tanımlandığından bu yana birçok siyanobakteri türünün izolasyonu ve gelişimi için günümüze kadar çeşitli modifikasyonlarla başarıyla kullanılmaya devam edilmiştir [138]. Bazı siyanobakteri türlerinin ihtiyaçlarına göre hazırlanan BG-11 varyantları da bulunmaktadır. Örneğin azot fiksasyonu yapan siyanobakteri türleri için içeriğinde NaNO_3 bulunmayan BG-11 varyantı (BG-11₀) kullanılmaktadır [139]. Tez çalışmasında kullanılan BG-11 kültür ortamı Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1: Siyanobakteriler için BG-11 kültür ortamı [139].

BG11 Besi Ortamı	Miktar	*Eser Elementler	Miktar
NaNO_3	1500 mg	H_3BO_3	2,86 g
K_2HPO_4	40 mg	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,81 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	75 mg	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,222 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	36 mg	$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,39 g
Sitrik asit	6 mg	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,079 g
Ferrik amonyum sitrat	6 mg	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,049 g
EDTA	1 mg	Distile su	1000 ml
NaCO_3	20 mg		
Eser elementler*	1 ml		
Distile su	999 ml		

3.3. GENOMİK DNA İZOLASYONU

Genomik DNA izolasyonları gram negatif bakterilerden DNA saflaştırma yönteminin modifiye edilmesiyle lizozim ve fenol/kloroform/izoamilalkol kullanılarak gerçekleştirildi [140].

Geç logaritmik fazdaki *Microcystis aeruginosa* kültüründen 1 ml örnek alındı ve sonikasyon cihazıyla sonike edildi. Sonike edilen örnek santrifüj edildi ve üst sıvı atıldı. Pelete 500 µl Lizis Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA (pH 8.0), 50 mM NaCl) eklenip süspanse edildikten sonra final konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde lizozim eklenerek 55 °C’de 30 dk inkübe edildi. 10 µl Proteinaz K (10 mg/ml) ve 20 µl SDS (% 10) eklenerek 55 °C’de 10 dk daha inkübe edildi. İnkübasyonun ardından örnek buzda soğutuldu ve eşit hacimde 25:24:1 oranında fenol/kloroform/izoamilalkol

eklenerek ekstraksiyon işlemi yapıldı. Organik ekstraksiyon tekrar edildikten sonra 3M amonyum asetat eklendi. Örnek santrifüj edildikten sonra 2 hacim isopropanol eklenerek +4 °C’de 10 dk santrifüj edildi. Üst sıvı atıldıktan sonra 1 ml % 70 etanol eklenerek +4 °C’de 10 dk santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı ve örnek oda ısısında kurumaya bırakıldı. Kuruyan DNA’nın üzerine 100 µl steril distile su eklendi.

3.4. DNA ÖRNEKLERİNİN KALİTE VE MİKTAR TAYİNİ

Genomik DNA izolasyonları sonucunda elde edilen DNA’ların nano-drop spektrofotometrede 260-280 nm dalga boylarındaki emilim (absorbsiyon) değerleri ve konsantrasyonları ölçüldü. Spektrofotometrede ölçülen değerlerin oranı (OD 260/280) ile DNA’nın saflığı değerlendirildi. OD 260/280 <1.8 ise protein kontaminasyonu, OD 260/280 >2.1 ise RNA kontaminasyonu olduğu kabul edildi [141].

3.5. DNA ÖRNEKLERİNİN ELEKTROFOREZİ VE GÖRÜNTÜLENMESİ

Genomik DNA veya PCR ürünlerinin görüntülenebilmesi için DNA’nın zincir yapısına bağlanıp UV altında görünür hale gelen etidyum bromür boyası kullanıldı.

Agaroz jel hazırlamak için 0,5 g agaroz tartılarak 50 ml TAE solüsyonu içinde çözüldü. Solüsyon ısınıp homojenize olana kadar kaynatıldı ve içine 2 µl etidyum bromür (10 mg/ml) eklendi. Ardından çözelti elektroforez tanklarına aktarıldı ve soğuması beklendi.

Elde edilen genomik DNA örnekleri brom fenol mavisi içeren yükleme tamponuyla karıştırılarak % 1’lik agaroz jele yüklendi. Ardından 90 volt ve 70 mA akımda yaklaşık 30 dakika boyunca elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Bu işlemin ardından jel UV altında CDD kamerasıyla görüntülendi.

3.6. UZUN ARALIKLI PCR (L-PCR)

L-PCR yöntemi ile amplifiye edilecek *mcyB* geni için primer çifti (Primer 1F, Primer 1R) tasarlandı (Tablo 3.2).

Tablo 3.2: L-PCR reaksiyonu için kullanılan primer çifti.

Primer	Primer Dizisi (5' 3')	Primer Uzunluğu
Primer 1F	5' GGA GAA TCT TTC ATG GCA GAC AC 3'	23 bç
Primer 1R	5' TCA TCG TTT TTG TCG GGA TTG 3'	21 bç

L-PCR reaksiyonu için, DNA, enzim, MgCl₂, tampon çözelti, primer ve dNTP içeren bir karışım (master mix) hazırlandı (Tablo 3.3).

Tablo 3.3: L-PCR reaksiyonu için kullanılan karışım.

PCR karışımı	Hacim
H ₂ O	12.4 µl
10X LA PCR Buffer	2.5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2.0 µl
dNTP (2.5 mM)	5 µl
Primer 1	1 µl
Primer 2	1 µl
LA Taq Polimeraz	0.1 µl
DNA	1 µl
Toplam	25 µl

Microcystis aeruginosa PCC 7806 suşundan *mcvB* geninin tamamının çoğaltılması için Tablo 3.4' de gösterilen PCR programı kullanıldı.

Tablo 3.4: *mcvB* geninin tamamının çoğaltılması için kullanılan PCR programı.

	Sıcaklık	Süre
Ön Denatürasyon (1 döngü)		
Denatürasyon	95 °C	5 dk
Amplifikasyon (35 döngü)		
Denatürasyon	94 °C	30 sn
Primer Bağlanması	52 °C	1 dk
Sentez	72 °C	4 dk
Sonlanma (1 döngü)		
Son Sentez	72 °C	10 dk

L-PCR ile *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 suşundan *mcvB* geninin tamamı izole edildi ve diğer *Microcystis* suşunun *mcvB* geninin tespiti için pozitif kontrol olarak kullanıldı.

3.7. PCR (POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU)

16S rRNA gen bölgesinin tespiti için siyanobakteri spesifik 16S rRNA gen primerleri (27F, 809R) kullanıldı. *mcvB* gen fragmanının tespiti için primer çifti (Primer 1F, Primer 2R) tasarlandı (Tablo 3.5) [142].

Tablo 3.5: PCR reaksiyonları için kullanılan primer çiftleri [142].

Primer	Primer Dizisi (5' 3')	Primer Uzunluğu
Primer 1F	5' GGA GAA TCT TTC ATG GCA GAC AC 3'	23 bç
Primer 2R	5' AAT CTT GAT AAG GAC GCG GTG 3'	21 bç
Primer 27F	5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG C3'	20 bç
Primer 809R	5' GCT TCG GCA CGG CTC GGG TCG ATA 3'	24 bç

PCR işlemleri için, DNA, enzim, MgCl₂, tampon çözelti, primer ve dNTP içeren bir karışım (master mix) hazırlandı (Tablo 3.6).

Tablo 3.6: PCR reaksiyonları için kullanılan karışım.

PCR karışımı	Hacim
H ₂ O	15.35 µl
10X KCl Buffer	2.5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2.0 µl
dNTP (2.5 mM)	2 µl
Primer 1	1 µl
Primer 2	1 µl
Taq DNA Polimeraz	0,15 µl
DNA	1
Toplam	25 µl

PCR reaksiyonunun gerçekleşmesi için çeşitli koşullarda PCR reaksiyonları gerçekleştirildi (Tablo 3.7, 3.8).

Tablo 3.7: 16S rRNA geninin 780 bç'lik bölgesinin çoğaltılması için kullanılan PCR programı.

	Sıcaklık	Süre
Ön Denatürasyon (1 döngü)		
Denatürasyon	94 °C	5 dk
Amplifikasyon (30 döngü)		
Denatürasyon	94 °C	20 sn
Primer Bağlanması	56 °C	30 sn
Sentez	72 °C	60 sn
Sonlanma (1 döngü)		
Son Sentez	72 °C	7 dk

Tablo 3.8: *mcvB* geninin 578 bç'lik bölgesinin çoğaltılması için kullanılan PCR programı.

	Sıcaklık	Süre
Ön Denatürasyon (1 döngü)		
Denatürasyon	95 °C	3 dk
Amplifikasyon (35 döngü)		
Denatürasyon	94 °C	20 sn
Primer Bağlanması	56 °C	50 sn
Sentez	72 °C	30 sn
Sonlanma (1 döngü)		
Son Sentez	72 °C	5 dk

Microcystis aeruginosa PCC 7806 suşunun *mcvB* geninin tamamı daha önceki çalışmalarda dizilendiği ve nükleotid dizisi bilindiği için bu çalışmada *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 referans suş olarak kullanıldı [143].

3.8. PCR ÜRÜNLERİNİN ELEKTROFOREZİ VE GÖRÜNTÜLENMESİ

PCR reaksiyonundan elde edilen ürünleri görüntüleyebilmek için, PCR ürünlerinden 5'er µl örnek alındı ve % 1'lik agaroz jele yükleme tamponu ile birlikte yüklendi. Ürün boyutlarını belirleyebilmek için jele PCR ürünleri ile birlikte λ DNA PST ve 100 bp işaret örneği yüklendi. Agaroz jele yüklenen örnekler 90 volt ve 70 mA akımda yaklaşık 30 dakika yürütüldü. Jel transluminator kullanılarak UV altında CDD kamerasıyla görüntülendi.

3.9. DİZİ ANALİZİ

Tez çalışmasında kullanılan *Microcystis* spp. suşunun tür tayini için yapılan PCR analizi sonucunda elde edilen ürün BGI (Beijing Genomics Institute) Laboratuvarında Sanger dizileme tekniği kullanılarak çift yönlü olarak dizilenmesi için hizmet alımı yapıldı. DNA dizileme sonuçlarının analizi NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanı kullanılarak yapıldı.

3.10. DENEY DÜZENEKLERİ

Tez çalışmasında kullanılmak için seçilen toksik *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 ve *Microcystis aeruginosa* IFCC 150 suşlarının ışık ve demirin birlikte ve ayrı ayrı etkilerine verdiği cevabı incelemek amacıyla deney düzenekleri kuruldu. Deney düzeneklerinde ışık ve demir dışında değişken kullanılmadı. Diğer tüm faktörler (çevresel etmenler, eser elementler ve besin tuzları) tüm örnekler için optimum koşullarda tutuldu. Deney düzenekleri için 28 °C sabit sıcaklıkta, ortalama 1800 lx ışık şiddetinde biri 16:8 aydınlık/karanlık, biri 24 saat aydınlık olacak şekilde iki seri oluşturuldu (Şekil 3.4).



Şekil 3.4: Işık ve demirin değişken olarak kullanıldığı seriler ve örnek numaraları.

Deney düzeneklerinde her bir suş için demir açısından 3 değişken ve ışık açısından 2 değişken içeren seriler oluşturuldu. Her bir değişken 3 tekrarlı olarak çalışıldı (Tablo 3.9).

Tablo 3.9: Deney düzeneklerinde kullanılan serilerdeki örneklerin adlandırılması ve özellikleri.

16 SAAT AYDINLIK					24 SAAT AYDINLIK				
1. Seri Örnek Adı	1. Seri Tekrar Adı	Suş Adı	Stok Kültür Ortamı Fe İçeriği	Kültür Ortamı Fe İçeriği	2.Seri Örnek Adı	2. Seri Tekrar Adı	Suş Adı	Stok Kültür Ortamı Fe İçeriği	Kültür Ortamı Fe İçeriği
Kontrol	1	PCC 7806	Fe (+)	Fe (+)	Kontrol	19	PCC 7806	Fe (+)	Fe (+)
	2	PCC 7806	Fe (+)	Fe (+)		20	PCC 7806	Fe (+)	Fe (+)
	3	PCC 7806	Fe (+)	Fe (+)		21	PCC 7806	Fe (+)	Fe (+)
	4	PCC 7806	Fe (-)	Fe (+)		22	PCC 7806	Fe (-)	Fe (+)
Fe+	5	PCC 7806	Fe (-)	Fe (+)	Fe+	23	PCC 7806	Fe (-)	Fe (+)
	6	PCC 7806	Fe (-)	Fe (+)		24	PCC 7806	Fe (-)	Fe (+)
	7	PCC 7806	Fe (-)	Fe (-)		25	PCC 7806	Fe (-)	Fe (-)
	8	PCC 7806	Fe (-)	Fe (-)		26	PCC 7806	Fe (-)	Fe (-)
Fe-	9	PCC 7806	Fe (-)	Fe (-)	Fe-	27	PCC 7806	Fe (-)	Fe (-)
	10	IFCC 150	Fe (+)	Fe (+)		28	IFCC 150	Fe (+)	Fe (+)
	11	IFCC 150	Fe (+)	Fe (+)		29	IFCC 150	Fe (+)	Fe (+)
	12	IFCC 150	Fe (+)	Fe (+)		30	IFCC 150	Fe (+)	Fe (+)
Fe+	13	IFCC 150	Fe (-)	Fe (+)	Fe+	31	IFCC 150	Fe (-)	Fe (+)
	14	IFCC 150	Fe (-)	Fe (+)		32	IFCC 150	Fe (-)	Fe (+)
	15	IFCC 150	Fe (-)	Fe (+)		33	IFCC 150	Fe (-)	Fe (+)
	16	IFCC 150	Fe (-)	Fe (-)		34	IFCC 150	Fe (-)	Fe (-)
Fe-	17	IFCC 150	Fe (-)	Fe (-)	Fe-	35	IFCC 150	Fe (-)	Fe (-)
	18	IFCC 150	Fe (-)	Fe (-)		36	IFCC 150	Fe (-)	Fe (-)

Bu serilerin yardımıyla demirin varlığında ve yokluğunda, aynı zamanda sürekli ışık stresi (24 saat aydınlık koşul) altında siyanobakteri hücrelerinin verecekleri gelişim cevaplarının incelenmesi amaçlandı. Her bir seri için *Microcystis* hücrelerinin demir stresi altındaki gelişiminin incelenmesi amacıyla demir içermeyen BG-11 ortamları hazırlandı. *M. aeruginosa* PCC 7806 ve *M. aeruginosa* IFCC 150 suşlarının bu iki serideki gelişimi eş zamanlı olarak 16 gün boyunca izlendi. Dört günde bir klorofil-*a*

taini ve RNA izolasyonu için örnek alınırken, hücre yoğunluğu için her gün örnek alındı.

3.11. DENEY DÜZENEKLERİ İÇİN KULLANILAN KÜLTÜR ORTAMLARI

Standart BG-11 ortamında kullanılan Ferrik amonyum sitratın final konsantrasyonu 21 μM 'dur [105]. Tez çalışmasında bu değer *M. aeruginosa* PCC 7806 ve *M. aeruginosa* IFCC 150 hücreleri için optimum demir miktarı olarak kabul edildi.

Bu çalışmada demir stresine maruz bırakılan örnekler için hazırlanan sıvı BG-11 kültür ortamına Ferrik amonyum sitrat eklenmedi. Bunun dışında kullanılan tüm kimyasal maddeler ve miktarları standart BG-11 kültür ortamında kullanılan kimyasal maddeler ve miktarlarına uygun olarak hazırlandı. Demir içermeyen BG-11 varyantı BG-11_{Fe(-)} olarak adlandırıldı.

Demir stresine maruz kalmayan ve hücrelerin optimum demir ihtiyaçlarının karşılandığı örnekler için standart BG-11 kültür ortamları hazırlandı ve bu ortamlara eklenen örnekler demir içermeyen örneklerle aynı koşullarda takip edildi. Bu şekilde optimum demir içeren kültür ortamı ile demir içermeyen kültür ortamlarındaki hücrelerin gelişimleri ve toksin üretme yeteneklerinin karşılaştırılması hedeflendi.

Hazırlanan BG-11 ve BG-11_{Fe(-)} kültür ortamları 250 ml hacimli cam erlenlere her birinde ortalama 180 ml sıvı kültür ortamı olacak şekilde aktarıldı.

3.12. DEMİR İÇERMEYEN BG-11 KÜLTÜR ORTAMI HAZIRLIĞI

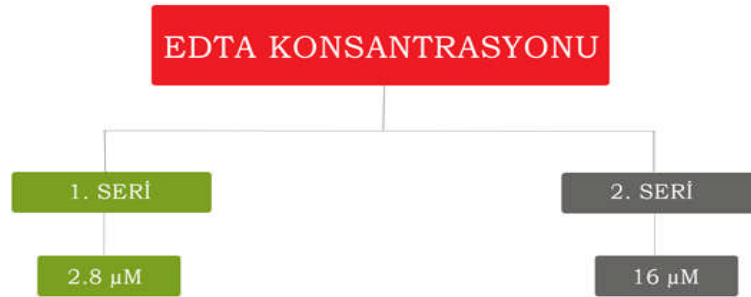
3.12.1. Temizlik

Çalışmada kullanılan tüm plastik ve cam eşyalar organik ve inorganik kalıntıların uzaklaştırılabilmesi için deterjanla yıkandıktan sonra % 10'luk HCL çözeltisinde 1 gece bekletildi [144, 145]. Ardından demir kalıntılarını tamamen uzaklaştırabilmek için tüm malzemeler 10 mM EDTA çözeltisinde 1 gece bekletildikten sonra ultra saf su ile yıkanıp kurutuldu [146, 147].

3.12.2. EDTA Konsantrasyonu

EDTA (ethylenediaminetetraacetate), nehirler, göller ve yeraltı suları gibi birçok sucul ortamda bulunan, sentetik olarak da sentezlenebilen, Ca ve Mg iyonlarıyla ve ağır metallere (Pb, Zn, Cd vb.) stabil kompleksler oluşturan bir şelat yapıcı ajandır. EDTA metal iyonlarıyla da kompleks oluşturabilir [148]. BG-11 besi ortamı yaklaşık olarak 15 μM Fe(III) içerir ve bu miktarın bir kısmı çökelti halinde bulunur.

BG-11 besi ortamında bulunan demirin EDTA ile kompleks oluşturma oranlarının artırılması ve besi ortamındaki demir çöktürmelerini engellemek için ortama eklenen EDTA miktarı artırıldı [149, 150]. Bu çalışmada BG-11 kültür ortamındaki standart EDTA miktarı ve 5.7 kat artırılmış EDTA kullanılarak demir içermeyen kültür ortamı için iki farklı seri oluşturuldu (Şekil 3.5). Bu serilerden biri 2,8 μM EDTA (standart EDTA miktarı) içerirken diğeri 16 μM EDTA içerdi. Her iki seri de de ICP MS cihazı ile ölçüm yapılarak hangi serideki demirin tamamen uzaklaştırıldığı tespit edildi.



Şekil 3.5: Demirsiz kültür ortamlarında kullanılan EDTA konsantrasyonları.

3.12.3. Tindalizasyon

Otoklav cihazından kaynaklı olası demir kontaminasyonunu önleyebilmek için demir içermeyen BG 11 kültür ortamının sterilizasyonu tindalizasyon yöntemi kullanılarak yapıldı [151]. Tindalizasyon, yüksek sıcaklığa dayanıklı olmayan çeşitli besiyeri ve çözeltilerin su banyosunda düşük sıcaklıkta (80°C) 60 dakika 3 gün üst üste ısıtılarak sterilize edilmesi işlemidir. Tindalizasyon, ilk uygulamada canlı kalan sporların bir sonraki uygulamadan önce germinasyonla vejetatif hale geçerek sonraki ısıtmada ölecekleri prensibine dayanmaktadır [152]. Bu çalışmada Keller'ın mikrodalga

sterilizasyon yöntemi kullanılarak tındalizasyon işlemi gerçekleştirildi [153]. Demir içermeyen besiyer ortamı kaynama derecesine kadar ısıtılıp ardından oda ısısında soğumaya bırakıldı. Bu işlem üç gün üst üste tekrar edildi.

3.12.4. Hücre Dışı Demirin Uzaklaştırılması

Demir içermeyen BG-11 stok kültür ortamlarına ekim yapılmadan önce *Microcystis aeruginosa* hücreleri santrifüj edilerek kültür ortamlarından uzaklaştırıldı. Ardından hücreler 20mM MES, 10mM EDTA (pH 5.0) içeren çözeltide 15 dk inkübe edildi. Bu işlemin ardından hücreler BG-11_{Fe(-)} kültür ortamında 15 dk inkübe edilip yeniden santrifüj edilerek BG-11_{Fe(-)} kültür ortamından uzaklaştırıldı. Hücre dışı demirin tamamen uzaklaştırılması amacıyla bu işlem bir kez daha tekrarlandı [154, 149]. Bu işlemlerin ardından *Microcystis aeruginosa* hücreleri demir içermeyen farklı EDTA konsantrasyonlarındaki kültür ortamlarına ekildi.

3.13. HÜCRE İÇİ VE HÜCRE DIŞI DEMİR KONSANTRASYONUNUN TAYİNİ

Siyanobakteri hücrelerinin demiri ferritin veya bacterioferritin kompleksleri şeklinde hücre içinde depoladıkları bilinmektedir [154]. Bu nedenle stok BG-11_{Fe(-)} kültür ortamlarındaki hücrelerin demir stoklarının tüketilmesi için örnekler 10 gün boyunca optimum kültür koşullarında bekletildi. Ardından ICP-MS cihazı kullanılarak hem BG-11_{Fe(-)} kültür ortamında hem de hücre içeriğindeki demir konsantrasyonu ölçüldü.

3.13.1. ICP-MS (İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometrisi)

ICP-MS katı ve sıvı örneklerde çok sayıda elementin hızlı, hassas ve doğru biçimde ölçülmesine olanak sağlayan bir analiz tekniğidir. ICP-MS teknolojisi sayesinde katı veya sıvı örneklerde 76 element aynı anda ve çok düşük derişimlerde (nanogram-pikogram/l) hassas ve hızlı bir şekilde analiz edilebilmektedir [155].

Stok BG-11_{Fe(-)} kültür ortamındaki *M. aeruginosa* PCC 7806 ve *M. aeruginosa* IFCC 150 hücrelerindeki demir konsantrasyonunun ölçülebilmesi için örnekler % 80'lik nitrik asitle mikrodalga fırında homojenize edildikten sonra % 5'lik nitrik asit solüsyonuna konuldu. Ardından ICP-MS cihazında içerdikleri Fe konsantrasyonları tespit edildi. Stok besi ortamlarındaki hücre dışı demir konsantrasyonunun belirlenmesi için kültür

ortamlarından alınan örnekler santrifüj edilerek üst sıvılar toplandı ve ICP-MS cihazında hücre dışı demir konsantrasyonları tespit edildi.

3.14. HÜCRE SAYIMI

M. aeruginosa PCC 7806 ve *M. aeruginosa* IFCC 150 hücrelerinin sayımı için Neubauer sayım kamarası (hemositometresi) kullanıldı. Sayım alanındaki 5 büyük kare (5 mm^2) içerisinde yer alan hücreler ışık mikroskobu altında sayılıp, dilüsyon faktörü ile çarpılarak ml’de ne kadar hücre bulunduğu aşağıdaki formüle göre tespit edildi [156].

$$d = 10^4 \times [\text{hücre sayısı} / (\text{kare sayısı} \times \text{dilüsyon})] \text{ hücre.mL}^{-1} \quad (3.1)$$

Stok kültür ortamlarındaki hücre sayıları tespit edildikten sonra deney düzeneklerindeki örneklerin başlangıç hücre yoğunluklarının eşitlenmesi amacıyla her bir örneğe kaç ml hücre ekleneceği hesaplandı. Bunun için stok hücre yoğunlukları spektrofotometrede 678 nm dalga boyunda ölçüldü ve 180 ml besi ortamı için stok kültür ortamlarından ne kadar hücre alınacağı spektrofotometre değerleri ve hücre sayıları oranlanarak tespit edildi.

3.15. HÜCRE YOĞUNLUĞU ÖLÇÜMÜ

Microcystis aeruginosa PCC 7806 ve *Microcystis aeruginosa* IFCC 150 hücreleri yeni ortamlarına ekildikten sonra serilerdeki örnekler 16 gün boyunca takip edilerek her gün tüm kültür ortamlarından 100’er μl örnek alınıp, 96 kuyucuklu platelere aktarıldı ve hücre yoğunluğu spektrofotometre ile 678 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak takip edildi [11].

3.16. KLOROFİL-A TAYİNİ

Klorofil-a tayini, filtre edilen *M. aeruginosa* PCC 7806 ve *M. aeruginosa* IFCC 150 hücrelerinin % 90’lık sıcak etanolla muamelesinin ardından klorofil ekstraktının absorbansının spektrofotometrik olarak tespitiyle elde edilen değerlerin hesaplanması sonucu gerçekleştirildi [157]. Serilerdeki örnekler 16 gün boyunca takip edilerek 0, 4, 8, 12 ve 16. günlerde örneklerin klorofil-a ölçümleri yapıldı.

3.17. TOTAL RNA İZOLASYONU

Total RNA izolasyonu DNA izolasyonuna göre daha zor ve hassas bir yöntemdir. Özellikle ribonükleazların inaktive edilmesi zor olduğundan RNA izolasyonunun ribonükleaz içermeyen ortamlarda yapılması gerekmektedir. Gen anlatımı çalışmalarının sağlıklı bir şekilde gerçekleşebilmesi için iyi kalitede ve yeterli miktarda RNA elde edebilmek çok önemlidir. Siyanobakterilerde bulunan metabolitler ve polisakkarit yapılar hücre parçalanmasını zorlaştırmaktadırlar. Bu nedenle yeterli miktarda ve kalitede RNA elde edebilmek için bu çalışmada trizol yöntemi kullanılmıştır [2].

Microcystis aeruginosa kültüründen alınan 1 ml örnek içinde seramik boncuklar olan tüplere aktarıldı ve 1 ml Trizol reaktifi eklendi. Magna Lyser (Roche) cihazıyla hücrelerin parçalanması sağlandı. Ardından hücreler 60 °C’de inkübe edildi. Faz ayırıcı tüplere aktarılan hücre lizatına 1-bromo-3-chloropropan (BCP) eklendi. Oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra örnek santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından elde edilen süpernatant yeni bir santrifüj tüpüne aktarılarak isopropanol eklendi. Örnek - 20 °C’de inkübe edildikten sonra santrifüj edildi. Santrifüj edilen örneğin pelet kısmına %75’lik etanol eklendikten sonra örnek yeniden santrifüj edildi ve üst sıvı atılıp RNA peleti oda ısısında kurumaya bırakıldı. Elde edilen pelete 50 µl RNaz içermeyen su eklendi.

3.18. RNA ÖRNEKLERİNİN KALİTE VE MİKTAR TAYİNİ

3.18.1. RNA Örneklerinin Spektrofotometrik Yöntemle Kalite ve Miktar tayini

M. aeruginosa PCC 7806 ve *M. aeruginosa* IFCC 150 suşlarından elde edilen RNA’ların nano-drop spektrofotometrede 260-280 nm dalga boylarındaki Emilim (absorbsiyon) değerleri ve konsantrasyonları ölçüldü. Spektrofotometrede ölçülen değerlerin oranı (OD 260/280) ile elde edilen RNA’nın saflığı değerlendirildi. RNA’nın saflığı değerlendirilirken A260/A280 oranı esas alındı. 260 nm DNA’nın, 280 nm proteinin maksimum absorbans verdiği dalga boyunu ifade etmektedir. A260/A280 oranının ~2 değerinde olması RNA’nın saf olduğunu göstermektedir [3, 158].

3.18.2. RNA Örneklerinin Florometrik Yöntemle Miktar tayini

Nükleik asitlerin florometrik yöntemlerle yapılan miktar tayini spektrofotometrik yöntemle yapılan miktar tayinine oranla çok daha hassastır. Florometrik yöntemde RNA zincirine bağlanan özel floresan boyalar kullanılır. Örnek içindeki tuz, protein, deterjan gibi kontaminantların varlığı belirlenemediğinden örneğin saflığı değerlendirilememektedir.

Tez çalışmasında izole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen) cihazı ve Qubit RNA Assay ticari kiti kullanılarak ölçüldü.

3.19. RNA ÖRNEKLERİNİN ELEKTROFOREZİ VE GÖRÜNTÜLENMESİ

Elde edilen RNA örnekleri brom fenol mavisi içeren yükleme tamponuyla karıştırılarak % 1'lik agaroz jele yüklendi. Ardından 90 volt ve 70 mA akımda yaklaşık 30 dakika boyunca elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Bu işlemin ardından jel UV altında görüntülendi.

3.20. cDNA (KOMPLEMENTER DNA) SENTEZİ

RNA konsantrasyonlarının belirlenmesinin ardından spektrofotometrik ve florometrik yöntemlerle elde edilen ölçüm sonuçlarının ortalaması alınarak cDNA sentezinin gerçekleşeceği tüplerin her birinde 250 ng/μl RNA olacak şekilde RNA örnekleri seyretilti.

cDNA sentezi, Transcriptor High Fidelity cDNA sentez kiti (Roche) kullanılarak üretici firmanın protokolü kullanılarak gerçekleştirildi. RNA konsantrasyonları eşitlenen örneklere 2 μl random hexamer primerleri eklendi (Tablo 3.10).

Tablo 3.10: cDNA sentezi için RNA ve primer karışımı.

Karışım	Hacim
Total RNA	Değişken
Random Hexamer (600 pmol/ μl)	2 μl
Su	Değişken
Toplam hacim	11.4 μl

RNA örnekleri 65 °C’de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından RNA örnekleri buza alındı. Ardından master mix (ana karışım) hazırlanarak bu karışımdan her bir örneğe 8.6 µl eklendi (Tablo 3.11).

Tablo 3.11: cDNA sentezi için kullanılan ana karışım.

Master Mix	Hacim
Reverse transkriptaz reaksiyon tamponu	4 µl
Protector RNaz İnhibitör	0.5 µl
Deoksinükleotid karışımı	2 µl
DTT	1 µl
Reverse transkriptaz	1.1 µl
Toplam	20 µl

Toplam hacimleri 20 µl olan örnekler PCR cihazında inkübasyona alındı (Tablo 3.12).

Tablo 3.12: cDNA sentezi için PCR cihazında gerçekleştirilen inkübasyonlar.

	Sıcaklık	Süre
İnkübasyon 1	29 °C	10 dk
İnkübasyon 2	48 °C	60 dk
İnkübasyon 3	85 °C	5 dk
Sonlanma	4 °C	

PCR cihazında gerçekleştirilen inkübasyon işleminin ardından örnekler –20 °C’de saklandı.

3.21. GERÇEK ZAMANLI PCR (REAL-TİME PCR)

Günümüzde en yaygın olarak kullanılan ve kesin sonuçlar veren nicel PCR yöntemi Gerçek Zamanlı PCR’dir. Gerçek Zamanlı PCR başlangıç miktarına göre oluşan son PCR ürününün kantifikasyonu için kullanılan özgün, hassas ve kolay bir yöntemdir [159]. DNA sarmalına bağlanarak floresan ışımaya yapan özel boyalarla (SYBR Green, SYTO9 gibi) veya yıkıma bağlı sinyal oluşturan prob dizileri aracılığı ile amplifikasyon miktarının tespit edilmesini sağlamaktadır. Bu yöntem aracılığıyla her PCR döngüsü sonunda tüp içinde oluşan çift zincirli ürün miktarı ölçülerek kantitatif analizlerin yapılması sağlanmaktadır. SYBR Green I, çift zincirli DNA’ya bağlanarak floresan ışımaya yapan gen anlatımının ölçümünde sıklıkla kullanılan bir boyadır. SYBR Green

I'in çift zincirli PCR ürününe bağlanması ürün miktarı ile orantılı olarak floresan ışımaya neden olmaktadır [160, 161].

Bu çalışmada *mcvB* geninin amplifikasyonu LightCycler 480 (Roche) cihazı kullanılarak yapıldı. Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR) reaksiyonu için, cDNA, master mix (FastStart Taq DNA Polymerase, tampon, dNTP karışımı SYBR Green I boyası, MgCl₂) ve primer içeren bir karışım hazırlandı (Tablo 3.13, 3.14) [162].

Tablo 3.13: RT-PCR reaksiyonu için kullanılan karışım.

RT-PCR karışımı	Hacim
H ₂ O	1 µl
Primer 1	1 µl
Primer 2	1 µl
Master mix	5 µl
cDNA	2
Toplam	10 µl

Tablo 3.14: *mcvB* genini çoğaltmak için kullanılan primer çifti [162].

Primer	Primer Dizisi (5' 3')	Primer Uzunluğu
30F	5' CCY ACC GAG CGC TTG GG 3'	18 bç
108R	5' GAA AAT CCC CTA AAG ATT CCT GAG T 3'	25 bç

Kantitatif değerlendirme yapabilmek amacıyla ekspresyonu sabit olduğu varsayılan housekeeping gen (internal kontrol) olarak RpoC1 geni RpoC1F ve RpoC1R primerleri kullanılarak amplifiye edildi (Tablo 3.15) [163].

Tablo 3.15: RpoC1 genini çoğaltmak için kullanılan primer çifti [163].

Primer	Primer Dizisi (5' 3')	Primer Uzunluğu
RpoC1F	5' CCT CAG CGA AGA TCA ATG GT 3'	20 bç
RpoC1R	5' CCG TTT TTG CCC CTT ACT TT 3'	20 bç

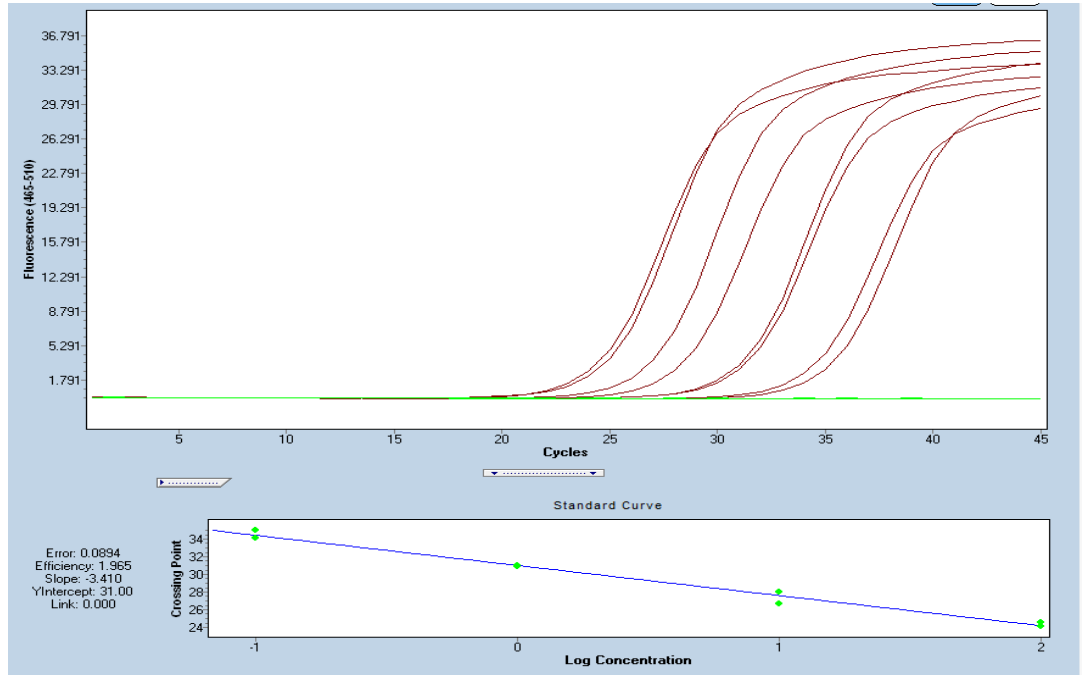
mcvB ve RpoC1 genlerinin amplifikasyonları için yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda Tablo 3.16'da gösterilen kantitatif PCR koşulları oluşturuldu.

Tablo 3.16: Real-time PCR koşulları.

	Sıcaklık	Süre
Ön Denatürasyon (1 döngü)		
Denatürasyon	95 °C	3 dk
Amplifikasyon (45 döngü)		
Denatürasyon	95 °C	10 sn
Primer Bağlanması	60 °C	10 sn
Sentez	72 °C	10 sn
Melting Curve Analizi (1 döngü)	95 °C	05 sn
	65 °C	60 sn
	97 °C	
Soğutma (1 döngü)	40 °C	30 sn

3.21.1. Standart Eğrinin Hazırlanması

M. aeruginosa PCC 7806 suşunun demir içeren stoğundan izole edilen 1250 ng/μl konsantrasyondaki RNA örneğinden 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 oranlarında dilüsyon serisi hazırlandı. RpoC1 housekeeping geninin primerleri kullanılarak bu serinin PCR reaksiyonu gerçekleştirildi ve elde edilen kopya sayıları ile standart eğri oluşturuldu (Şekil 3.6).

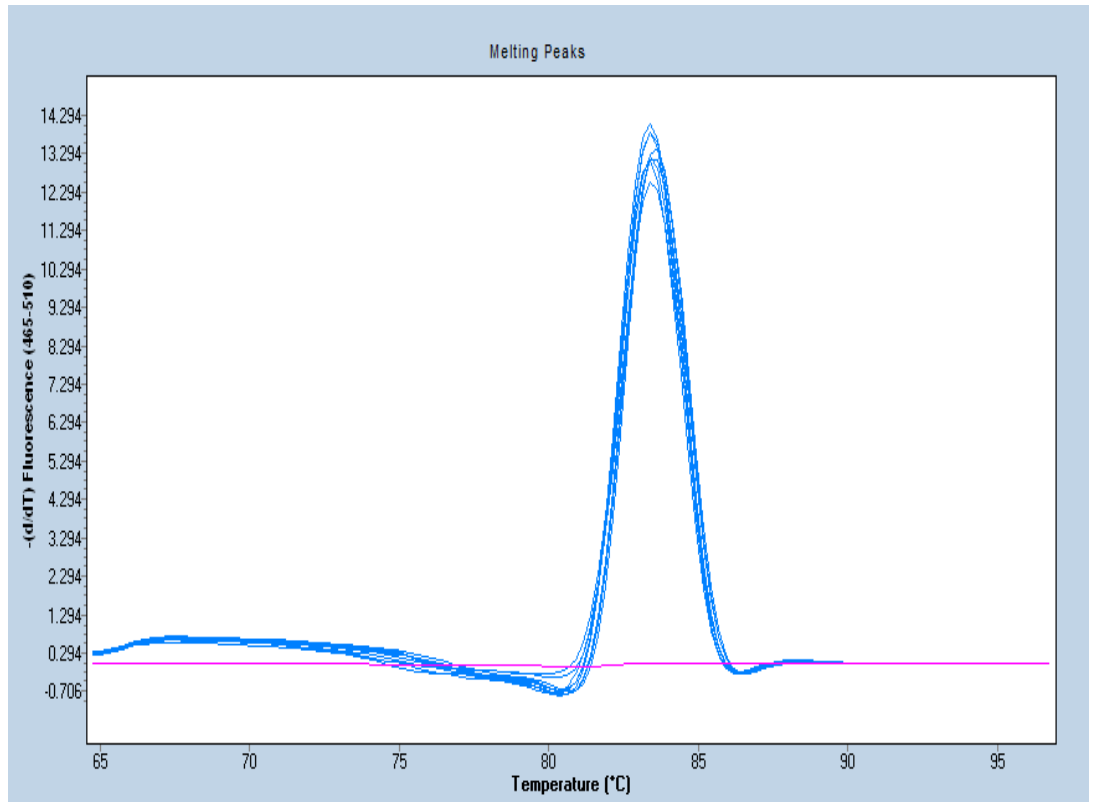
**Şekil 3.6:** Standart olarak kullanılan RpoC1 genine ait standart eğri ve amplifikasyon eğrileri.

3.21.2. SYBR Green I Boyası

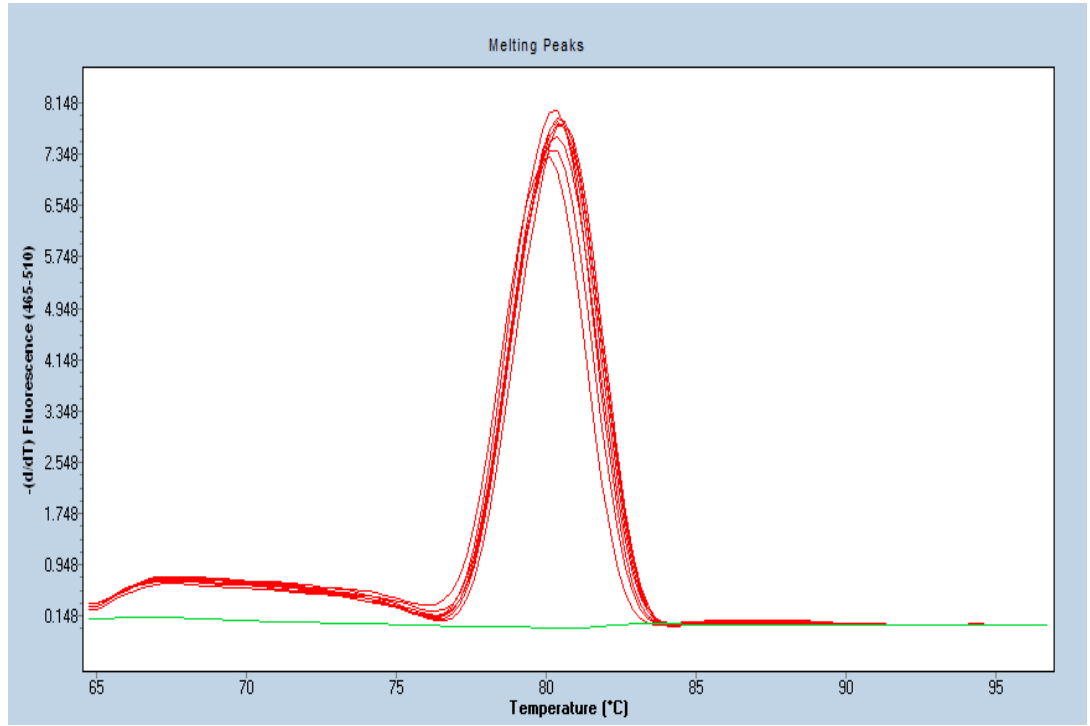
Yapılan deneylerde *RpoC1* ve *mcyB* genlerinin amplifikasyonu belirleyebilmek için SYBR Green I boyası kullanıldı. SYBR Green I floresan ışımayı saptamak için en sık kullanılan boyadır. SYBR Green I, çift iplikli DNA'ya bağlanır. Ortamdaki çift iplikli DNA sayısı arttıkça, yani amplifiye olan cDNA miktarı arttıkça elde edilen floresan miktarı da artmaktadır [164].

3.21.3. Erime Eğrisi (Melting Curve) Analizi

PCR sonucu elde edilen ürünlerin gerçek PCR ürünü olup olmadığı erime eğrisi yöntemi ile kontrol edildi. Erime ısısı (T_m), genin amplifikasyon ürününün %50'sinin denatüre olduğu sıcaklık değeridir ve bu değer genin dizisine ve %GC oranına bağlı olarak farklılık gösterir. Erime eğrisi yöntemi de bu özellikten yararlanarak, PCR sonunda elde edilen amplifikasyon eğrilerinin gen ürünü mü yoksa primer dimer ya da ortam kirliliğine bağlı bir eğri olup olmadığını belirler (Şekil 3.7, 3.8) [164].



Şekil 3.7: RpoC1 genine ait erime eğrisi grafiği.



Şekil 3.8: *mcyB* genine ait erime eğrisi grafiği.

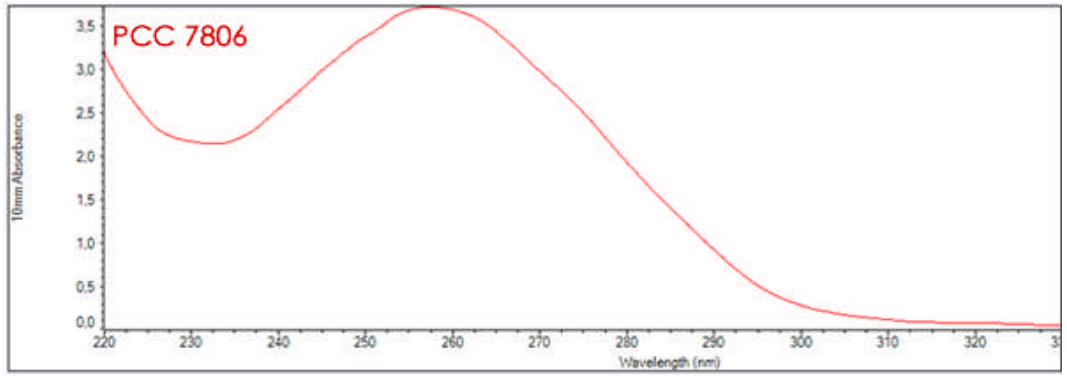
3.22. İSTATİSTİK ANALİZ

Hücre yoğunluğu, klorofil-*a* ve real-time PCR verilerinin istatistik analizi SPSS 22 istatistik yazılımı kullanılarak *t*-test analiz yöntemiyle gerçekleştirildi. Böylelikle farklı stres koşullarında tutulan iki *Microcystis* suşunun gelişiminin ve *mcyB* gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak birbirinden farklı olup olmadıkları ortaya konuldu.

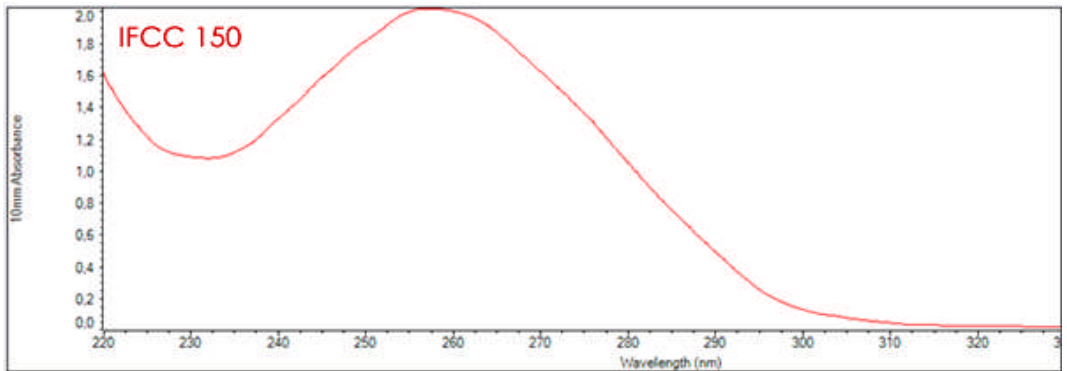
4. BULGULAR

4.1. GENOMİK DNA İZOLASYON SONUÇLARI

M. aeruginosa PCC 7806 ve *M. aeruginosa* IFCC 150 suşlarından elde edilen genomik DNA steril distile su içinde çözüldü. DNA örneklerinin yapılan spektrofotometre ölçümünde 260 nm dalga boyunda pik verdiği görüldü. Grafik alanlarında ikinci bir pik görülmediğinden ve 260/280 oranının 1.8-2.1 değerleri arasında olmasından dolayı izole edilen DNA örneklerinde protein veya RNA kontaminasyonunun bulunmadığı düşünüldü (Şekil 4.1, 4.2, Tablo 4.1).



Şekil 4.1: *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 suşuna ait genomik DNA grafik görüntüsü.

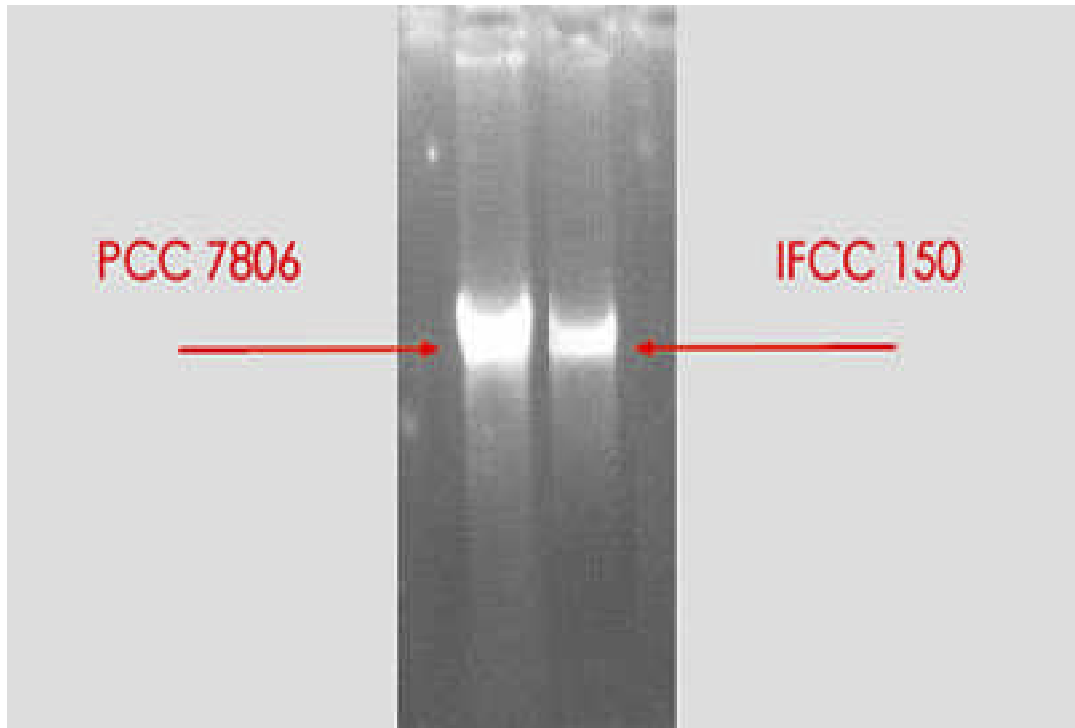


Şekil 4.2: *Microcystis aeruginosa* IFCC 150 suşuna ait genomik DNA grafik görüntüsü.

Tablo 4.1: PCC 7806 ve IFCC 150 suşlarının nükleik asit konsantrasyon değerleri.

Suş Adı	Nükleik asit konsantrasyonu	Birim	A 260	A280	260/280
PCC 7806	184,5	ng/µl	3,689	1,925	1,92
IFCC 150	100,0	ng/µl	2,001	1,049	1,91

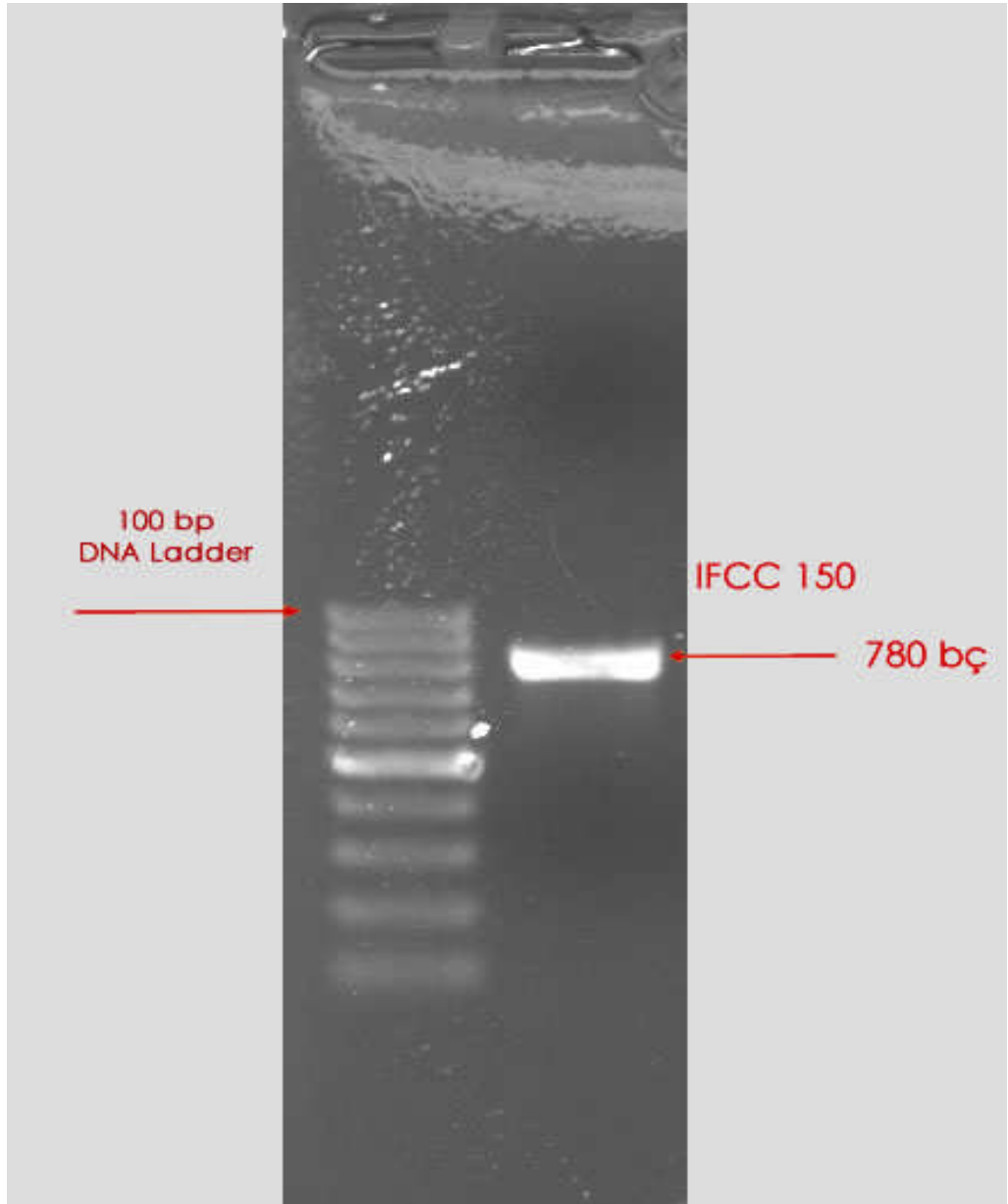
Genomik DNA örnekleri agaroz jele yüklenerek görüntülendi (Şekil 4.3).

**Şekil 4.3:** *M. aeruginosa* PCC 7806 ve IFCC 150 suşlarına ait genomik DNA'nın agaroz jel görüntüsü.

Elde edilen sonuçlar yeterli miktarda ve saflıkta DNA elde edildiğini gösterdi.

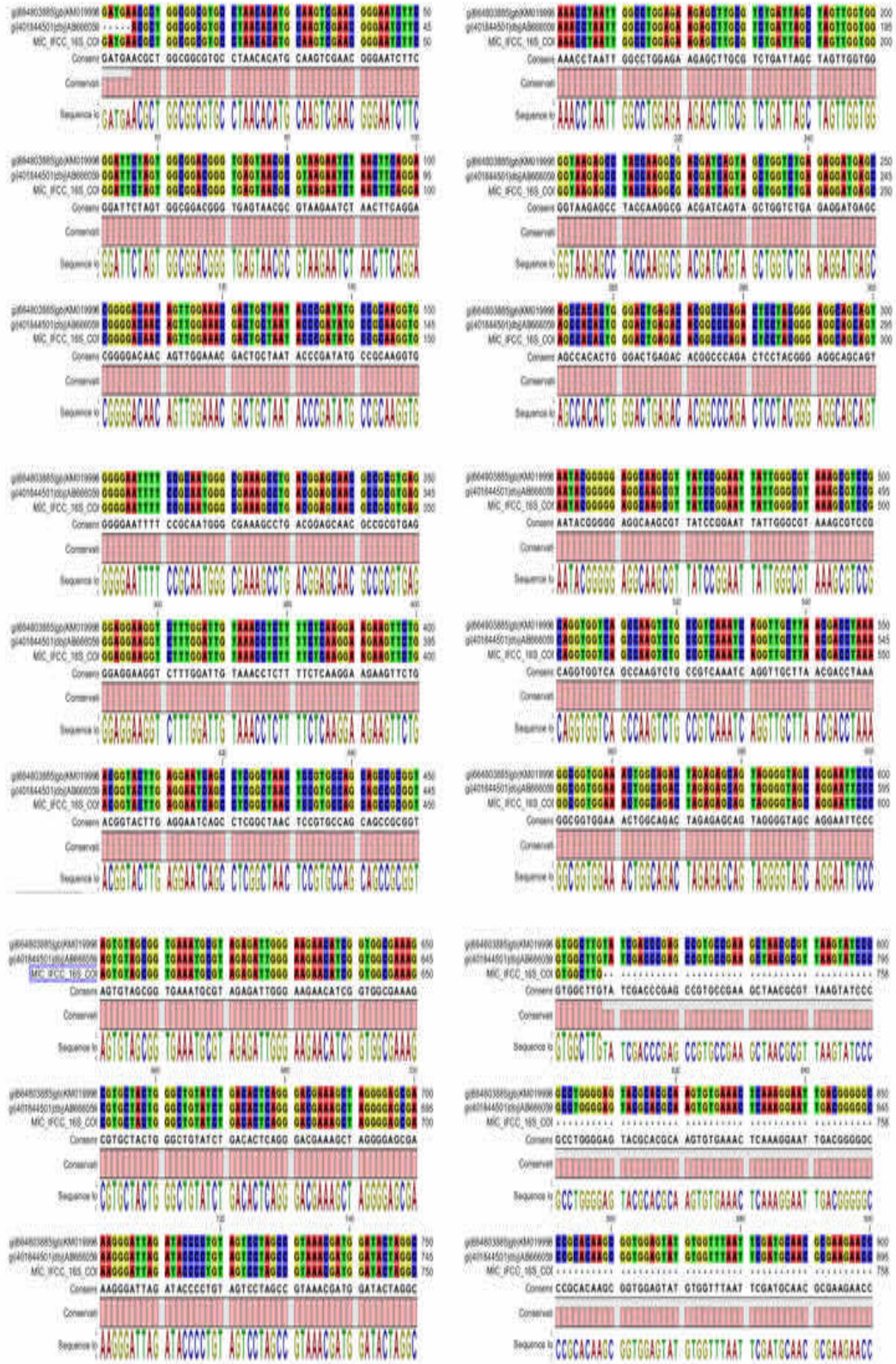
4.2. *MICROCYTIS* SPP. 'NİN PCR YÖNTEMİYLE TANIMLANMASI

İzole edilen *Microcystis* spp. suşunun tür tayini için 16S rRNA gen bölgesi PCR yöntemi ile çoğaltıldı. PCR ürününün agaroz jel elektroforezinde 780 bp uzunluğunda bir bant görüntüsü vermesi beklendi. Elde edilen PCR ürünü jel translüminator kullanılarak UV altında CDD kamerasıyla görüntülendi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: *Microcystis* spp. suşundan izole edilen 16S rRNA geninin agaroz jel görüntüsü.

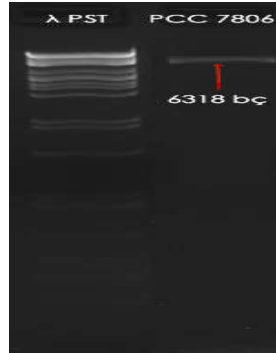
PCR işlemi sonucunda elde edilen ürün BGI (Beijing Genomics Institute) Laboratuvarında Sanger dizileme tekniği kullanılarak çift yönlü olarak dizilendi. NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanı kullanılarak yapılan BLAST analizi sonucunda *Microcystis* spp. suşunun *Microcystis aeruginosa* SAG 17.85 (Genbank no: KM019998.1) ve *Microcystis aeruginosa* VN311 (Genbank no: AB666059.1) suşları ile % 100 uyum gösterdiği görüldü (Şekil 4.5).



Şekil 4.6: *Microcystis* spp. suşu, *Microcystis aeruginosa* SAG 17.85 suşu ve *Microcystis aeruginosa* VN311 suşunun çoklu dizi hizalaması sonuçları.

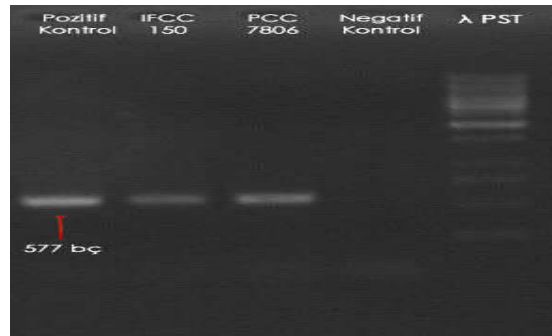
4.3. *MICROCYSTIS AERUGINOSA* SUŞLARININ TOKSİK ÖZELLİĞİNİN BELİRLENMESİ

6318 baz çifti uzunluğundaki *mcyB* geninin tamamı uzun aralıklı PCR yöntemiyle referans suş olarak kullanılan *M. aeruginosa* PCC 7806'dan amplifiye edildi. Amplifiye edilen *mcyB* geni agaroz jel elektroforezi işleminden sonra UV ışık altında CDD kamerasıyla görüntülendi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: *M. aeruginosa* PCC 7806'dan izole edilen *mcyB* geninin agaroz jel görüntüsü. λ PST: Marker.

M. aeruginosa IFCC 150 suşunun *mcyB* toksin geninin tespiti için PCR yöntemiyle *mcyB* geni amplifiye edildi. *M. aeruginosa* PCC 7806 suşundan çoğaltılan *mcyB* geni klasik PCR için pozitif kontrol olarak kullanıldı. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde 577 bç uzunluğunda bir bant görüntüsü vermesi beklendi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: *mcyB* genine ait PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri.

Agaroz jel elektroforezi görüntüleri değerlendirildiğinde herhangi bir non-spesifik bant oluşumu görülmedi. Ayrıca pozitif kontrolün bant boyutuyla diğer ürünlerin bant boyutları arasında farklılığa rastlanmadı. Böylece *M. aeruginosa* IFCC 150 suşundan *mcyB* toksin geninin amplifiye edilmesiyle *M. aeruginosa* IFCC 150 suşunun toksik özellikte olduğunu belirlendi.

4.4. ICP-MS SONUÇLARI

Yapılan ölçümler sonucunda *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunun 2,8 µM EDTA kullanılan serideki hücre içi demir konsantrasyonu 5,05 µg/L olarak tespit edildi. *M. aeruginosa* IFCC 150 suşunun hücre içeriğinde ise her iki EDTA miktarı için de demir tespit edilemedi. Ayrıca her iki suşun hücre dışı ortamlarında da demir tespit edilemedi (Tablo 4.2). ICP-MS cihazı ile yapılan ölçümler sonucunda her iki suşun 16 µM EDTA içeren serideki hücrelerinin hücre içi demir stoklarını tamamen tükettikleri düşünüldü ve bu hücrelerin stok olarak kullanılmasına karar verildi.

Tablo 4.2: Stok kültür ortamlarının ve stok hücre içeriklerinin demir konsantrasyonları.

Suş Adı	EDTA konsantrasyonu	Hücre içi Fe konsantrasyonu	Hücre dışı Fe konsantrasyonu
PCC 7806	2,8 µM	5,05 µg/L	Tespit edilemedi
PCC 7806	16 µM	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi
IFCC 150	2,8 µM	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi
IFCC 150	16 µM	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi

4.5. HÜCRE SAYIMI SONUÇLARI

Stok kültür ortamlarındaki hücre sayıları tespit edildikten sonra deney düzeneklerindeki örneklerin başlangıç hücre yoğunluklarının birbirine yakın olması amacıyla her bir örneğe kaç ml hücre ekleneceği hesaplandı. Bunun için stok hücre yoğunlukları spektrofotometrede 678 nm dalga boyunda ölçüldü ve 180 ml besi ortamı için stok kültür ortamlarından ne kadar hücre alınacağı spektrofotometre değerleri ve hücre sayıları oranlanarak tespit edildi (Tablo 4.3).

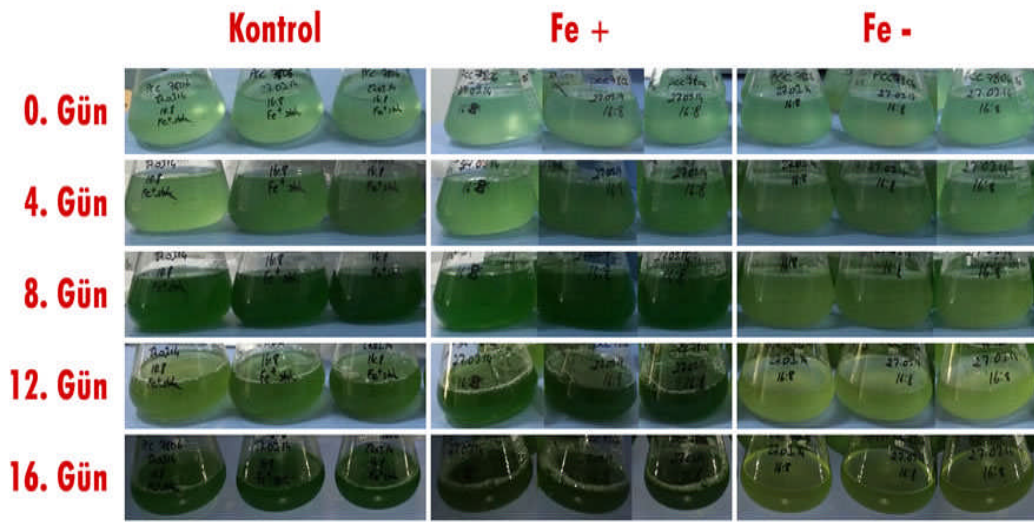
Tablo 4.3: Stok kültür ortamlarından deney düzeneklerindeki örneklere eklenen kültür ortamı miktarları.

Stok Adı	Fe içeriği	Hücre sayısı (hücre.mL ⁻¹)	678 nm	Eklenen kültür ortamı
PCC 7806	+	5420.10 ⁴	1599	7,52 ml
PCC 7806	-	788.10 ⁴	0,344	35 ml
IFCC 150	+	2310.10 ⁴	0,872	14 ml
IFCC 150	-	502.10 ⁴	0,261	46 ml

4.6. *MICROCYSTIS* SUŞLARININ GELİŞİMLERİNİN İZLENMESİ

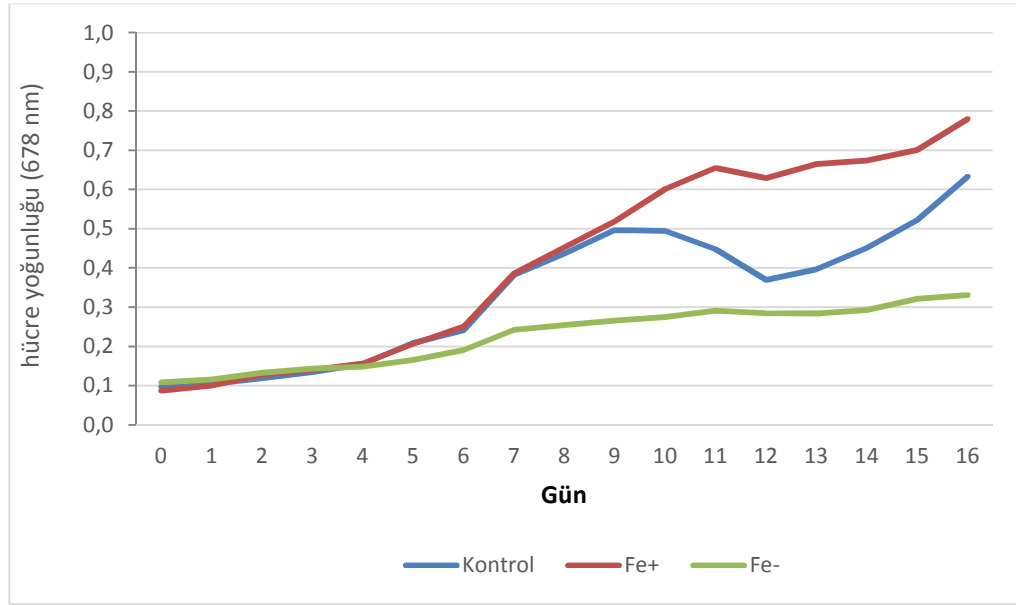
4.6.1. 16:8 Aydınlık/Karanlık Şartlarda *Microcystis* Hücrelerinin Gelişimi

M. aeruginosa PCC 7806 ve *M. aeruginosa* IFCC 150 hücreleri yeni ortamlarına eklendikten sonra 16:8 aydınlık/karanlık şartlarda tutulan 1. serideki örnekler 16 gün boyunca takip edilerek kültür ortamlarının fotoğrafları çekildi, spektrofotometrede 678 nm dalda boyunda hücre yoğunluğu ölçümleri yapıldı ve 0, 4, 8, 12 ve 16. günlerde filtre edilen örneklerden klorofil-*a* analizleri gerçekleştirildi.



Şekil 4.9: 1. serideki *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunun kontrol, Fe+ ve Fe - örneklerinin kültür ortamlarındaki görüntüleri.

16:8 aydınlık/karanlık şartlarda tutulan 1. serideki *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunun gelişimine bakıldığında kontrol örneklerinin 12. güne kadar hızlı bir gelişim gösterdiği ancak 12. günde hücrelerin gelişiminin yavaşladığı gözlemlendi. Kontrol örneklerinin 16. günde hücre gelişiminin yeniden hızlandığı görüldü. Demir rezervleri tüketilip demir içeren kültür ortamına eklenen örneklerin (Fe+), 0. günden 16. güne kadar olan kültür sürecinde sürekli bir gelişim içinde olduğu gözlemlendi. Demir stokları tüketilip demirsiz ortama eklenen örneklerin (Fe-), 16 gün boyunca kültür ortamları takip edildiğinde gelişim süreçlerinin yavaş olduğu özellikle 12 ve 16. günlerde kültür ortam renklerinin sarı renge dönmesinden dolayı hücrelerin lizise uğramaya başladığı düşünüldü.

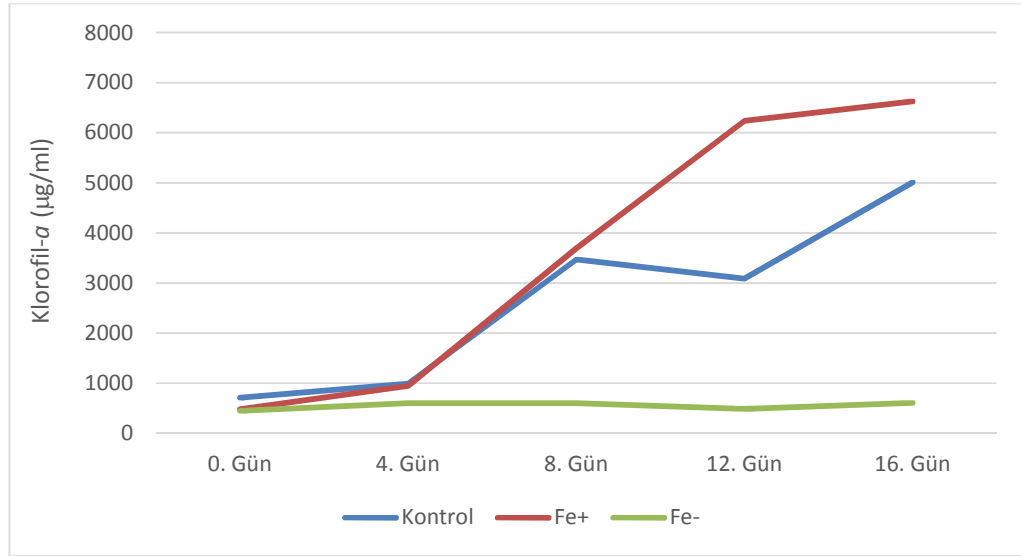


Şekil 4.10: 1. serideki *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunun kontrol, Fe+ ve Fe - örneklerinin hücre yoğunluklarının zamana bağlı değişimi.

Tablo 4.4: 1. serideki *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunun kontrol, Fe+ ve Fe - örneklerinin hücre yoğunluğu sonuçlarının *t*-test *p* değerleri

678 nm	0.Gün	4.Gün	8.Gün	12.Gün	16.Gün
Kontrol / Fe+	0,034	0,822	0,360	0,011	0,191
Kontrol / Fe -	0,003	0,161	0,002	0,049	0,049
Fe+ / Fe -	0,012	0,227	0,001	0,006	0,026

Yapılan hücre yoğunluğu ölçümleri sonucunda 16:8 aydınlık/karanlık şartlarda tutulan 1. serideki *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunun gelişimine bakıldığında kontrol örneğinin, demir içermeyen ortamda (Fe-) bulunan hücrelere oranla genel olarak daha hızlı geliştiği 4. günde ise gelişimleri arasında fark olmadığı ($p > 0,05$) gözlemlendi. Demir rezervleri tüketilip demir içeren kültür ortamına eklenen örneğin (Fe+), demirsiz ortama eklenen örnekten (Fe-) daha hızlı geliştiği sadece 4. günde gelişimleri arasında anlamlı bir fark olmadığı ($p > 0,05$) gözlemlendi. (Fe+) örneği, kontrol örneği ile karşılaştırıldığında iki suşun gelişimleri açısından 0. ve 12. gün ($p < 0,05$) dışında anlamlı bir farka rastlanmadı. Genel olarak demir stresi altındaki (Fe-) örneğinin gelişiminin diğer örneklerden daha yavaş olduğu belirlendi.

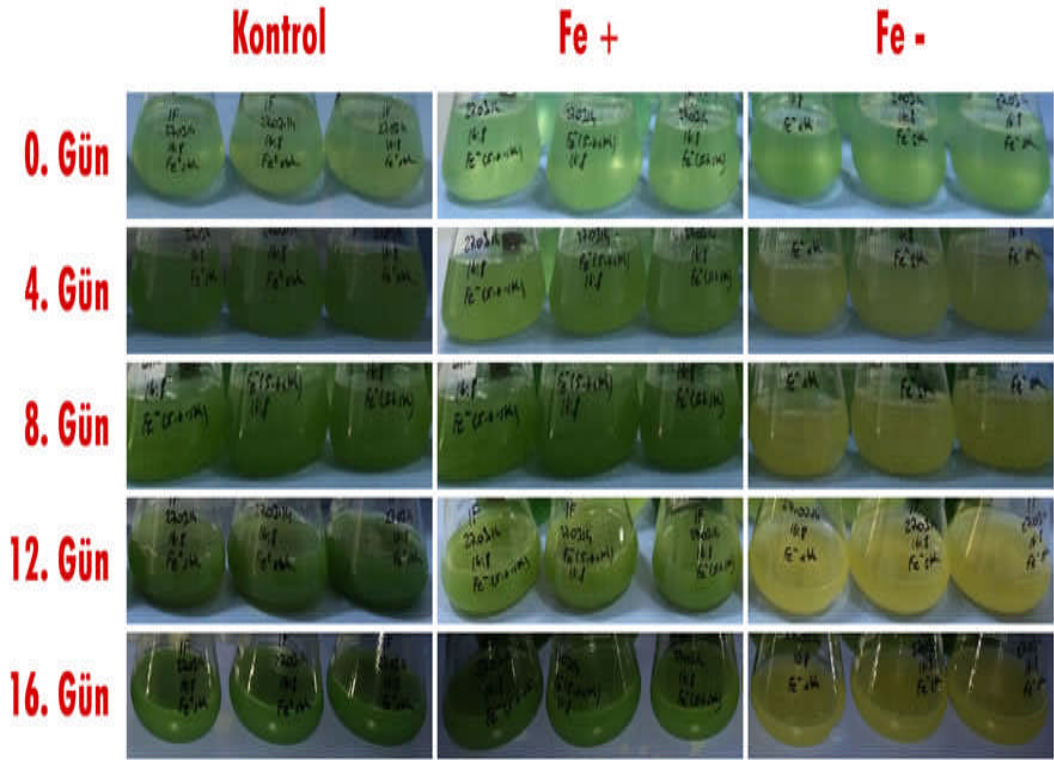


Şekil 4.11: 1. serideki *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunun kontrol, Fe+ ve Fe – örneklerinin klorofil-a sonuçlarının zamana bağlı değişimi.

Tablo 4.5: 1. serideki *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunun kontrol, Fe+ ve Fe – örneklerinin klorofil-a sonuçlarının *t*-test *p* değerleri

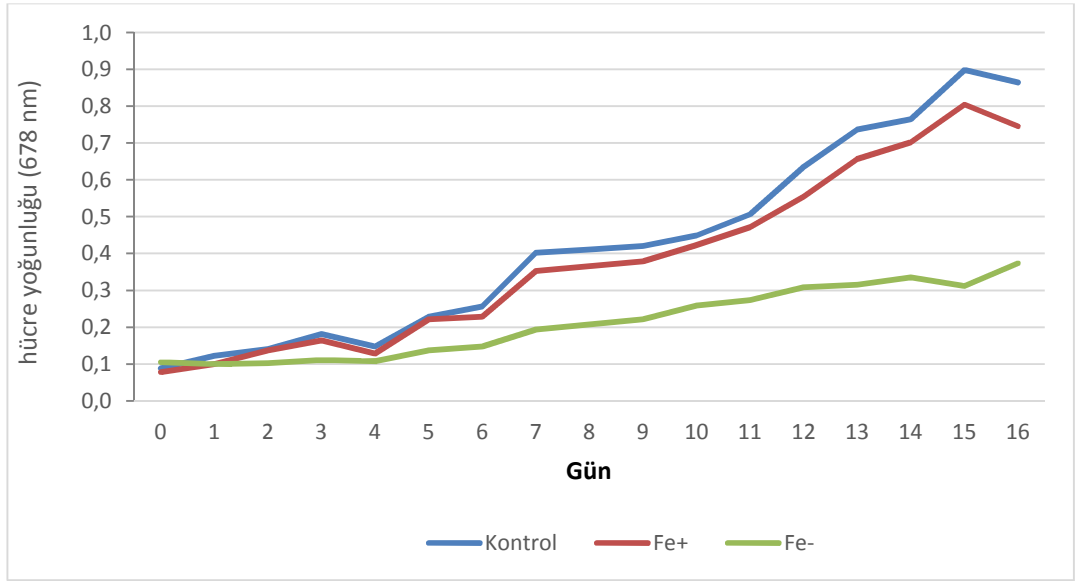
Kl-a	0.Gün	4.Gün	8.Gün	12.Gün	16.Gün
Kontrol / Fe+	0,035	0,638	0,131	0,003	0,157
Kontrol / Fe -	0,026	0,017	0,001	0,006	0,019
Fe+ / Fe -	0,01	0,012	0,001	0,000	0,007

Yapılan kl-a ölçümleri sonucunda 16:8 aydınlık/karanlık şartlarda tutulan 1. serideki gelişimi takip edilen *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunun kontrol örneğinin demir içermeyen ortamda bulunan (Fe-) hücrelere oranla daha hızlı geliştiği gözlemlendi. Demir rezervleri tüketilip demir içeren kültür ortamına eklenen örneğin (Fe+), demirsiz ortama eklenen örnekten (Fe-) daha hızlı geliştiği gözlemlenirken, bu örnek kontrol örneği ile karşılaştırıldığında iki suşun gelişimlerinin paralel gittiği yalnızca 0. ve 12. günlerde gelişimlerinin farklı olduğu ($p < 0,05$) görüldü. Demir içermeyen ortamda bulunan Fe- örneğinin gelişiminin diğer örneklerle oranla oldukça yavaş olduğu görüldü.



Şekil 4.12: 1. serideki *M. aeruginosa* IFCC 150 suşunun kontrol, Fe+ ve Fe - örneklerinin kültür ortamlarındaki görüntüleri.

16:8 aydınlık/karanlık şartlarda tutulan 1. serideki *M. aeruginosa* IFCC 150 suşunun gelişimine bakıldığında kontrol örneklerinin 16 gün boyunca hızlı bir gelişim gösterdiği gözlemlendi. Demir rezervleri tüketilip demir içeren kültür ortamına eklenen örneklerin (Fe+), 0. günden 12. güne kadar olan kültür sürecinde hücrelerin geliştiği ancak 12. günde hücre gelişimlerinde bir yavaşlama meydana geldiği gözlemlendi. Fe+ örneklerinin 16. günde hücre gelişiminin yeniden hızlandığı görüldü. Demir stokları tüketilip demirsiz ortama eklenen örneklerin (Fe-), kültür ortamları takip edildiğinde gelişimlerinin yavaş olduğu özellikle 12 ve 16. günlerde kültür ortam renklerinin sarı renge dönmesinden dolayı hücrelerin pigmentlerini büyük oranda kaybettiği ve bu nedenle gelişimlerinin durduğu düşünüldü.

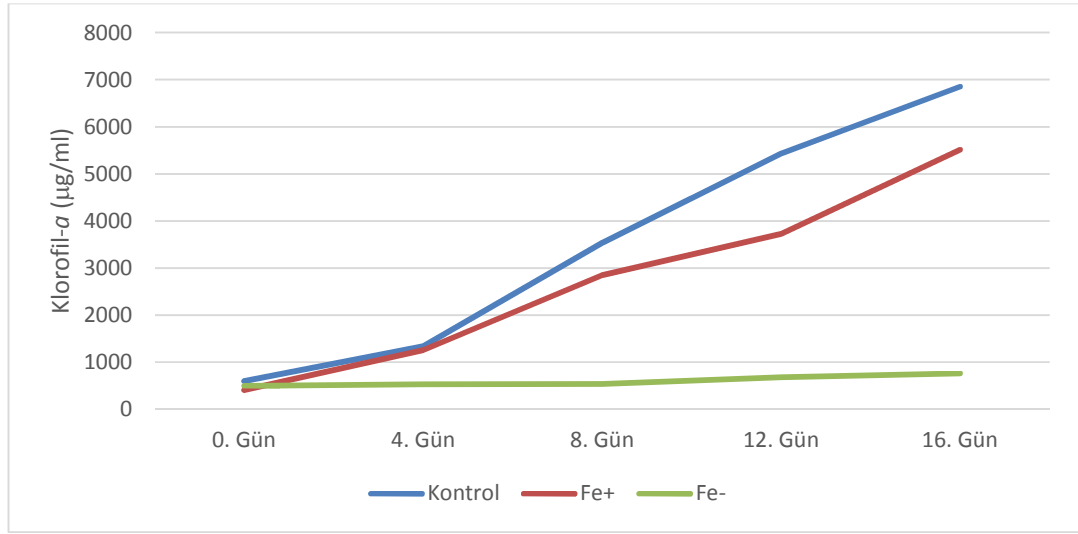


Şekil 4.13: 1. serideki *M. aeruginosa* IFCC 150 suşunun kontrol, Fe+ ve Fe - örneklerinin hücre yoğunluklarının zamana bağlı değişimi.

Tablo 4.6: 1. serideki *M. aeruginosa* IFCC 150 suşunun kontrol, Fe+ ve Fe - örneklerinin hücre yoğunluğu sonuçlarının *t*-test *p* değerleri.

678 nm	0.Gün	4.Gün	8.Gün	12.Gün	16.Gün
Kontrol / Fe+	0,300	0,106	0,176	0,166	0,205
Kontrol / Fe -	0,017	0,006	0,005	0,018	0,008
Fe+ / Fe -	0,044	0,034	0,004	0,002	0,009

Tez çalışmasında spektrofotometrede 678 nm dalga boyunda yapılan hücre yoğunluğu ölçümleri sonucunda 16:8 aydınlık/karanlık şartlarda tutulan 1. serideki *M. aeruginosa* IFCC 150 suşunun kontrol örneğinin, demir içermeyen ortamda (Fe-) bulunan hücrelere oranla anlamlı bir şekilde daha hızlı geliştiği ($p < 0,05$) gözlemlendi. Demir rezervleri tüketilip demir içeren kültür ortamına eklenen örneğin (Fe+), demirsiz ortama eklenen örnekten (Fe-) kültür süreci boyunca daha iyi bir gelişim gösterdiği ($p < 0,05$) gözlemlendi. Fe+ örneği, kontrol örneği ile karşılaştırıldığında iki suşun gelişimleri açısından 0. gün ($p < 0,05$) dışında anlamlı bir farka rastlanmadı ve gelişimlerinin paralel olduğu görüldü. Demir içermeyen ortamda tutulan Fe- örneğinin gelişiminin genel olarak diğer örneklerle oranla oldukça yavaş olduğu belirlendi.



Şekil 4.14: 1. serideki *M. aeruginosa* IFCC 150 suşunun kontrol, Fe+ ve Fe – örneklerinin klorofil-a sonuçlarının zamana bağlı değişimi.

Tablo 4.7: 1. serideki *M. aeruginosa* IFCC 150 suşunun kontrol, Fe+ ve Fe – örneklerinin klorofil-a sonuçlarının *t*-test *p* değerleri.

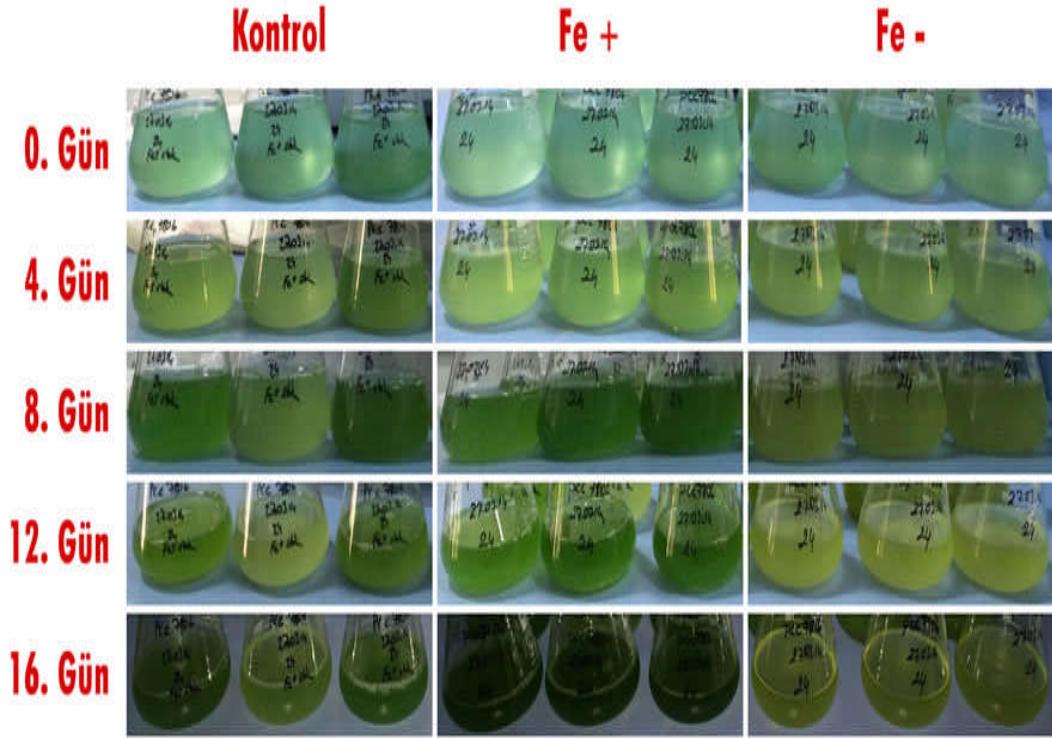
Kl-a	0.Gün	4.Gün	8.Gün	12.Gün	16.Gün
Kontrol / Fe+	0,119	0,585	0,117	0,083	0,128
Kontrol / Fe -	0,200	0,015	0,004	0,005	0,004
Fe+ / Fe -	0,069	0,003	0,001	0,004	0,002

Tez çalışmasında yapılan kl-a analizleri sonucunda 16:8 aydınlık/karanlık şartlarda tutulan 1. serideki *M. aeruginosa* IFCC 150 suşunun gelişimi takip edildiğinde kontrol örneğinin demir içermeyen ortamda (Fe-) bulunan hücrelere oranla 0. gün dışında ($p > 0,05$) daha hızlı geliştiği gözlemlendi. Demir rezervleri tüketilip demir içeren kültür ortamına eklenen örneğin (Fe+), demirsiz ortama eklenen örnekten (Fe-) daha hızlı geliştiği gözlemlendi. (Fe+) örneği kontrol örneği ile karşılaştırıldığında iki suşun gelişimlerinin paralel gittiği görüldü ve iki örnek arasında anlamlı bir farka rastlanmadı ($p > 0,05$). Demir içermeyen ortamda bulunan Fe- örneğinin gelişiminin diğer örneklerden çok daha yavaş olduğu görüldü.

4.6.2. 24 Saat Aydınlık Koşulda *Microcystis* Hücrelerinin Gelişimi

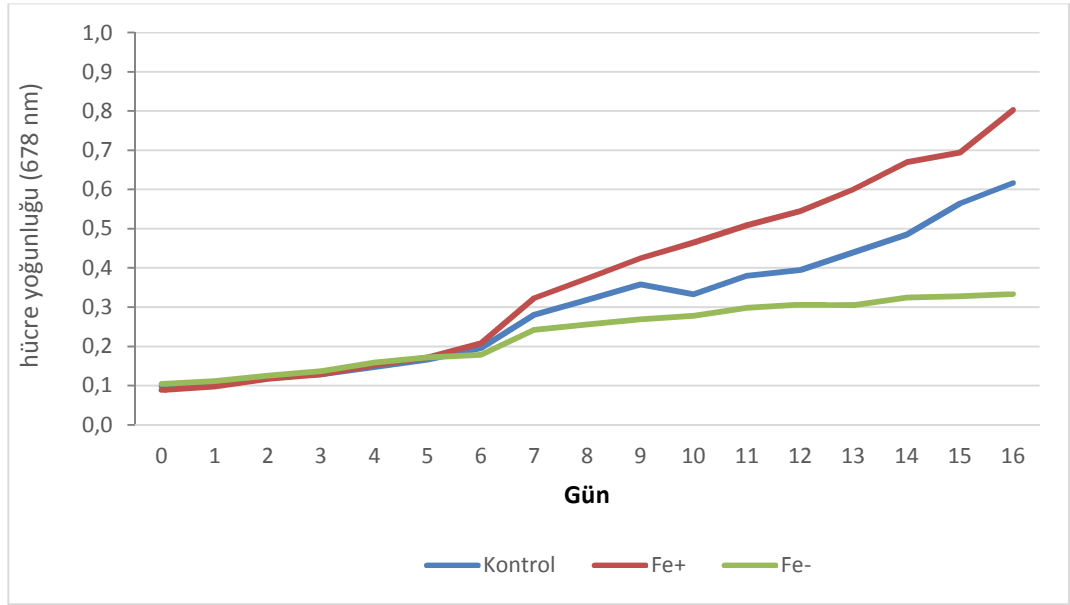
2. seride *M. aeruginosa* PCC 7806 ve *M. aeruginosa* IFCC 150 hücreleri 24 saat aydınlık koşulda 16 gün boyunca takip edilerek kültür ortamlarının fotoğrafları çekildi,

spektrofotometrede 678 nm dalda boyunda hücre yoğunluğu ölçümleri yapıldı ve 0, 4, 8, 12 ve 16. günlerde kl-a analizleri gerçekleştirildi.



Şekil 4.15: 2. serideki *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunun kontrol, Fe+ ve Fe - örneklerinin kültür ortamlarındaki görüntüleri.

24 saat aydınlık koşulda tutulan 2. serideki *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunun gelişimine bakıldığında kontrol örneklerinin 16. güne kadar gelişim içinde olduğu ancak 1. serideki hücrelerin gelişimleriyle karşılaştırıldığında 2. serideki örneklerin renklerinin daha açık renkte olduğu gözlemlendi. Bu nedenle 2. serideki kontrol örneklerinin gelişimlerinin 1. serideki örneklere oranla daha yavaş olduğu düşünüldü. Demir rezervleri tüketilip demir içeren kültür ortamına eklenen örneklerin (Fe+), 0. günden 16. güne kadar olan kültür sürecinde sürekli bir gelişim içinde olduğu gözlemlendi. 2. serideki (Fe+) örneklerinin de kontrol örneklerinde olduğu gibi 1. serideki örneklere oranla daha yavaş bir gelişim gösterdiği gözlemlendi. Demir stokları tüketilip demirsiz ortama eklenen örneklerin (Fe-), 16 gün boyunca kültür ortamları takip edildiğinde gelişim süreçlerinin yavaş olduğu renklerinin sarıya dönmeye başlamasından dolayı gelişimlerinin durma noktasına geldiği düşünüldü.

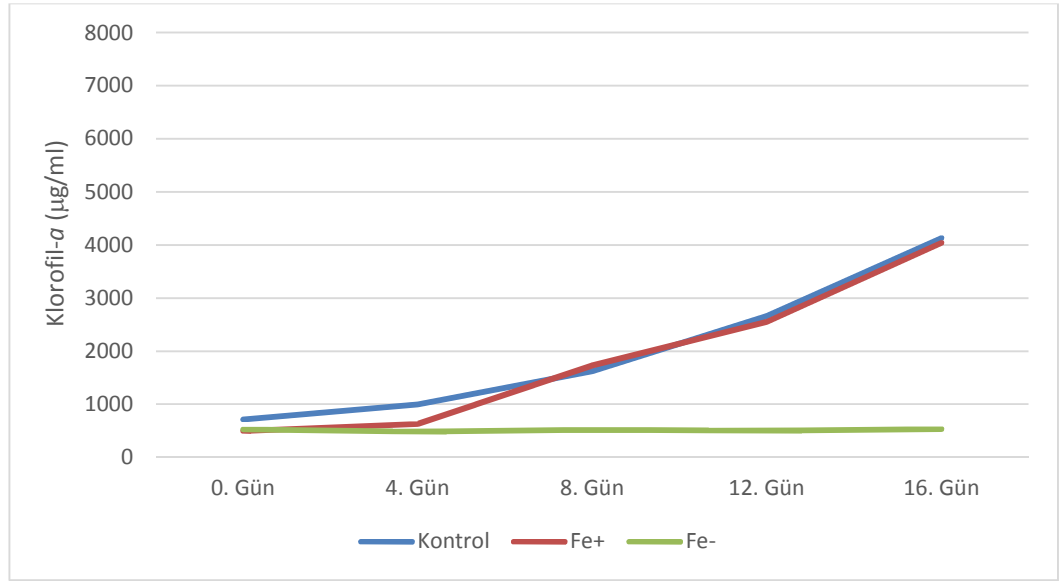


Şekil 4.16: 2. serideki *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunun kontrol, Fe+ ve Fe - örneklerinin hücre yoğunluklarının zamana bağlı değişimi.

Tablo 4.8: *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunun kontrol, Fe+ ve Fe - örneklerinin hücre yoğunluğu sonuçlarının *t*-test *p* değerleri

678 nm	0.Gün	4.Gün	8.Gün	12.Gün	16.Gün
Kontrol / Fe+	0,010	0,577	0,194	0,008	0,133
Kontrol / Fe -	0,077	0,130	0,094	0,061	0,039
Fe+ / Fe -	0,008	0,417	0,011	0,001	0,003

Tez çalışmasında yapılan hücre yoğunluğu ölçümleri sonucunda 24 saat aydınlık koşulunda tutulan 2. serideki *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunun gelişimine bakıldığında kontrol örneğinin, demir içermeyen ortamda (Fe-) bulunan hücrelerle gelişimlerinin birbirlerine yakın olduğu sadece 16.günde büyümelerinde anlamlı bir fark olduğu ($p < 0,05$) görüldü. Demir rezervleri tüketilip demir içeren kültür ortamına eklenen örneğin (Fe+), demirsiz ortama eklenen örnekten (Fe-) daha hızlı geliştiği sadece 4. günde gelişimleri açısından anlamlı bir fark olmadığı ($p > 0,05$) gözlemlendi. Fe+ örneği, kontrol örneği ile büyüme eğrisi açısından karşılaştırıldığında, Fe+ örneğinin kontrol örneğine göre daha iyi bir gelişim gösterdiği görüldü. Genel olarak demir içermeyen ortamda bulunan Fe- örneğinin gelişiminin diğer örneklerle oranla 8. günden itibaren daha yavaş olduğu belirlendi.

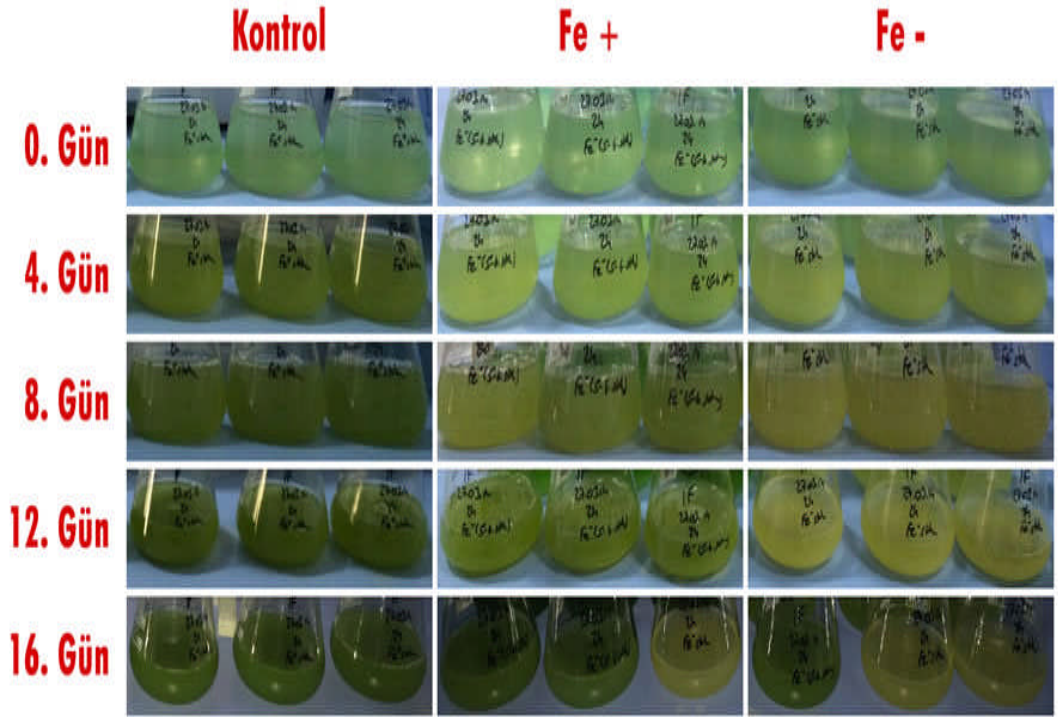


Şekil 4.17: 2. serideki *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunun kontrol, Fe+ ve Fe – örneklerinin klorofil-a sonuçlarının zamana bağlı değişimi.

Tablo 4.9: 2. serideki *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunun kontrol, Fe+ ve Fe – örneklerinin klorofil-a sonuçlarının t-test p değerleri

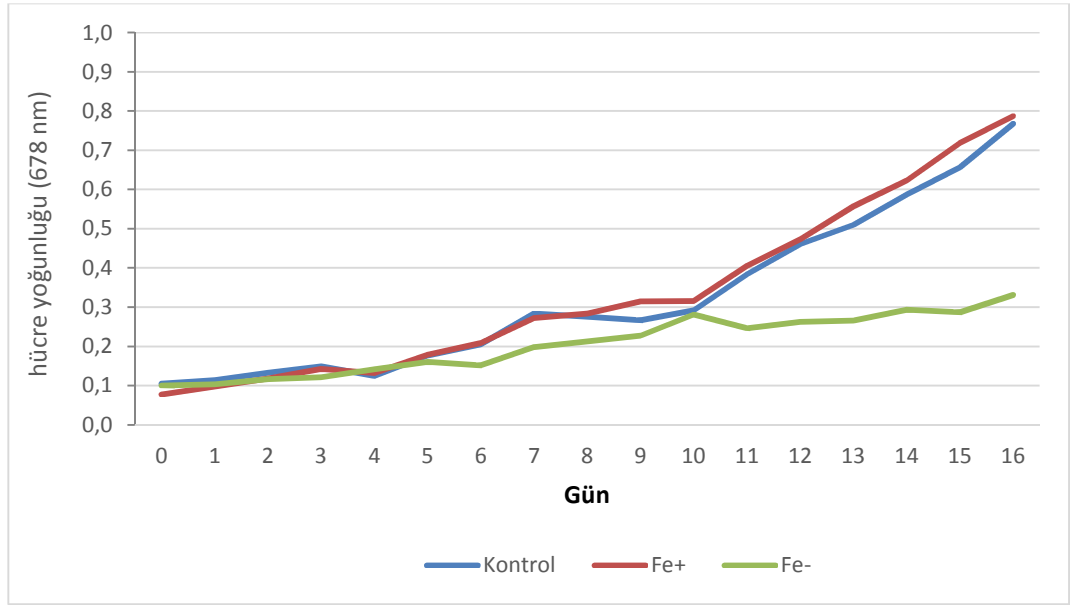
Kl-a	0.Gün	4.Gün	8.Gün	12.Gün	16.Gün
Kontrol / Fe+	0,042	0,013	0,298	0,555	0,886
Kontrol / Fe -	0,004	0,014	0,006	0,003	0,007
Fe+ / Fe -	0,533	0,028	0,000	0,001	0,010

Yapılan kl-a analizleri sonucunda 24 saat aydınlık koşulda 2. seride gelişimi takip edilen *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunun kontrol örneğinin demir içermeyen ortamda (Fe-) bulunan hücrelere oranla anlamlı bir şekilde daha hızlı geliştiği gözlemlendi ($p < 0,05$). Demir rezervleri tüketilip demir içeren kültür ortamına eklenen örneğin (Fe+), demirsiz ortama eklenen örnekten (Fe-) 0. gün dışında ($p > 0,5$) daha hızlı geliştiği gözlemlendi. Fe+ örneği kontrol örneği ile karşılaştırıldığında 0 ve 4. gün dışında iki suşun gelişimleri açısından anlamlı bir farka rastlanmadı ($p > 0,05$) ve gelişimlerinin paralel olduğu görüldü. Demir içermeyen ortam şartlarındaki Fe- örneğinin gelişiminin diğer örneklerden daha yavaş olduğu görüldü ve gelişimlerinin durduğu düşünüldü.



Şekil 4.18: 2. serideki *M. aeruginosa* IFCC 150 suşunun kontrol, Fe+ ve Fe - örneklerinin kültür ortamlarındaki görüntüleri.

24 saat aydınlık koşulda tutulan 2. serideki *M. aeruginosa* IFCC 150 suşunun kültür ortamındaki gelişimine bakıldığında kontrol örneklerinin 16 gün boyunca gelişim gösterdiği gözlemlendi. Ancak bu gelişim sürecinin 1. serideki *M. aeruginosa* IFCC 150 suşunun kontrol örnekleri ile karşılaştırıldığında daha yavaş olduğu görüldü. Demir rezervleri tüketilip demir içeren kültür ortamına eklenen örneklerin (Fe+), 0. günden 16. güne kadar yavaş bir gelişim içinde olduğu ve 1. Serideki (Fe+) örnekleri ile karşılaştırıldıklarında renklerinin daha açık yeşil olmasından dolayı gelişimlerinin daha yavaş olduğu düşünüldü. Demir stokları tüketilip demirsiz ortama eklenen örneklerin (Fe-), kültür ortamları takip edildiğinde gelişimlerinin yavaş olduğu kültür ortamındaki renklerinin hücre pigmentlerini büyük oranda kaybettiğine işaret ettiği ve bu nedenle gelişimlerinin durduğu düşünüldü.

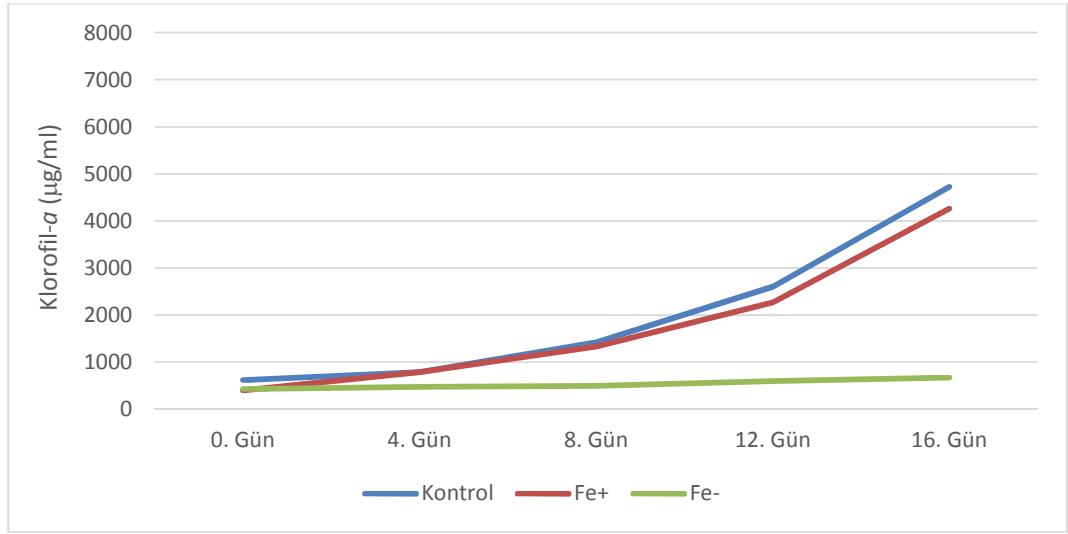


Şekil 4.19: 2. serideki *M. aeruginosa* IFCC 150 suşunun kontrol, Fe+ ve Fe - örneklerinin hücre yoğunluklarının zamana bağlı değişimi.

Tablo 4.10: 2. serideki *M. aeruginosa* IFCC 150 suşunun kontrol, Fe+ ve Fe - örneklerinin hücre yoğunluğu sonuçlarının *t*-test *p* değerleri

678 nm	0.Gün	4.Gün	8.Gün	12.Gün	16.Gün
Kontrol / Fe+	0,001	0,379	0,273	0,536	0,327
Kontrol / Fe -	0,184	0,097	0,021	0,010	0,014
Fe+ / Fe -	0,004	0,165	0,003	0,018	0,011

Yapılan hücre yoğunluğu ölçümleri sonucunda 24 saat aydınlık koşulunda tutulan 2. serideki *M. aeruginosa* IFCC 150 suşunun gelişimine bakıldığında kontrol örneğinin, demir içermeyen ortamda (Fe-) bulunan hücrelerle gelişimleri karşılaştırıldığında 8, 12 ve 16.günlerdeki gelişimlerinde anlamlı bir fark olduğu ($p < 0,05$) görüldü. Demir rezervleri tüketilip demir içeren kültür ortamına eklenen örneğin (Fe+), demirsiz ortama eklenen örnekten (Fe-) daha hızlı geliştiği sadece 4. günde gelişimleri açısından anlamlı bir fark olmadığı ($p > 0,05$) gözlemlendi. Fe+ örneği, kontrol örneği ile karşılaştırıldığında hücre gelişimlerinin paralel olduğu görüldü. Genel olarak demir yokluğu stresi altındaki (Fe-) örneğinin gelişiminin diğer örneklere oranla 4. günden itibaren daha yavaş olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.20: 2. serideki *M. aeruginosa* IFCC 150 suşunun kontrol, Fe+ ve Fe – örneklerinin klorofil-a sonuçlarının zamana bağlı değişimi.

Tablo 4.11: 2. serideki *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunun kontrol, Fe+ ve Fe – örneklerinin klorofil-a sonuçlarının t-test p değerleri

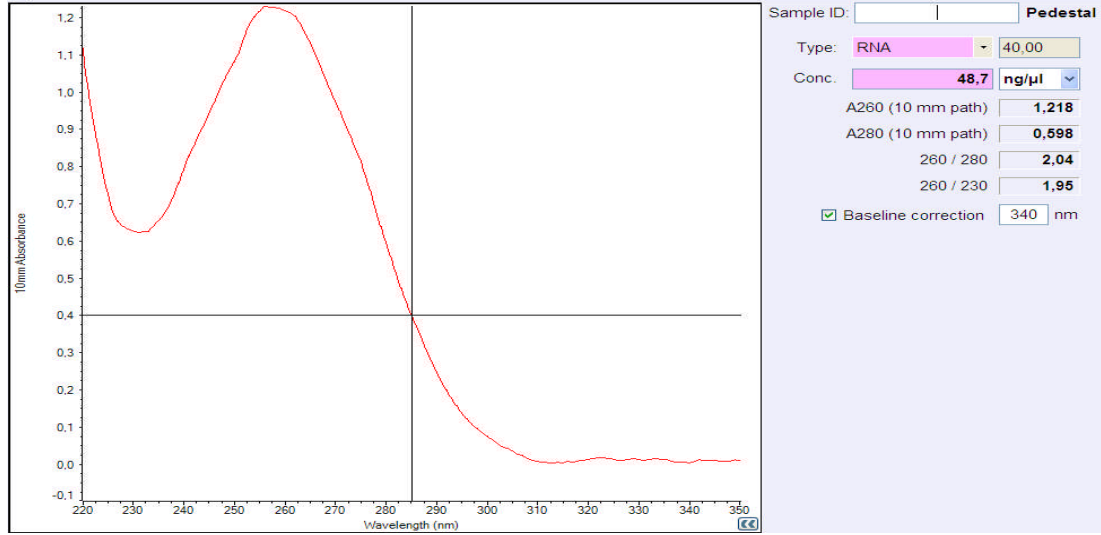
Kl-a	0.Gün	4.Gün	8.Gün	12.Gün	16.Gün
Kontrol / Fe+	0,001	0,942	0,526	0,053	0,189
Kontrol / Fe -	0,003	0,004	0,006	0,010	0,001
Fe+ / Fe -	0,086	0,008	0,005	0,007	0,010

Yapılan analizler sonucunda 24 saat aydınlık koşulda gelişimi takip edilen *M. aeruginosa* IFCC 150 suşunun kontrol örneğinin demir içermeyen ortamda (Fe-) bulunan hücrelere oranla daha hızlı geliştiği gözlemlendi. Demir rezervleri tüketilip demir içeren kültür ortamına eklenen örneğin (Fe+), demirsiz ortama eklenen örnekten (Fe-) daha hızlı geliştiği gözlemlenirken bu örnek kontrol örneği ile karşılaştırıldığında iki suşun gelişimleri açısından 0. gün ($p < 0,05$) dışında anlamlı bir farka rastlanmadı ve gelişimlerinin paralel olduğu görüldü. Demir yokluğu stresi altındaki Fe- örneğinin gelişiminin diğer örneklerden daha yavaş olduğu görüldü.

4.7. TOTAL RNA İZOLASYON SONUÇLARI

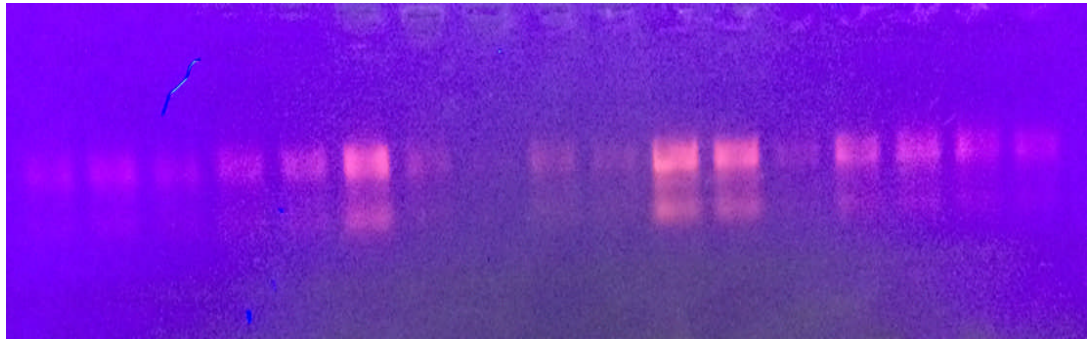
M. aeruginosa PCC 7806 ve *M. aeruginosa* IFCC 150 suşlarından elde edilen RNA'ların nano-drop spektrofotometrede 260-280 nm dalga boylarındaki emilim

(absorbsiyon) değerleri ve konsantrasyonları ölçüldü. A260/A280 oranının ~2 değerinde olması RNA'nın saf olduğunu göstermektedir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21: *M. aeruginosa* PCC 7806 suşundan elde edilen RNA'nın grafik görüntüsü.

Agaroz jele yüklenen total RNA izolasyon örnekleri 90 volt ve 70 mA akımda yaklaşık 30 dakika yürütüldü. Bu işlemin ardından jel UV altında görüntülendi (Şekil 4.22).



Şekil 4.22: *M. aeruginosa* PCC 7806 suşuna ait total RNA'nın agaroz jel görüntüsü.

İzole edilen tüm RNA örnekleri agaroz jelde yürütölüp görüntülendi. Görüntü alınamayan örnekler yeniden izole edildi. Elde edilen sonuçlar Gerçek Zamanlı PCR için yeterli miktarda ve kalitede RNA izole edildiğini gösterdi.

Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen) cihazı ve Qubit RNA Assay ticari kiti kullanılarak izole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları florometrik yöntemle ölçüldü. Gerçek zamanlı PCR işlemi için cDNA sentezi esnasında total RNA izolasyon örneklerinin konsantrasyonlarının eşitlenmesi gereklidir. RNA örneklerinin miktar tayinindeki hata

payını azaltmak için spektrofotometrik ve florometrik yöntemlerle elde edilen ölçüm sonuçlarının ortalaması alınarak RNA örnekleri seyreltildi (Tablo 4.12). Ardından PCR cihazında cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Tablo 4.12: 1. Serideki *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 suşuna ait örneklerin 16. gün total RNA miktarları

Örnek No	Nano	Qubit	Ortalama	RNA	Su
1	105,1	83	94,05	2,66	6,74
2	46,4	33	39,7	6,30	3,10
3	57,7	40	48,85	5,12	4,28
4	92,7	88,5	90,6	2,76	6,64
5	99	87	93	2,69	6,71
6	34,4	43,5	38,95	6,42	2,98
7	44	33	38,5	6,49	2,91
8	43	32	37,5	6,67	2,73
9	52,5	41,5	47	5,32	4,08
10	163	141	152	1,64	7,76
11	113	108	110,5	2,26	7,14
12	133	126	129,5	1,93	7,47
13	79,4	38,5	58,95	4,24	5,16
14	96,8	96	96,4	2,59	6,81
15	145,8	96	120,9	2,07	7,33
16	47	26	36,5	6,85	2,55
17	32,4	21,6	27	9,26	0,14
18	44,5	30	37,25	6,71	2,69

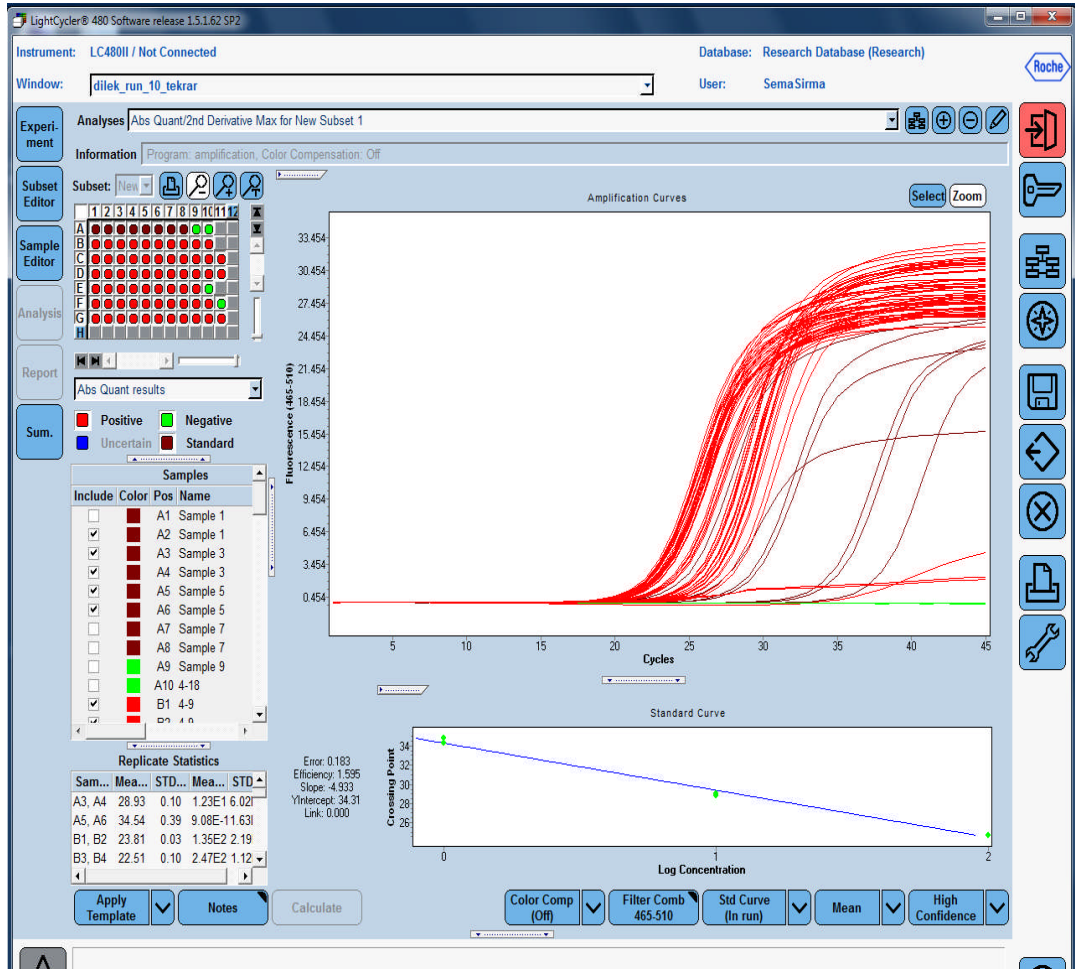
4.8. GERÇEK ZAMANLI PCR SONUÇLARI

Gerçek zamanlı PCR yöntemiyle amplifiye edilen RpoC1 housekeeping geni ve suşların *mcyB* gen bölgeleri agaroz jel elektroforezi işleminden sonra UV ışık altında CDD kamerasıyla görüntülendi (Şekil 4.23).



Şekil 4.23: *M. aeruginosa* PCC 7806 suşuna ait RpoC1 ve *mcyB* genlerinin gerçek zamanlı PCR ürünleri

Deney çalışmasında kullanılan Rpoc1 (internal kontrol) ve *mcyB* geni iki tekrarlı olarak çalışıldı. Ekspresyon oranları hesaplanırken bu iki değerin ortalaması alındı (şekil 4.24). Ardından *mcyB* geninin ekspresyon oranı, houskeeping (her dokuda aynı düzeyde anlatıma giren) genin ekspresyonuna oranlandı ve sonuçlar bu orana göre değerlendirildi.

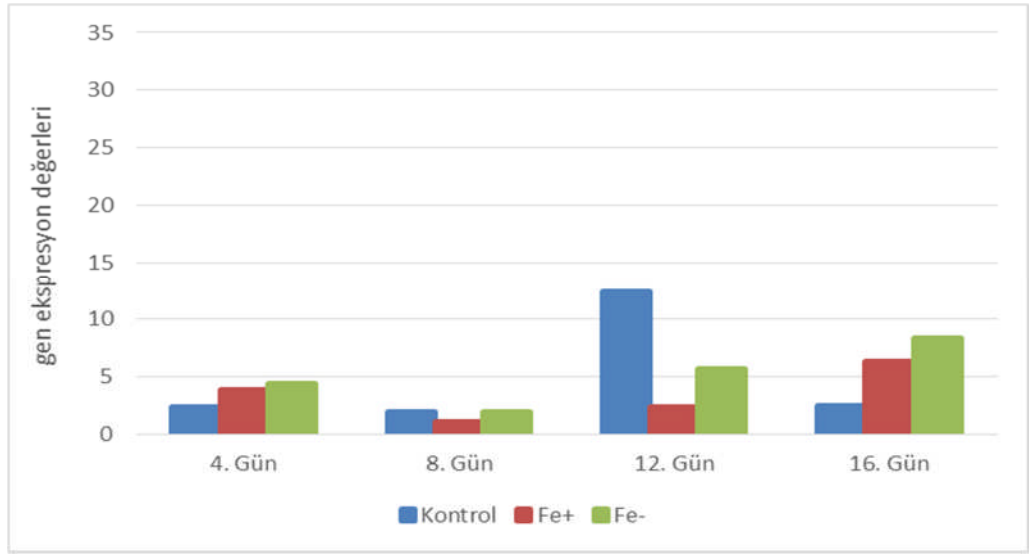


Şekil 4.24: Rpoc1 ve *mcyB* genlerinin ekspresyon dereceleri

4.9. GEN ANLATIM SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

4.9.1. 16:8 Aydınlık/Karanlık Koşuldaki Örneklerin *mcyB* Gen Ekspresyonları

M. aeruginosa PCC 7806 ve *M. aeruginosa* IFCC 150 hücreleri yeni ortamlarına eklendikten sonra 16:8 Aydınlık/karanlık koşulda bulunan 1. serideki örneklerden 4, 8, 12 ve 16. günlerde alınan örneklerden Gerçek Zamanlı PCR analizi gerçekleştirildi.

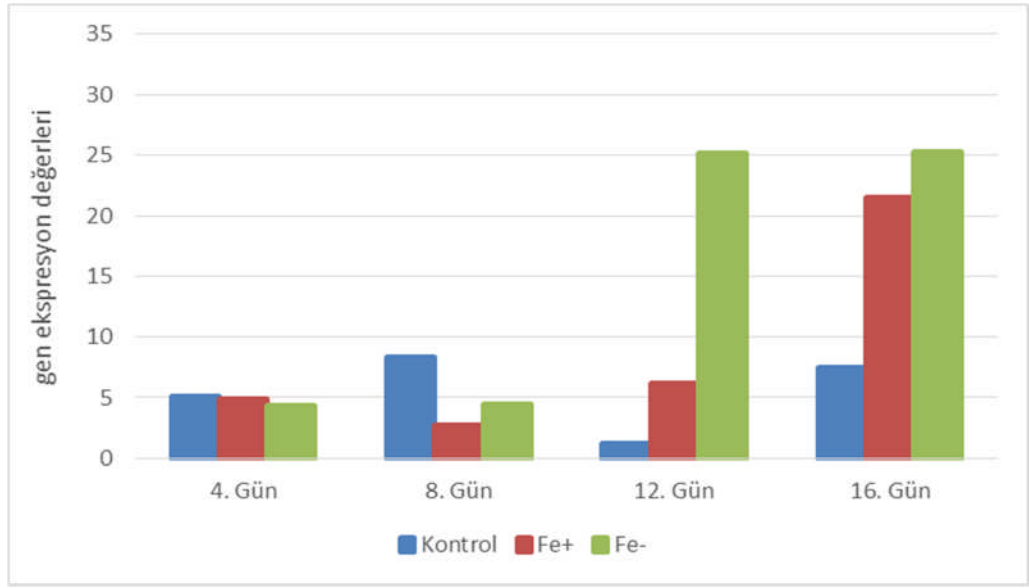


Şekil 4.25: 1. serideki *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunun kontrol, Fe+ ve Fe – örneklerinin *mcvB* geni ekspresyon değerlerinin zamana bağlı değişimi.

Tablo 4.13: 1. serideki *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunun kontrol, Fe+ ve Fe – örneklerinin *mcvB* geni ekspresyon sonuçlarının *t*-test p değerleri

Ekspresyon	4.Gün	8.Gün	12.Gün	16.Gün
Kontrol / Fe+	0,171	0,330	0,001	0,003
Kontrol / Fe -	0,140	0,963	0,026	0,012
Fe+ / Fe -	0,769	0,519	0,113	0,098

Tez çalışmasında yapılan Gerçek Zamanlı PCR reaksiyonları sonucunda 16:8 aydınlık/karanlık şartlarda tutulan 1. serideki *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunun elde edilen gen ekspresyonu sonuçlarına göre demir içermeyen ortamda (Fe-) gelişen *M. aeruginosa* PCC 7806 hücrelerinin demir içeren ortamda bulunan kontrol örneğinin hücrelerine oranla *mcvB* geninin daha çok ekspre olduğu ancak 12. günde ($p < 0,05$) kontrol örneğinin *mcvB* gen ekspresyonunun daha fazla olduğu görüldü. Demir rezervleri tüketilip demir içeren kültür ortamına eklenen örneğin (Fe+) *mcvB* geni, kontrol örneğine göre 12. günde daha az ekspre olurken diğer günlerde anlamlı bir farklılığa rastlanmadı ($p > 0,05$). Fe+ örneğinin demirsiz ortama eklenen örnekle (Fe-) gen anlatımı açısından 12 ve 16. gün dışında anlamlı bir farklılığı tespit edilmedi.



Şekil 4.26: 1. serideki *M. aeruginosa* IFCC 150 suşunun kontrol, Fe+ ve Fe – örneklerinin *mcyB* geni ekspresyon değerlerinin zamana bağlı değişimi.

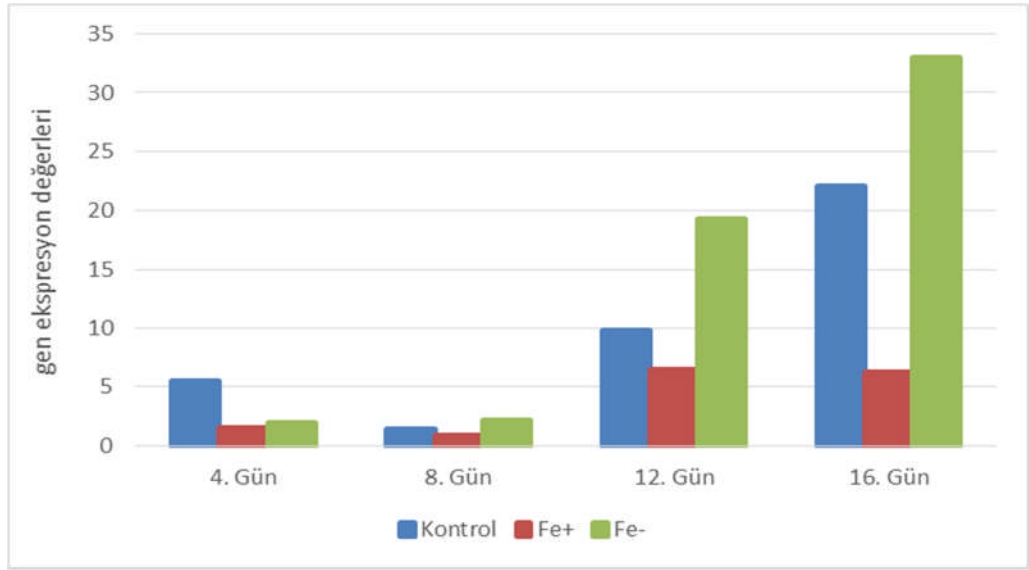
Tablo 4.14: 1. serideki *M. aeruginosa* IFCC 150 suşunun kontrol, Fe+ ve Fe – örneklerinin *mcyB* geni ekspresyon sonuçlarının *t*-test p değerleri

Ekspresyon	4.Gün	8.Gün	12.Gün	16.Gün
Kontrol / Fe+	0,838	0,001	0,006	0,002
Kontrol / Fe -	0,497	0,019	0,000	0,02
Fe+ / Fe -	0,122	0,118	0,000	0,283

Gerçek zamanlı PCR reaksiyonları sonucunda 16:8 aydınlık/karanlık şartlarda tutulan 1. serideki *M. aeruginosa* IFCC 150 suşunun elde edilen gen ekspresyonu sonuçlarına göre demir içermeyen ortamda gelişen (Fe-) *M. aeruginosa* IFCC 150 hücrelerinin demir içeren ortamda bulunan hücrelere (kontrol ve Fe+) oranla *mcyB* geninin 12 ve 16. günlerde daha çok ekspre olduğu görüldü. Demir rezervleri tüketilip demir içeren kültür ortamına eklenen örneğin (Fe+) *mcyB* geni, kontrol örneğine göre 12. ve 16. günlerde günde daha fazla ekspre olurken 8. günde kontrol örneğine göre *mcyB* geninin anlatımının daha az olduğu görüldü.

4.9.2. 24 Saat Aydınlık Koşuldaki Örneklerin *mcyB* Gen Ekspresyonları

24 saat aydınlık koşulda tutulan 2. serideki *M. aeruginosa* PCC 7806 ve *M. aeruginosa* IFCC 150 suşlarından 4, 8, 12 ve 16. günlerde alınan örneklerden Gerçek Zamanlı PCR analizi gerçekleştirildi.

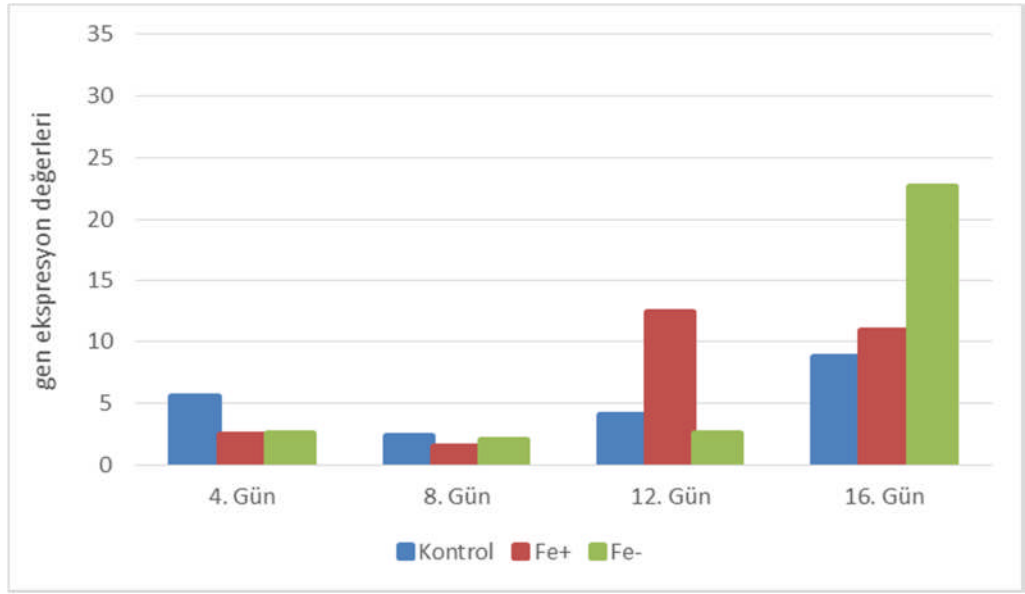


Şekil 4.27: 2. serideki *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunun kontrol, Fe+ ve Fe – örneklerinin *mcyB* geni ekspresyon değerlerinin zamana bağlı değişimi.

Tablo 4.15: 2. serideki *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunun kontrol, Fe+ ve Fe – örneklerinin *mcyB* geni ekspresyon sonuçlarının *t*-test p değerleri

Ekspresyon	4.Gün	8.Gün	12.Gün	16.Gün
Kontrol / Fe+	0,002	0,082	0,016	0,001
Kontrol / Fe -	0,000	0,462	0,000	0,014
Fe+ / Fe -	0,483	0,263	0,000	0,001

2. serideki *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunun Gerçek Zamanlı PCR reaksiyonları sonucunda elde edilen gen ekspresyonu değerlerine göre, demir içermeyen ortamda (Fe-) gelişen *M. aeruginosa* PCC 7806 hücrelerinin demir içeren ortamda (kontrol ve Fe+) bulunan hücrelere oranla *mcyB* geninin 12 ve 16. günlerde daha çok ekspre olduğu görüldü. Bununla birlikte 4. ve 8. günlerde (Fe-) örneklerinin diğer örneklerden (kontrol ve Fe+) *mcyB* gen anlatımı açısından anlamlı bir farklılığın olmadığı görüldü. Demir rezervleri tüketilip demir içeren kültür ortamına eklenen örneğin (Fe+), *mcyB* geninin kontrol örneğine göre daha az ekspre olduğu tespit edildi. Kontrol örneğinin *mcyB* gen ekspresyonunun 12 ve 16. günlerde Fe- örneğinden daha az, 4. günde daha fazla olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.28: 2. serideki *M. aeruginosa* IFCC 150 suşunun kontrol, Fe+ ve Fe – örneklerinin *mcyB* geni ekspresyon değerlerinin zamana bağlı değişimi.

Tablo 4.16: 2. serideki *M. aeruginosa* IFCC 150 suşunun kontrol, Fe+ ve Fe – örneklerinin *mcyB* geni ekspresyon sonuçlarının *t*-test p değerleri

Ekspresyon	4.Gün	8.Gün	12.Gün	16.Gün
Kontrol / Fe+	0,012	0,220	0,004	0,229
Kontrol / Fe -	0,027	0,594	0,281	0,000
Fe+ / Fe -	0,859	0,155	0,003	0,000

24 saat aydınlık koşulda tutulan 2. serideki *M. aeruginosa* IFCC 150 suşunun demir içermeyen ortamda gelişen (Fe-) *M. aeruginosa* PCC 7806 hücrelerinin kontrol hücrelerine oranla *mcyB* geninin 16. gün daha çok, 4. gün daha az ekspre olduğu, 8 ve 12. günlerde ise anlamlı bir farklılığın olmadığı görüldü. Demir rezervleri tüketilip demir içeren kültür ortamına (Fe+) eklenen örneğin *mcyB* geni, kontrol örneğine göre 4, 8. günlerde daha az ekspre olurken diğer günlerde daha çok ekspre olmuştur. Fe+ örneğinin *mcyB* gen ekspresyonunun Fe- örneğinden sadece 12. günde daha fazla olduğu gözlemlendi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Siyanobakterilerin bir genusu olan *Microcystis* (Chroococcales) dünyada birçok tatlı su kaynağında bulunur ve aşırı artışlar gösterir. *Microcystis* genusu gaz vesikülleri içeren küresel hücrelerle karakteristiktir. Doğal çevrelerinde *Microcystis* yüzbinlerce hücreye ulaşabilen koloniler oluşturur. Laboratuvar koşullarında ise genellikle tek hücreli formdadırlar ve koloni oluşturmazlar. Morfolojik temelli tür tayininde hücre çaplarına ve koloni şekillerine göre adlandırılırlar. Ancak *Microcystis* türlerinin kendi içlerinde gösterdiği büyük morfolojik değişiklikler veya türler arasında büyük benzerlikler araştırmacıları *Microcystis* genuslarının tür tayinlerini morfolojik temelli yöntemlere göre daha hassas ve doğru sonuçlar veren genetik yöntemlerle (fikosiyanin operonunun veya 16s rRNA bölgelerinin dizilenmesi) gerçekleştirmeye yöneltmiştir [18, 165]. Yapılan bir çalışmada PCR yönteminin diğer yöntemlere oranla kolay, etkili, hassas olduğu ve liyofilize örneklerin, sediman ve yüzey suyu örnekleri ile laboratuvar kültür örneklerinin tamamında uygulanabilecek bir yöntem olduğu rapor edilmiştir [166]. Bu nedenle tez çalışmasında kullanılan *Microcystis* spp. suşunun tür tayini klasik morfolojik yöntemin yanısıra 16s rRNA geni çoğaltılarak, PCR ürününün dizilenmesiyle gerçekleştirildi. Yapılan biyoinformatik analizle *Microcystis* suşunun *Microcystis aeruginosa* türüne ait olduğu kesin olarak tespit edildi ve *Microcystis aeruginosa* IFCC 150 olarak adlandırıldı.

Microcystis aeruginosa türünün en yaygın olarak ürettiği toksin microcystin adlı bir hepatotoksindir. *Microcystis aeruginosa* suşlarının tamamı toksik değildir. Yapılan bir çalışmada aynı türe ait farklı suşların bir kısmının toksin üretirken bir kısmının toksin üretmediği ve bu durumun klasik mikroskopik yöntemlerle tespit edilemeyeceği rapor edilmiştir [167]. Microcystin konsantrasyonunu izlemek için kullanılan genel yöntemler HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) gibi analitik teknikler ve PP1, PP2A (Protein Phosphatase Inhibition Assays 1, 2A) ve ELISA gibi immünolojik yöntemlerdir [18]. Genetik temelli toksin tespit etme yöntemleri diğer yöntemler ile kıyaslandığında oldukça hassastır. PCR ve Gerçek Zamanlı PCR gibi genetik yöntemler toksin

genlerinin varlığını tespit edebildiğinden suşun toksin üretme potansiyeli kesin olarak belirlenebilmektedir. Aynı zamanda Gerçek Zamanlı PCR, kantitatif bir yöntem olarak toksin konsantrasyonunu tespit edebildiği için toksin izleme çalışmalarında kullanılan hassas, hızlı ve spesifik bir yöntemdir [168, 169, 170]. Bu çalışmada klasik PCR reaksiyonları için iki farklı primer çifti kullanılarak *mcyB* geninin tamamı ve *mcyB* geninin bir fragmanı çoğaltıldı. Çoğaltılan *mcyB* geni pozitif kontrol olarak kullanılarak klasik PCR reaksiyonunun hassasiyeti artırıldı. Bir çok çalışma toksik *Microcystis aeruginosa* hücrelerindeki microcystin varlığı ile microcystin sentetaz genleri arasındaki ilişkileri tespit etmiştir. Bununla birlikte toksik olmayan *Microcystis* suşlarının microcystin sentetaz genlerini içermediği veya delesyon ve insersiyon gibi mutasyonlara maruz kaldığı rapor edilmiştir. [6, 171, 172, 173]. Bu çalışmada referans suş *Microcystis aeruginosa* PCC 7806'nın ve izole edilen IFCC 150 suşunun toksin geninin varlığı PCR yöntemiyle tespit edilerek toksin üretme potansiyelleri ortaya konuldu.

Microcystin konsantrasyonu, siyanobakteri biyomasının miktarına, türlerin fizyolojik ve genotip kompozisyonlarının farklılığına göre değişir. Hücre içi microcystin konsantrasyonundaki değişiklikler, genlerin transkripsiyonundaki değişikliklere (üretilen mRNA kopya sayısı), mRNA'nın translasyonuna, microcystin üretimi için sentetaz kompleksinin spesifik aktivitesine ve potansiyel microcystin üretimine bağlıdır. Laboratuvar kültürlerinde ortam şartları stabil tutulabildiği için tek bir çevresel faktörün microcystin üretimi üzerine etkisi incelenebilmektedir. Bu tarz çalışmalar göstermiştir ki ışık, sıcaklık, pH, azot, fosfor ve demir gibi çevresel etmenler microcystin üretimini ve miktarını etkilemektedir [88, 129, 163, 165, 174, 175, 176]. Çevresel stres etmenleri ile ilgili yapılan çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde tartışmalı durumlarla karşılaşılabilen veya uygulanan farklı teknikler sayesinde benzer konulara farklı yaklaşımlar getirilebilmektedir. Örneğin yapılan bir çalışmada çevresel faktörlerden ışığın 7'den 40 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ışık şiddetine yükseltilmesi sonucu microcystin üretiminin arttığı daha yüksek ışık şiddetinde ise toksin miktarında çok önemli bir artış olmadığı yönünde bulgu elde edilirken, başka bir çalışmada yüksek ışık şiddetinin microcystin konsantrasyonunda düşüşe neden olduğu rapor edilmiştir [132, 136]. Bu nedenle siyanobakterilerde çevresel stres etmenleri üzerine yapılan çalışmalar literatür açısından önem arz etmektedir.

Bu çalışmada kullanılan suşlar; *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 (Hollanda, Braakman Rezervuarı) ve *Microcystis aeruginosa* IFCC 150 (Türkiye, Küçükçekmece Gölü) laboratuvar koşullarında sürekli ışık stresine ve demir yokluğu stresine maruz bırakıldı. Işık ve demirin dışındaki tüm faktörler optimum koşullarda tutuldu. Deney düzeneklerindeki *Microcystis aeruginosa* suşları demir stresi (demir içermeyen ortam) ve sürekli ışık stresi (24 saat aydınlık ortam) altında ve optimum ışık şiddeti ve süresi (1800lx ışık şiddeti, 16:8 saat aydınlık/karanlık) ile optimum demir konsantrasyonlarında (21 μ M) tutularak gelişimleri izlendi ve *mcyB* geninin anlatım farklılıkları incelendi.

M. aeruginosa hücreleri içerdikleri pigmentler nedeniyle yeşil renkli olarak görülmektedir. Laboratuvar koşullarında kültüre edilen *M. aeruginosa* hücrelerinin sayıları arttıkça kültür ortamındaki görünüşleri açık yeşilden koyu yeşile doğru değişirken, hücrelerin zarar görmesi ve canlı hücre sayısının azalması sonucu hücrelerin kültür ortamındaki görünüşleri yeşilden beyaza doğru değişmektedir. Klorotik kültür ortamı olarak adlandırılan bu durum hücrelerin pigmentlerini kaybetmesi ve lizise uğrayıp canlılıklarını kaybetmelerinden dolayı gerçekleşmektedir [177].

Bu çalışmada kullanılan *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunun tüm örnekleri (kontrol, Fe⁺ ve Fe⁻) sürekli ışık stresi (24 saat aydınlık) altındayken sürekli ışık stresine maruz kalmayan örneklerle oranla daha yavaş bir gelişim gösterdi. Sürekli ışık stresi altındaki kültür ortamında bulunan örneklerin renklerinin daha açık yeşil olduğu bu örneklerin bir kısmının ise (özellikle Fe⁻ grubu) renklerinin yeşilden sarıya döndüğü gözlemlendi. Bu durumun hücrelerin metabolik aktivitelerinin yavaşlaması bazı örneklerde durma noktasına gelmesinin bir göstergesi olduğu düşünüldü. Yapılan çalışmalara göre demir yokluğunun oluşturduğu stresin siyanobakteri hücrelerindeki ilk yanıtlarından biri fikobilizomların hızlı degradasyonları sonucu demir düzenleyici genlerin hücre gelişimini devam ettirebilmek için ekspre olmaları ve oksidatif strese karşı PSI ve PSII sistemlerindeki koruyucu proteinlerin sentezinin artmasıdır. Fikobilizomların PSI ve PSII sistemlerinde olduğu gibi ışık stresine karşı savunma olarak kullanacağı ışık toplayıcı sistemleri yoktur. Demir sınırlamasının oluşturduğu stres IsiA gibi koruyucu proteinlerin indüklenmesine neden olur. IsiA aynı zamanda hücreleri yüksek ışığa karşı koruyucu etki de göstermektedir [178, 179]. *M. aeruginosa* genomunda tespit edilen

stres altında aktif olan düzenleyici genlerin tamamı (isiA, isiB, idiB, irpA, futA2 gibi) her *M. aeruginosa* suşunda bulunmaz. Örneğin yapılan bir çalışmada toksik *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunda IsiA geni tespit edilmiş ancak başka bir çalışmada bu genin toksik *M. aeruginosa* NIES-843 suşunun genomu tarafından kodlanmadığı görülmüştür. Bu genomik farklılıkların nedeninin aynı türe ait siyanobakteri suşlarının demir sınırlandırmasına karşı suşa özel farklı adaptasyonlar geliştirmesinden kaynaklı olabileceği yönde görüşler bulunmaktadır [14, 180]. Bu bilgiler doğrultusunda bu çalışmada *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunun deney düzeneklerindeki örneklerinden demir yokluğu ve sürekli ışık stresine maruz kalanlarının en belirgin şekilde renk değişimine uğramasının nedeninin fikobilizomların hızlı bir şekilde degrade olmasından dolayı hücrelerde klorozisin gerçekleşmeye başlaması olduğu düşünüldü. *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunun sadece sürekli ışık stresi altındaki kontrol ve Fe⁺ örneklerinin, optimum ışık koşullarındaki örneklerle oranla renklerinin daha açık olmasının nedeni olarak fikobilizomların yüksek ışığa karşı savunma sistemlerinin olmayışının etkili olduğu düşünüldü.

M. aeruginosa IFCC 150 suşunun tüm örnekleri (kontrol, Fe⁺ ve Fe⁻), *M. aeruginosa* PCC 7806 suşuna benzer şekilde sürekli ışık stresi altındayken optimum ışık koşulundaki örneklerle oranla daha yavaş bir gelişim gösterdi ve sürekli ışık stresi altında olan örneklerin büyük kısmının renklerinin yeşilden sarıya döndüğü gözlemlendi. Farklı coğrafik kökenlere sahip *M. aeruginosa* PCC 7806 ve *M. aeruginosa* IFCC 150 örneklerinin kültür ortamlarındaki görüntüleri karşılaştırıldığında *M. aeruginosa* IFCC 150 suşunun tüm koşullardaki örneklerinin *M. aeruginosa* PCC 7806 örneklerine oranla daha yavaş bir gelişim gösterdiği renkleri yeşilden sarıya dönen örneklerin sayısının daha fazla olduğu görüldü. Yapılan bir çalışmada her *Microcystis* suşunda farklı antibody ve lektin bağlayıcı motifler bulunduğundan dolayı antibody ve lektinler moleküler prob olarak kullanılarak aynı türe ait suşların coğrafik farklılıkları tespit edilmiştir. Bu çalışmaya göre aynı gölden izole edilen *M. aeruginosa* ve *M. viridis* türlerinin farklı göllerden izole edilen aynı tür *Microcystis* suşlarına göre daha çok benzerlik gösterdiği rapor edilmiştir [181]. Başka bir çalışmada çeşitli türlerde siyanobakteri suşlarının 16s rRNA genleri dizilenerek aradaki benzerlikler incelenmiş ve coğrafik kökenleri farklı olan suşların 16s rRNA genleri açısından bir farkı olmadığı tespit edilmiştir [182]. Tez çalışmasında kullanılan aynı türe ait farklı coğrafik kökenli

suşların kültür ortamları gözle değerlendirildiğinde aynı koşullardaki gelişimleri açısından oluşan farklılıkların coğrafik farklılıklarından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada yapılan hücre yoğunluğu ölçümleri sonucunda genel olarak demir içermeyen ortamda (Fe-) gelişen *M. aeruginosa* PCC 7806 ve *Microcystis aeruginosa* IFCC 150 hücrelerinin demir içeren ortamda (Fe+ ve kontrol) bulunan hücrelere oranla daha yavaş geliştiği gözlemlendi. *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunun kontrol örneğinin optimum ışık koşullarında tutulan ve demir rezervleri tüketilip demir içeren kültür ortamına eklenen örneğinden (Fe+) daha yavaş bir gelişim gösterdiği izlendi. *M. aeruginosa* PCC 7806 suşuna ait kontrol örneği sürekli ışık stresi altındayken de Fe+ örneğine göre daha yavaş bir gelişim gösterdiği, Fe- örneğine göre ise daha hızlı geliştiği görüldü. Diğer yandan, *Microcystis aeruginosa* IFCC 150 hücrelerinin kontrol ve Fe+ örnekleri sürekli ışık stresinin varlığında ve yokluğunda benzer gelişim eğrilerine sahip olduğu gözlemlendi ve aralarında anlamlı bir farklılığa rastlanmadı. *Microcystis aeruginosa* IFCC 150 hücrelerinin demir içermeyen ortamda bulunan örneklerinin ise (Fe-), kontrol ve Fe+ örneklerine göre genelde daha yavaş bir gelişim gösterdiği görüldü. Spektrofotometre kullanılarak yapılan hücre yoğunluğu ölçümlerinde gelişimleri duran veya ölen hücreler ayırt edilemez. Lizise uğrayan hücre parçaları da spektro ölçümlerini etkilediğinden hücre yoğunluğu ölçümleri hücre gelişimleri hakkında genel bir fikir vermesi amacıyla gerçekleştirilir [183]. Bu nedenle bu çalışmada hücre yoğunluğu verileri ile kl-a ölçüm sonuçları arasında farklılıklar görülebilir.

Bu çalışmada yapılan kl-a analizleri sonucunda elde edilen verilere göre demir içermeyen ortamda (Fe-) gelişen *M. aeruginosa* PCC 7806 ve *Microcystis aeruginosa* IFCC 150 suşlarına ait örneklerin her iki seride de hücre gelişimlerinin oldukça yavaş olduğu ve durma noktasına geldiği görüldü. Optimum ışık koşulunda tutulan 1. serideki *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunun kontrol örneği ile demir rezervleri tüketilip demir içeren kültür ortamına eklenen örneği (Fe+) karşılaştırıldığında 12. gün dışında gelişimlerinin paralel olduğu görüldü. *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunun 1. serideki kontrol örneğinin kl-a değerinin 12. günde anlamlı şekilde düştüğü ardından 16. günde yeniden yükseldiği gözlemlendi. Bu durum hücre yoğunluğu ölçümlerinde de aynı şekilde

olduğundan ölçümlerde hata yapılmadığı, bu olayın kontrol edilemeyen bir çevresel etkenden veya kültür ortamında lizise uğrayan hücrelerin ortama bıraktıkları besin tuzlarının neden olduğu besin tuzu konsantrasyon değişimlerinden kaynaklı olabileceği düşünüldü. *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunun kontrol ve Fe⁺ örneklerinin sürekli ışık stresi altındaki gelişimleri birbirine paralel bulundu ve anlamlı bir farka rastlanmadı. Ancak sürekli ışık stresi altında olmayan örneklerle göre kl-*a* miktarları anlamlı bir şekilde daha düşük olarak tespit edildi. Siyanobakteri hücreleri normal çevre koşullarında gündüz ve gece döngüsüne sahiptirler. Bu döngü mevsimlere göre değişim göstermektedir. Siyanobakteri hücreleri gece döngüsünde yani karanlık ortamda degrade olan pigmentlerini ve fotosentetik aygıtlarını yenilerler. Sürekli aydınlık döngüde kalan hücreler degrade olan veya zarar gören fikobilizom, PSI ve PSII sistemlerini tamir edip yenileyemedikleri için hücreler bir süre sonra klorotik hale gelirler [184]. Bu nedenle tez çalışmasındaki deney düzeneğinde sürekli aydınlıkta kalan hücrelerin gelişimleri aydınlık:karanlık döngüde tutulan hücrelere göre daha yavaştır. *Microcystis aeruginosa* IFCC 150 suşunun kontrol ve Fe⁺ örneklerinin 16:8 aydınlık/karanlık koşuldaki gelişimine bakıldığında kontrol örneğinin daha iyi gelişim gösterdiği en büyük farkın 12. günde görüldüğü gözlemlendi. Aynı örneklerin 24 saat aydınlık ortamdaki gelişimlerine bakıldığında ise büyüme eğrilerinin paralel olduğu görüldü ve anlamlı bir farka rastlanmadı. *Microcystis aeruginosa* IFCC 150 hücrelerinin kl-*a* miktarları *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 hücrelerinde olduğu gibi optimum ışık koşulunda daha yüksek bulundu. Çalışmada kullanılan suşlar coğrafik kökenlerine göre karşılaştırıldığında kl-*a* miktarları açısından anlamlı bir farklılık görülmedi. Yapılan bir çalışmada *Microcystis* hücreleri düşük, orta ve yüksek ışık şiddetinde kültüre edilerek klorofil-*a* miktarları takip edilmiştir. Çalışmanın sonucunda ışık şiddeti arttıkça klorofil-*a* miktarlarının düştüğü görülmüştür [135]. Başka bir çalışmada yüksek ve düşük ışık şiddetlerinde siyanobakteri hücreleri takip edildiğinde en yüksek hücre sayısının düşük ışık şiddetinde tespit edildiği belirtilmiştir [185]. Diğer bir çalışmada ise ışık stresinin *Microcystis aeruginosa* hücrelerinin fotosentez aktivitesini etkilediğini fotosentezde görevli genlerin ekspresyonlarının değiştiğini ve dolayısıyla hücre gelişiminin yavaşladığı rapor edilmiştir [186]. Bu çalışmada elde edilen kl-*a* ve hücre yoğunluğu verileri literatürdeki önceki çalışmalarla paralellik göstermektedir. Klorofil-*a* ve hücre yoğunluğu ölçümü sonuçlarına göre, *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 ve *Microcystis aeruginosa* IFCC 150 suşlarının demir varlığında en iyi gelişimi gösterdiği

ve sürekli ışık stresinin (24 saat aydınlık) gelişimlerini yavaşlattığı görüldü. Yapılan çalışma sonucunda klorofil-*a* sonuçlarının hücre yoğunluğu ölçümleriyle ve kültür ortamı görüntüleriyle genel olarak paralel olduğu, benzer hücre gelişim bilgilerini verdiği tespit edildi.

Gerçek Zamanlı PCR analizi sonucunda elde edilen verilere göre demir içermeyen ortamda gelişen (Fe-) *M. aeruginosa* PCC 7806 ve *M. aeruginosa* IFCC 150 hücrelerinin *mcvB* geninin genel olarak demir içeren ortamda (Fe+ ve kontrol) bulunan hücrelere oranla özellikle deney düzeneğinin 12 ve 16. günlerinde daha çok ekspres olduğu gözlemlendi. 2. seride (24 saat aydınlık koşul) bulunan *M. aeruginosa* PCC 7806 hücrelerinden kontrol ve Fe- örneklerinin *mcvB* gen anlatımlarının, optimum ışık koşullarında tutulan hücrelere oranla 12 ve 16. günlerde (12. gündeki kontrol örneği hariç) anlamlı şekilde yüksek olduğu, 2. serideki Fe+ örneğinin 1. Serideki Fe+ örneğine oranla ekspresyonunun büyük farklılık göstermediği görüldü. Gen anlatımı sonuçlarına genel olarak bakıldığında her iki suş için de demir yokluğu stresi altında kalan örneklerin (Fe-) *mcvB* gen ekspresyonlarının diğer örneklerle (kontrol ve Fe+) oranla genellikle daha fazla olduğu görüldü. *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunun 2. serideki hem sürekli ışık (24 saat aydınlık) hem de demir yokluğu stresine maruz kalan örneğinin (Fe-) gen anlatımı değerlerinin özellikle deney düzeneğinin son günlerine doğru çalışmada elde edilen en yüksek sonuçlar olduğu görüldü. Daha önce yapılan çalışmalarda demir miktarının sınırlandırılması veya demirin yokluğu ile organizmanın sürekli ışığa maruz kalmasının oluşturduğu stresin microcystin konsantrasyonunu arttırdığı tespit edilmiştir [14, 127, 128, 129, 130, 131, 132]. Bu çalışmada da stres faktörleri altında olan hücrelerin gelişimlerinin yavaşladığı hatta durma noktasına geldiği görülmüş ve toksin gen ekspresyonunun stres altında olmayan hücrelere göre oldukça fazla olması toksin sentezinin hücrenin kendini koruyabilmesi için bir savunma mekanizması gibi çalıştığını düşündürmüştür. Yapılan bir çalışmada *Microcystis aeruginosa* suşunun demir kazanımında ve gelişiminde demir fotokimyasının önemli bir faktör olduğu belirtilirken başka bir çalışmada demir kullanılabilirliğinin toplam demir konsantrasyonuna değil şelatlanmamış demir konsantrasyonuna bağlı olduğu ve Fe(III)'ün ışık aracılığıyla Fe(II)'ye indirgenmesi sayesinde hücrenin demiri daha kolay kullanabileceği rapor edilmiştir [127, 128]. Bu nedenle siyanobakterilerin demirle olan ilişkisinde gün ışığının çok önemli bir yeri vardır. Yapılan çalışmalarda *Microcystis*

aeruginosa türlerinin fotosentetik aktivitelerinin ve gelişimlerinin devamı için minimum 10 μM demire ihtiyaç duydukları, microcystin toksisitenin farklı demir konsantrasyonlarına göre değişim gösterdiği ve microcystin üreten *Microcystis aeruginosa* türlerinin canlılıklarını toksin üretmeyen türlere göre daha uzun sürdürebildikleri tespit edilmiştir. Bu durum toksik *Microcystis aeruginosa* hücrelerinin demir alımını veya depolamasını daha etkili yapabildikleri hipotezini destekler niteliktedir [14]. Bununla birlikte kl-a ve hücre yoğunluğu ölçümlerinde 12. günde düşüş gösteren *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunun 1. serideki kontrol örneğinin *mcyB* gen anlatım değeri aynı koşullardaki diğer örneklerden (Fe^+ ve Fe^-) ve diğer günlerden anlamlı şekilde yüksektir. Bu durum organizmanın 12. günde bilinmeyen bir stres faktörüne maruz kaldığını ve *mcyB* gen ekspresyon değerini arttırdığını göstermektedir. Buradaki stres etmeninin ne olduğu bilinmemekle beraber microcystin konsantrasyonunun sadece ışık ve demir stresinde değil farklı bir stres etmenine yanıt olarak da artabileceği görüldü. Suşların coğrafik kökenlerinin farklı olmasının çevresel stres etmenlerine verecekleri yanıt açısından olası farklılıklara neden olması da toksin mekanizmasının anlaşılması ve göl yönetim çalışmaları açısından önemli bir konudur. Tez çalışmasındaki coğrafik kökenleri farklı olan örneklerle bakıldığında genel olarak 1. serideki 16:8 aydınlık/karanlık ortamda *M. aeruginosa* IFCC 150 suşuna ait örneklerin *mcyB* gen ekspresyonu fazlayken, 2. seride 24 saat aydınlık ortamda bulunan *M. aeruginosa* PCC 7806 suşuna ait örneklerin gen ekspresyonunun daha fazla olduğu görüldü. Bu durumun suşların coğrafi köken farklılığından dolayı moleküler düzeyde farklı yanıtlar verme ihtimallerinden kaynaklı olabileceği düşünüldü. Çalışmada kullanılan *Microcystis aeruginosa* IFCC 150 suşunun 1. serideki demir yokluğu stresi altındaki örneğinin (Fe^-), 2. serideki sürekli ışık ve demir yokluğu stresi altındaki örneğe (Fe^-) oranla *mcyB* gen ekspresyonunun 12. günde daha fazla 16. günde ise birbirine yakın değerlerde olduğu görüldü. Bunun yanında *Microcystis aeruginosa* IFCC 150 suşunun 1. serideki Fe^- örneğinin gen ekspresyon miktarının 2. serideki Fe^- örneğine göre daha fazla olduğu görüldü. *M. aeruginosa* PCC 7806 suşunda ise tam tersi bir durumun söz konusu olduğu ve 2. serideki Fe^- örneğinin 1. serideki Fe^- örneğine oranla gen ekspresyon miktarının daha fazla olduğu gözlemlendi. Tez çalışmasında demir içermeyen ortamda bulunan örneklerin (Fe^-) *mcyB* geni ekspresyon değerlerinin literatür bilgileriyle paralellik göstermesi açısından diğer örneklerle (kontrol ve Fe^+) oranla daha yüksek olması beklenmektedir. Ancak her iki suşun her iki serideki

demir içermeyen ortamda bulunan örneklerinin gen ekspresyon miktarları kendi aralarında karşılaştırıldığında gen ekspresyon değerlerinin birbirleriyle paralellik göstermediği birbirinden oldukça farklı değerler elde edildiği görüldü. Çevresel koşulların optimum değerlerinde aşırı değişiklikler meydana geldiğinde bazı enzimlerin aktiviteleri durabilir veya yok olabilirken bazılarının da aktiviteleri artabilir. Birçok organizma stres etmenlerinin etkilerini hafifletmek için stres tiplerine özgü gen setlerini aktive ederler ve stres spesifik metabolitler sentezleyerek organizmanın veya hücrenin yeni ortam koşullarına adaptasyonunu sağlamaya çalışırlar [120]. Bu nedenle organizmaların stres faktörlerine verdikleri yanıtta tür özellikleri ve coğrafi köken farklılıklarının yanında suşa ait özellikler ile kontrol altında tutulamayan diğer çevresel ve hücresel etkenler de etkili olabilir.

Siyanobakteriler prokaryot hücre yapısında olmaları nedeniyle bakterilere benzerlik gösterirken fotosentez yetenekleri nedeniyle de bitkilerle benzerlik göstermektedirler. Yapılan bir çalışmada dut, mısır ve karnabahar bitkilerinin yapraklarının demir yokluğunda klorotik hale geldiği ve bitkilerin yapraklarında reaktif oksijen türlerinin artış gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise sürekli ışığa maruz kalan domates bitkisinin gelişiminin yavaşladığı ve yapraklarının klorotik hale geldiği rapor edilmiştir. Bu çalışmada demir yokluğu ve sürekli ışık stresine karşı *Microcystis* hücrelerinin verdiği gelişim cevapları yüksek bitkilerle yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Bu nedenle siyanobakteriler, yapısal olarak kara bitkilerinden çok farklı olsa da benzer fotosentez mekanizmalarına sahip olmaları nedeniyle çevresel stres etmenlerine moleküler seviyede geliştirdikleri cevaplar açısından yüksek bitkilerdeki stres çalışmalarına model oluşturabilir [120, 187, 188].

Microcystinin üretim mekanizması ve microcystin üretimini etkileyen faktörler üzerine birçok çalışma yapılmasına rağmen bu toksinin organizma için avantajı veya dezavantajının ne olduğu hala açıklanamamıştır. Yaklaşık 3,5 milyar yıldır varlıklarını sürdüren siyanobakterilerin metabolizmaları açısından oldukça maliyetli olan toksin üretiminden neden vazgeçemedikleri de başka bir tartışma konusudur [58]. Bu nedenle bu konu üzerine yapılan her çalışma literatür açısından önemli bir veri olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada organizmanın fizyolojik faaliyetlerini düzenleyen ışığın neden olduğu stres altında ve hücre içi metabolizması için önemli iz elementlerden olan

demir yokluğunda daha fazla toksin ürettiği görülmüştür. Bu durum, organizmanın toksin üretme nedenlerinden birinin zor koşullarda hayatta kalmak olduğunu düşündürmektedir.

Normal koşullar altında, siyanobakteriler ürettikleri hücre içi toksinleri çevrelerine az miktarda salgılar. Stresli koşullar altında (örneğin tuzluluk değişimi, rüzgâr hareketleri ve akıntı veya aşırı algal çoğalmanın son aşamasında) siyanobakteri hücreleri lizise uğradığı için toksinler dış ortama salınır. Bu nedenle organizmaların yaşadığı ortamdaki kimyasal değişimler veya çevresel koşulların insan eliyle değiştirilmesi sucul ortama toksin salınımını arttırabilir ve sucul organizmalarla birlikte suyla ilişkide olan tüm canlıların zarar görmesine neden olabilir [121]. Microcystinin olumsuz etkilerinden korunabilmek için özellikle içme suları ile yüzmeye, spor, sulama gibi aktiviteler için kullanılan sulardaki microcystin üreten organizmaların ve üretilen toksin miktarlarının tespiti önemlidir. Gerçek Zamanlı PCR kantitatif bir yöntem olduğu için toksik biyomasın oluşum sürecini izlememizi ve toksik suşların gelişimini sağlayan etkenlerin açığa çıkarılabilmesini sağlayabilmektedir. Ülkemizde de özellikle insanların kullandığı su kaynaklarının siyanobakteriler ve ürettikleri toksinler açısından izlenmesi erken uyarı sistemlerinin oluşturulmasına büyük katkı sağlayacaktır.

Microcystinin ortaya çıkış mekanizmasını düzenleyen hücre içi organizasyonun genetik düzeyde incelenmesi, toksik *Microcystis* spp. aşırı artışları gerçekleşmeden erken uyarı sistemlerinin oluşturulmasını ve bu duruma özgü etkin ve sürdürülebilir önlem alınmasını kolaylaştıracak, göl yönetimi ve restorasyonu çalışmaları için önemli veriler oluşturacaktır. Göllerde demir sınırlaması veya zenginleştirilmesi uygulamaları fitoplankton üzerindeki etkileri nedeniyle göl yönetimi çalışmaları için uzun zamandır önerilmektedir. Örneğin demir sülfat ötrofik sularda genellikle birincil faktör olan fosforun konsantrasyonunu düşürmek için kullanılmaktadır [123]. Göl yönetim sistemlerinde uygulanacak yöntemlerin belirlenmesinde çevresel stres faktörlerinin etkisinin hücresel ve genetik düzeyde bilinmesi önemlidir. Örneğin demirin *Microcystis* hücreleri üzerindeki sınırlayıcı etkisi nedeniyle toksik *Microcystis aeruginosa* aşırı artışlarının kontrolünde demir miktarının kritik bir rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Günümüzde moleküler ve genetik yöntemler bilim dünyasına pek çok konuda büyük kolaylıklar sağlamakta ve klasik yöntemlerle çözümlenemeyen birçok sorunu ortadan kaldırmaktadır. Ülkemizde siyanobakteriler üzerine yapılan az sayıda genetik çalışma mevcuttur. Bu nedenle bu alanda yapılacak birçok bilimsel çalışmaya ihtiyaç vardır. Bu çalışmayla ülkemizdeki siyanobakteriler ve siyanotoksinlerle ilgili genetik düzeydeki çalışmalara katkı sağlanması hedeflenmiştir. Bununla birlikte tez çalışmasının konusunu oluşturan microcystin adlı toksinin fonksiyonunun tam olarak açıklanamamış olması bilim dünyasında bu konuyla ilgili yapılan araştırmaları daha da önemli kılmaktadır. Özellikle genetik düzeyde yapılan araştırmalar microcystinin üretim mekanizması hakkındaki boşlukları doldurmak için önemli veriler oluşturmaktadır.

KAYNAKLAR

- [1]. Sandalcı, M., Yüksel, İ., 2007, Su kaynakları kullanımının iklim değişikliği üzerindeki etkisi, *1. Türkiye İklim Değişikliği Kongresi, TİKDEK*, 11-13 Nisan İTÜ, İstanbul, Türkiye, 447-453.
- [2]. Akköz, C., Güler, S., 2004, Topçu göleti (Yozgat) alg florası I: Epilitik ve epifitik algler. *S.Ü. Fen Ed. Fak. fen dergisi*, 23, 7-14.
- [3]. Ünlü, A., Tunç, M.S., 2007, Evsel atıksu deşarjı öncesinde ve sonrasında Kehli Dere'sinin su kalitesi değişiminin incelenmesi, *İTÜ Dergisi/e.*, 17, 65-75.
- [4]. Atıcı, T., 1994, Sakarya nehri kirliliği ve algler, *Ekoloji çevre dergisi*, 24, 28-32.
- [5]. Kayar, V.N., Çelik, A., 2003, Gediz nehri kimi kirlilik parametrelerinin tayini ve su kalitesinin belirlenmesi, *Ekoloji çevre dergisi*, 12 (47), 17-22.
- [6]. Oberholster, P.J., Botha, A.M., Grobbelaar, J.U., 2004, *Microcystis aeruginosa*: Source of toxic microcystins in drinking water, *African Journal of Biotechnology*, 3 (3), 159-168.
- [7]. Bourne, D.G., Jones, G.J., Blakeley, R.L., Jones, A., Negri, A.P., Riddles, P., 1996, Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR, *Applied and environmental microbiology*, 62, 4086-4094.
- [8]. Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., Dohren, H., Borner, T., Neilan, B.A., 2000, Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806: an integrated peptide polyketide synthetase system, *Chemistry and biology*, 7 (10), 753-764.
- [9]. Nishizawa, T., Asayama, N., Fujii, K., Harada, K., Shirai, M., 1999, Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide Microcystin in *Microcystis spp.*, *J.Biochem*, 126, 520-529.
- [10]. Azevedo, S.M.F.O., Carmichael, W.W., Jochimsen, E.M., Rinehart, K.L., Lau, S., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., 2002, Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in caruaru, Brazil, *Toxicology*, 181-182, 441-446.
- [11]. Sangolkar, L.N., Maske, S.S., Chakrabarti, T., 2006, Methods for determining microcystins (peptide hepatotoxins) and microcystin-producing cyanobacteria, *Water Research*, 40, 3485-3496.

- [12]. Ginn, H.P., Pearson, L.A., Neilan, B.A., 2009, Hepatotoxin biosynthesis and regulation in cyanobacteria – the putative involvement of nitrogen and iron homeostasis mechanisms, *Chiang mai journal of science*, 36 (2), 200-223.
- [13]. Sevilla, E., Martin-Luna, B., Vela, L., Bes, M.T., Fillat, M.F., Peleato, M.L., 2008, Iron availability affects mcyD expression and microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, *Applied and environmental microbiology*, 10, 2476-2483.
- [14]. Alexova, R., Fujii, M., Birch, D., Cheng, J., Waite, T.D., Ferrari, B.C., Neilan, B.A., 2011, Iron uptake and toxin synthesis in the bloom-forming *Microcystis aeruginosa* under iron limitation, *Environmental microbiology*, 13 (4), 1064–1077.
- [15]. Watanabe, M.F., Oishi, S., 1985, Effects of environmental factors on toxicity of a Cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions, *American society for microbiology*, 49 (5):1342.
- [16]. El Semary, N.A., 2010, Modern methods for detection and elimination of microcystins toxins produced by cyanobacteria, *Applied science*, 15, 1662-1666.
- [17]. Codd, G.A., Morrison, L.F., Metcalf, J.S., 2005, Cyanobacterial toxins: Risk management for health protection, *Toxicology and applied pharmacology*, 203, 264-272.
- [18]. Vaitomaa, J., Rantala, A., Halinen, K., Rouhiainen, L., Tallberg, P., Møkelke, S., Sivonen K., 2003, Quantitative Real-Time PCR for determination of microcystin synthetase E copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes, *Applied and environmental microbiology*, 69, 7289-7297.
- [19]. Saltürk, M., 2006, Orta doğu’da su sorunu ve Türkiye açısından incelenmesi, *Security strategies*, 3, 21-38.
- [20]. Akin, G., 2007, Küresel çevre sorunları, *C.Ü. Sosyal bilimler dergisi*, 31 (1), 43-54.
- [21]. Aküzüm, T., Çakmak, B., Gökalp, Z., 2010, Türkiye’de su kaynakları yönetiminin değerlendirilmesi, *Tarım bilimleri araştırma dergisi*, 3 (1), 67-74.
- [22]. Taş, B., 2006, Derbent Baraj Gölü (Samsun) su kalitesinin incelenmesi, *Ekoloji çevre dergisi*, 15 (61), 6-15.
- [23]. Turan, F., 2002, Türkiye’nin su ve toprak kaynakları potansiyeli ve gelişimi, *Türkiye mühendislik haberleri*, 420-421-422, 4-6.
- [24]. Akın, M., Akın, G., 2007, Suyun önemi, Türkiye’de su potansiyeli, su havzaları ve su kirliliği, *Ankara üniversitesi dil ve tarih-coğrafya fakültesi dergisi*, 47 (2), 105-118.

- [25]. Atıcı, T., Ahıska, S., 2005, Pollution and algae of Ankara stream, *G.Ü. Fen bilimleri dergisi*, 18 (1), 51-59.
- [26]. Alkan, U., Çalışkan, S., Mescioğlu, Ü., 1999, Uluabat Gölü' nün mikrobiyolojik kirlilik seviyesinin belirlenmesi, *Ekoloji çevre dergisi*, 9 (33), 3-5.
- [27]. Süheri, S., Topak, R., 2005, Konya Ovası'ndaki sulama örgütlerinin işletmecilik yönünden karşılaştırılması, *S.Ü. Ziraat fakültesi dergisi*, 19 (37), 79-86.
- [28]. Ünlü, A., Çoban, F., Tunç, M.S., 2008, Hazar gölü su kalitesinin fiziksel ve inorganik kimyasal parametreler açısından incelenmesi, *Gazi Üni. Müh. Mim. Fak. dergisi*, 23 (1), 119-127.
- [29]. Erkan, M.E., Vural, A., 2006, Dicle Nehri'nin hijyenik kalitesi üzerine bir araştırma, *Dicle tıp dergisi*, 33 (4), 205-209.
- [30]. Ocak, A., Çiçek, A., Zeytinoğlu, H., Mercangöz, A., 2002, Porsuk Çayı suyunun bazı tarım bitkileri üzerindeki ekotoksikolojik etkileri, *Ekoloji çevre dergisi*, 11 (45), 9-13.
- [31]. Güler, Ç., Çobanoğlu, Z., 1994, *Su kirliliği*, Aydoğdu Ofset, Ankara, ISBN: 975-7572-60-8.
- [32]. Koçum, E., 2009, Akarsu ekosistemlerinin ötrofikasyon oluşumuna karşı hassasiyeti: Sarıçay ve Karamenderes örnekleri, *Biyoloji bilimleri araştırma dergisi*, 3 (1), 31-37.
- [33]. Wassmann, P., Olli, K., 2005, *Drainage basin nutrient inputs and eutrophication: An integrated approach*, University of Tromsø, ISBN: 82-91086-36-2.
- [34]. Didinen, H., Boyacı, Ö.Y., Didinen, I.D., 2008, Uygulanmış bazı göl iyileştirme çalışmaları ve sonuçları, *E.Ü. Su ürünleri dergisi*, 25 (2), 173-179.
- [35]. Yağcı, M.A., 2010, Göllerde ötrofikasyon kontrolü ve planktonik gösterge türleri, *Yunus araştırma bülteni*, 10 (1), 11-14.
- [36]. Akköz, C., Güler, S., 2004, Topçu Göleti (Yozgat) alg florası I: Epilitik ve epifitik algler, *S.Ü. Fen Ed. Fak. fen dergisi*, 23, 7-14.
- [37]. Solak, C.N., Barlas, M., Pabuçcu, K., 2007, Akçay'ın (Büyük Menderes-Muğla) *Bacillariophyta* dışındaki epilitik algleri, *Ekoloji çevre dergisi*, 16 (62), 16-22.
- [38]. Nuhoglu, Y., Öymen, T., 1993, Doğu Karadeniz bölgesi (bölümü) su kaynakları kirliliği ile balık popülasyonları arasındaki ilişkinin incelenmesi, *Çevre dergisi*, 6, 28-33.

- [39]. Polat, S., Olgunoğlu, M.P., Aka, A.A., Koray, T., 2006, Kuzeydoğu Akdeniz kıyısı sularında (İskenderun Körfezi) dağılım gösteren potansiyel zararlı fitoplankton türleri, *E.Ü. Su ürünleri dergisi*, 23 (1-2), 169-172.
- [40]. Sönmez, İ., Kaplan, M., Sönmez, S., 2008, Kimyasal gübrelerin çevre kirliliği üzerine etkileri ve çözüm önerileri, *Batı akdeniz tarımsal araştırma enstitüsü derim dergisi*, 25 (2), 24-34.
- [41]. Mur, L.R., Olav M., Skulberg, O.M., Utkilen, H., 1999, *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*, WHO, London, ISBN: 0-419-23930-8.
- [42]. Kahraman, S.D., Küplülü, Ö., 2012, Siyanobakteriler ve toksinleri, *Veteriner hekim derneği dergisi*, 83 (2), 36-47.
- [43]. Ortelli, D., Edde, P., Cognard, E., Jan, P., 2008, Fast screening and quantitation of microcystins in microalgae dietary supplement products and water by liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry, *Analytica chimica acta*, 617, 230-237.
- [44]. Taş, B ve Taş, E., 2007, Mavi-yeşil alglerin evolusyonu (Cyanobacteria) stromatolitler, *Biyoloji eğitiminde evrim sempozyumu*, 3-4 Mayıs 2007, Malatya, 233-242.
- [45]. Chorus, I., Falconer, I.R., Salas, H.J., Bartram, J., 2000, Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters, *Journal of toxicology and environmental health*.
- [46]. Watanabe, M.F., Harada, K., Carmichael, W.W., Fujuki, H.1996, *Toxic microcystis*, CRC Press, Florida, ISBN: 0-8493-7693-9.
- [47]. Sejnohova, L., 2008, *New findings in peptide production, taxonomy and autecology*, Thesis (PhD), Institute of Botany.
- [48]. Chaffin, J.D., 2009, *Physiological ecology of Microcystis blooms in turbid waters of Western Lake Erie*, Thesis (Msc), The University of Toledo.
- [49]. Tonk, L., Bosch, K., Visser, P.M., Huisman, J., 2007, Salt tolerance of the harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, *Aquatic microbial ecology*, 46, 117-123.
- [50]. Van Den Hoek, C., Mann, D.G., Jahns, H.M., 1995, *Algae an introduction to phycology*, Cambridge university press, İngiltere, ISBN:0521 316871.
- [51]. Ettl, H., Gartner, G., Heynig, H., Mollenhauer, D., Komarek, J., Anagnostidis, K., 1999, *Cyanoprokaryota*, Spektrum akademischer verlag GmbH , ISBN: 3-8274-0890-3.

- [52]. Oren, A., 2004, A proposal for further integration of the cyanobacteria under the bacteriological code, *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 54, 1895–1902.
- [53]. Cavalier-Smith, T., 2002, The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52, 7-76.
- [54]. Komarek, J., Komarkova, J., 2002, Review of the european *Microcystis* morphospecies (cyanoprokaryotes) from nature, *Czech phycology, Olomouc*, 2, 1-24.
- [55]. Otsuka, S., Suda, S., Shibata, S., Oyaizu, H., Matsumoto, S., Watanabe, M.M., 2001, A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kutzing ex Lemmermann 1907 under the rules of the bacteriological code, *International Journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51, 873–879.
- [56]. Yoshida, M., Yoshida, T., Kashima, A., Tahashima, Y., Hosoda, N., Nagasaki, K., Hiroishi, S., 2008, Ecological dynamics of the toxic bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and Its cyanophages in freshwater, *Applied and environmental microbiology*, 3269-3273.
- [57]. Tonk, L., Welker, M., Huisman, J., Visser, P.M., 2009, Production of cyanopeptolins, anabaenopeptins, and microcystins by the harmful cyanobacteria *Anabaena* 90 and *Microcystis* PCC 7806, *Harmful algae*, 8, 219-224.
- [58]. Jacoby, J.M., Collier, D.C., Welch, E.B., Hardy, F.J., Crayton, M., 2000, Environmental factors associated with a toxic bloom of *Microcystis aeruginosa*, *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences*. 57, 231–240.
- [59]. Black, K., Yılmaz, M., Phlips, E.J., 2011, Growth and toxin production by *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 (Kutzing) Lemmerman at elevated salt concentrations, *Journal of environmental protection*, 2, 669-674.
- [60]. Welker, M., Dohren, H.V., 2006, Cyanobacterial peptides Nature's own combinatorial biosynthesis, *FEMS microbiology reviews*, 30, 530-563.
- [61]. Yadav, S., Sinha, R.P., Tyagi, M.B., Kumar. A., 2011, Cyanobacterial secondary metabolites, *International journal of pharma and bio sciences*, 2 (B), 144-167.
- [62]. Büber, E., Açıkan, N.L., 2004, Ribozom dışı yolla sentezlenen biyoaktif peptidler, *Hacettepe tıp dergisi*, 35, 43-48.
- [63]. Drobac, D., Tokodi, N., Simeunovic, J., 2013, Human exposure to cyanotoxins and their effects on health, *Archives of industrial hygiene and toxicology*, 64, 305-316.

- [64]. Kaebernick, M., Neilan, B.A., 2001, Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production, *FEMS microbiology ecology*, 35, 1-9.
- [65]. Briand, J., Jacout, S., Bernard, C., Humbert, J., 2003, Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems, *EDP sciences*, 34, 361-377.
- [66]. Zirawell, R.W., Chen, H., Burke, J.M., Prepass, E.E., 2005, Hepatotoxic cyanobacteria: A review of the biological importance of microcystins in freshwater environments, *Journal of toxicology and environmental health*, 8, 1-37.
- [67]. Araöz, R., Nghiem, H., Rippka, R., Palibroda, N., Marsac, N.T., Herdman, M., 2005, Neurotoxins in axenic oscillatorian cyanobacteria : Coexistence of anatoxin-a and homoanatoxin-a determined by ligand-binding assay and GC/MS. *Microbiology*, 151, 1263-1273.
- [68]. Gupta, N., Pant, S.C., Vijayaraghavan, R., Rao, P.V.L., 2002, Growth characteristics and toxin production in batch cultures of *Anabaena flos-aquae*: Effects of culture media and duration, *World journal of microbiology and biotechnology*, 18, 29-35.
- [69]. James, K.J., Furey, A., Sherlock, I.R., Stack, M.A., Twohig, M., Caudwell, F.B., Skulberg, O.M., 1998, Sensitive determination of anatoxin-a, homoanatoxin-a and their degradation products by liquid chromatography with fluorimetric detection, *Journal of chromatography A*, 798, 147-157.
- [70]. Mohamed, Z.A., El-Sharouny, H.M., Ali, W.S.M., 2006, Microcystin production in benthic mats of cyanobacteria in the Nile River and irrigation canals, Egypt, *Toxicon*, 47, 584-590.
- [71]. Teneva, I., Dzhambozov, B., Koleva, L., Mladenov, R., Schirmer, K., 2005, Toxic potential of five freshwater *Phormidium* species (Cyanoprokaryota), *Toxicon*, 45, 711-725.
- [72]. Vasconcelos, V., 2006, Eutrophication, toxic cyanobacteria and cyanotoxins: When ecosystems cry for help, *Asociación española de limnología*, 25 (1-2), 425-432.
- [73]. Aykulu, G., Obalı, O., 1981, Phytoplankton biomass in Kurtboğazı Dam Lake, *Faculty of sciences university of ankara*, C2.24, 29-45.
- [74]. Albay, M., Akçaalan, R., Tüfekçi, H., Metcalf, J.S., Beattie, K.A., Codd, G.A., 2003, Depth profiles of cyanobacterial hepatotoxins (microcystins) in three Turkish freshwater lakes, *Hydrobiologia*, 505, 89-95.
- [75]. Albay, M., Akçaalan, R., Aykulu, G., Tüfekçi, H., Beattie, K.A., Codd, G.A., 2003, Occurrence of toxic cyanobacteria before and after copper sulphate treatment in a water reservoir, Istanbul, Turkey, *Algological studies*, 109, 67-78.

- [76]. Albay, M., Matthiensen, A., Codd, G.A., 2005, Occurrence of toxic blue-green algae in the Kucukcekmece Lagoon (Istanbul, Turkey), *Wiley Periodicals, Inc. Environ Toxicol*, 20, 277–284.
- [77]. Akcaalan, R., Mazur-Marzec, H., Zalewska, A., Albay, M., 2009, Phenotypic and toxicological characterization of toxic *Nodularia spumigena* from a freshwater lake in Turkey, *Harmful Algae*, 8, 273-278.
- [78]. Taş, S., Okuş, E., Yılmaz, A.A., 2006, The blooms of a cyanobacterium, *Microcystis cf. Aeruginosa* in a severely polluted estuary, the Golden Horn, Turkey, *Estuarine coastal and shelf science*, 68, 593-599.
- [79]. Sömek, H., Ustaoglu, M.R., Yağcı, M., 2008, A case report: Algal bloom of *Microcystis aeruginosa* in a drinking-water body, Eğirdir Lake, Turkey, *Turkish journal of fisheries and aquatic sciences*, 8, 177-179.
- [80]. Gürbüz, F., Metcalf, J.S., Karahan, A.G., Codd, G.A., 2009, Analysis of dissolved microcystins in surface water samples from Kovada Lake, Turkey, *Science of the total environment*, 407, 4038–4046.
- [81]. Lahti, K., Rapala, J., Kivimäki, A.L., Kukkonen, J., Niemelä, M., Sivonen, K., 2001, Occurrence of microcystins in raw water sources and treated drinking water of finnish waterworks, *Water science technology*, 43 (12), 225-8.
- [82]. Butler, N., Carlisle, J.C., Linville, R., Weshburn, B., 2009, Microcystins: A brief overview of their toxicity and effects, with special reference to fish, wildlife, and livestock, *California environmental protection agency, Sacramento*, 5.
- [83]. Huang, W.M., Xing, W., Li, D.H., Liu, Y.D., 2008, The Role of glutathione metabolism in tolerance of tobacco BY-2 suspension cells to microcystin-RR, *Bull environ contam toxicol*, 80, 215-219.
- [84]. Bourne, D.G., Jones, G.J., Blakeley, R.L., Jones, A., Negri, A.P., Riddles, P., 1996, Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR, *Applied and environmental microbiology*, 62, 4086-4094.
- [85]. Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., Dohren, H., Borner, T., Neilan, B.A., 2000, Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806: An integrated peptide polyketide synthetase system, *Chemistry and biology*, 7 (10), 753-764.
- [86]. Jayaraj, R., Rao, P.V.L., 2006, Protein phosphorylation profile and adduct formation in liver and kidney of microcystin-LR-treated mice, *Toxicon*, 48, 272-277.

- [87]. Jungblut, A., Hoeger, S.J., Mountfort, D., Fitzfeld, B.C., Dietrich, D.R., Neilan, B.A., 2006, Characterization of microcystin production in an antarctic cyanobacterial mat community, *Toxicon*, 47, 271-278.
- [88]. Baier, W., Loleit, M., Fischer, B., Jung, G., Nuemann, U., Weib, M., Weskesser, J., Koffmann, P., Bessler, W.G., Mittenbuchler, K., 2000, Generation of antibodies directed against the low-immunogenic peptide-toxins microcystin-LR/RR and nodularin, *International journal of immunopharmacology*, 22, 339-353.
- [89]. Nishizawa, T., Asayama, N., Fujii, K., Harada, K., SHIRAI, M., 1999, Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide Microcystin in *Microcystis spp.*, *J.Biochem*, 126, 520-529.
- [90]. Campos, A., Vasconcelas, V., 2010, Molecular mechanisms of Microcystin toxicity in animal cells, *International journal of molecular sciences*, 11, 268-287.
- [91]. Hoger, S.J., 2003, *Problems during drinking water treatment of cyanobacterial-loaded surface waters: Consequences for human health*, Thesis (PhD), Konstanz Üniversitesi, Almanya.
- [92]. Mazur, H., Plinski, M., 2001, Stability of cyanotoxins, microcystin-LR, mmicrocystin-RR and nodularin in seawater and BG-11 medium of different salinity, *Oceanologia*, 43 (3) 329-339.
- [93]. Wannemacher, R. W., 1989, Chemical stability and laboratory safety of naturally occurring toxins. Fort Detrick, Frederick, MD. *US army medical research, institute of infectious disease*.
- [94]. Ho, L., Gaudieux, A., Fanok, S., Newcombe, G., Humpage, A.R., 2007, Bacterial degradation of microcystin toxins in drinking water eliminates their toxicity, *Toxicon*, 50, 438–441.
- [95]. Sorlini, S., Gialdini, F., Collivignarelli, C., 2013, Removal of cyanobacterial cells and microcystin-LR from drinking water using a hollow fiber microfiltration pilot plant, *Desalination*, 309, 106-112.
- [96]. Lee, J.J., 2009, *Removal of Microcystin-Lr from drinking water using adsorption and membrane processes*, Thesis (PhD), The Ohio State University.
- [97]. Figueiredo, D.R., Azeiteiro, U.M., Esteves, S.M., Gonzaler, F.J.M., Pereira, M.J., 2004, microcystin-producing blooms - a serious global public health issue, *Ecotoxicology and environmental safety*, 59, 151-163.
- [98]. Berry, J., 2013, *Cyanobacterial Toxins in Food-Webs: Implications for Human and Environmental Health*, Current Topics in Public Health, In: Morales, A.J.R. (ed), Chapter 24, Intech, Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia, ISBN: 978-953-51-1121-4, 531-589.

- [99]. Yin, L., Huang, J., Li, D., Liu, Y., 2005, Microcystin-RR uptake and its effects on the growth of submerged macrophyte *Vallisneria natans* (Lour.) Hara, *Wiley periodicals, Inc. environ toxicol*, 20, 308–313.
- [100]. Reichwaldt, E.S., Song, H., Ghadouani, A., 2013, Effects of the distribution of a toxic *Microcystis* bloom on the small scale patchiness of zooplankton, *Plos one*, 8 (6), 1-9.
- [101]. Elmacı, A., Obalı, O., 1997, Fitoplankton zooplankton ilişkileri, *Ekoloji çevre dergisi*, 23, 16-20.
- [102]. Albay, M., Akçaalan, R., Gürevin, C., Aykulu, G., 2004, Küçükçekmece Gölü'nde microcystinin dikey dağılımı ve çevresel parametreler ile olan ilişkilerinin incelenmesi, *Küçükçekmece Gölü ve Havzası için çevre yönetim biriminin oluşturulma süreci ve bölgeye katkıları çalıştay*, 20-22 Ekim 2004, İstanbul, 35-40.
- [103]. Jos, A., Pichardo, S., Prieto, A.I., Repetto, G., Vazquez, C.M., Moreno, I., Camean, A.M., 2005, Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.) under laboratory conditions, *Aquatic toxicology*, 72, 261-271.
- [104]. Deore, R.D., Bansal, G.K., 2013, A study on health hazards caused by Microcystins to animal life, *International journal of chemical sciences and applications*, 4, 24-28.
- [105]. Rankin, K.A., Alroy, K.A., Kudela, R.M., Oates, S.C., Murray, M.J., Miller, M.A., 2013, Treatment of cyanobacterial (Microcystin) toxicosis using oral cholestyramine: Case report of a dog from Montana, *Toxins*, 5, 1051-1063.
- [106]. Backer, L.C., Carmichael, W., Hirkpatrick, B., Williams, C., Irwin, M., Zhou, Y., Johnson, T.B., Nierenberg, K., Hill, V. R., Kieszak, S.m., Cheng, Y., 2008, Recreational exposure to low concentrations of Microcystins during an algal bloom in a small lake, *Marine drugs*, 6, 389-406.
- [107]. Benson, J.M., Hutt, J.A., Rein, K., Boggs, S.E., Barra, E.B., Fleming, L.E., 2005, The toxicity of microcystin LR in mice following 7 days of inhalation exposure, *Toxicon*, 45 (6), 691-698.
- [108]. Codd, G.A., 2000, Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control, *Ecological engineering*, 16, 51-60.
- [109]. Fujiki, H., Suganuma, M., 2011, Tumor promoters--microcystin-LR, nodularin and TNF- α and human cancer development, *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 11 (1), 4-18.
- [110]. Nishiwaki-Matsushima, R., Ohta, T., Nishiwaki, S., Suganuma, M., Kohyama, K., Ishikawa, T., Carmichael, W.W., Fujiki, H., 1992, Liver tumor promotion by

- the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR, *Journal of cancer research and clinical oncology*, 118 (6), 420-4.
- [111]. Dawson, R.M., 1998, The toxicology of microcystins, *Elsevier science*, 36 (7), 953-962.
 - [112]. Cohen, Y., Gurevitz, M., 2006, The cyanobacteria - ecology, physiology and molecular genetics, *Prokaryotes*, 4, 1074-1098.
 - [113]. Huisman, J., Matthijs, H.C.P., Visser, P.M., 2005, *Harmful cyanobacteria*, Springer, Netherlands, ISBN: 1-4020-3009-6.
 - [114]. Kang, H., 2012, *Biologically active secondary metabolites from freshwater and terrestrial cyanobacteria*, Thesis (PhD), University of Illinois at Chicago.
 - [115]. Rastogi, R.P., Sinha, R.P., 2009, Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites, *Biotechnology advances, Elsevier*, 27, 521-539.
 - [116]. Pan, H., Song, L., Liu, Y., Borner, T., 2002, Detection of hepatotoxic *Microcystis* strains by PCR with intact cells from both culture and environmental samples, *Archives Microbiology*, 178, 421-427.
 - [117]. Neilan, B.A., Dittmann, E., Rouhiainen, L., Bass, R.A., Schaub, V., Sivonen, K., Borner, T., 1999, Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria, *Journal of bacteriology*, 181, 4089-4097.
 - [118]. Janse, I., Kardinaal, W.E.A., Meima, M., Fastner, J., Visser, P.M., Zwart, G., 2004, Toxic and nontoxic *Microcystis* colonies in natural populations can be differentiated on the basis of rRNA gene internal transcribed spacer diversity, *Applied and environmental microbiology*, 70, 3979-3987.
 - [119]. Gülbenzer, S., Ökmen, G., 2012, Ozmotik koruyucular ve mikroorganizmalar, *Türk bilimsel derlemeler dergisi*, 5 (1), 41-52.
 - [120]. Herrero, A., 2008, *The cyanobacteria*, Caister Academic Press, Norfolk, UK, ISBN: 978-1-904455-15-8.
 - [121]. Landsberg, J.H., 2002, The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms, *Reviews in fisheries science*, 10 (2), 113-390.
 - [122]. Imai, H., Chang, K.H., Nakano, S.I., 2009, Growth Responses of Harmful Algal Species *Microcystis* (Cyanophyceae) under various environmental conditions. interdisciplinary studies on environmental chemistry, *Environmental research in asia*, 269-275.
 - [123]. Wang, C., Kong, H., Wang, X., Wu, H., Lin, Y., He, B., 2010, Effects of iron on growth and intracellular chemical of *Microcystis aeruginosa*, *Biomedical and environmental sciences*, 23, 48-52.

- [124]. Paczuska, L., Kosakowska, A., 2003, Is iron a limiting factor of *Nodularia spumigena* blooms, *Oceanologia*, 45 (4), 679-692.
- [125]. Katoh, H., Hagino, N., Grossman, A.R., Ogawa, T., 2001, Genes essential to iron transport in the cyanobacterium *synechocystis* sp. strain pcc 6803, *Journal of bacteriology*, 183 (9), 2779-2784.
- [126]. Katoh, H., Hagino, N., Grossman, A.R., Ogawa, T., 2000, A Gene of *synechocystis* sp. strain PCC 6803 encoding a novel, *Journal of bacteriology*, 182 (22), 6523-6524.
- [127]. Fujii, M., Dang, T.C., Rose, A.L., Omura, T., Waite, T.D., 2011, Effect of light on iron uptake by the freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, *Environmental science and technology*, 45, 1391–1398.
- [128]. Dang, T.C., Fujii, M., Rose, A.L., Bligh, M., Waite, T.D., 2012, Grown in iron-limited continuous culture cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* characteristics of the freshwater, *Applied and environmental microbiology*, 78 (5), 1574-1583.
- [129]. Fujii, M., Dang, T.C., Rose, A.L., Omura, T., Waite, T.D., 2011, Iron uptake by toxic and nontoxic strains of *microcystis aeruginosa*, *Applied and environmental microbiology*, 77 (19), 7068–7071.
- [130]. Wilson, A., Bouley, C., Wilde, A., Kerfeld, C.A., Kirilovsky, D., 2007, Light-induced energy dissipation in iron-starved cyanobacteria: Roles of OCP and IsiA proteins, *The plant cell*, 19, 656-672.
- [131]. Wase, N.V., Yen, S.O., Wright, P.C., 2005, A global understanding of light Stress in cyanobacteria: environmental and bioproducts perspectives, *Stress biology of cyanobacteria*, 14, 273-290.
- [132]. Utkilen, H., Gjølme, N., 1992, Toxin production by *Microcystis aeruginosa* as a function of light in continuous cultures and its ecological significance, *Applied and environmental microbiology*, 58 (4), 1321-1325.
- [133]. Raps, S., Wyman, K., Siegelman, H.W., Falkowski, P.G., Adaptation of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to light intensity, *Plant physiol*, 72, 829-832.
- [134]. Straub, C., Quillardet, P., Vergalli, J., Marsac, N.T.D., Humbert, J.F., 2011, A day in the life of *Microcystis aeruginosa* strain PCC 7806 as revealed by a transcriptomic analysis, *Plos one*, 6 (1), 1-12.
- [135]. Kaebernick, M., Neilan, B.A., Boerner, T., Dittmann, E., 2000, Light and the transcriptional response of the Microcystin biosynthesis gene cluster, *Applied and environmental microbiology*, 66 (8), 3387-3392.

- [136]. Rapala, J., Sivonen, K., Lyra, C., Niemelae, S.I., 1997, Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena spp.* as a function of growth stimuli. *Applied and environmental microbiology*, 63, 2206–2212.
- [137]. Wiedner, C., Visser, P.M., Fastner, J., Metcalf, J.S., Codd, G.A., Mur, L.R., 2003, Effects of light on the Microcystin content of *Microcystis* strain PCC 7806, *Applied and environmental microbiology*, 1475–1481.
- [138]. Dworkin, M., Falkow S., Rosenberg, E., Schleifer, K., Stackebrandt, E., 2006, *The prokaryotes*, Springer science and business media, Singapore, ISBN-10: 0-387-30743-5.
- [139]. Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J., Herdman, M., Stanier, R., 1979, Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria, *Journal of general microbiology*, 111, 1-61.
- [140]. Neilan, B.A., 2002, The molecular evolution and DNA profiling of toxic Cyanobacteria, *Current issues in molecular biology*, 4, 1-11.
- [141]. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989, *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Newyork, ISBN: 0-87969-576-5.
- [142]. Moreira, C., Martins, A., Moreira, C., Vasconcelos, V., 2011, Toxigenic cyanobacteria in volcanic lakes and hot springs of a North Atlantic Island, *Fresenius environmental bulletin*, 20 (2a), 420-426.
- [143]. Freangeul, L., Quillardet, P., Castets, A.M., Humbert, J.F., Matthijs, H.C.P., Cortez, D., Tolonen, A., Zhang, C., Gribaldo, S., Kehr, J., Zilliges, Y., Ziemert, M., Becker, S., Talla, E., Latifi, A., Billaut, A., Lepelletier, A., Dittmann, E., Bouchier, C., Marsac, N.T., 2008, Highly plastic genome of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, a ubiquitous toxic freshwater cyanobacterium, *BMC genomics*, 9, 1-60.
- [144]. Kosakowska, A., Nedzi, M., Pempkowiak, J., 2007, Responses of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to iron and humic substances, *Plant physiol biochem*, 45 (5), 365-70.
- [145]. Wilde, F.D., 2004, *Handbooks for Water-Resources Investigations*, Book 9, U.S. Geological Survey TWRI, Chapter A3. (Version 2.0, 4/2004).
- [146]. Ivanov, A.G., Krol, M., Sceshnikov, D., Selstam, E., Sandström, S., Koochek, M., Park, Y., Vasil'ev, S., Bruce, D., Huner, N.P.A., 2006, Iron deficiency in cyanobacteria causes monomerization of photosystem i trimers and reduces the capacity for state transitions and the effective absorption cross section of photosystem i in vivo, *American society of plant biologists*, 141, 1436-1445.

- [147]. Jiang, H., Lou, W., Du, H., Price, N. M., Qiu, B., 2012, Sll 1263, a unique cation diffusion facilitator protein that promotes iron uptake in the cyanobacterium *synechocystis* sp. strain pcc 6803, *Plant cell physiology*, 53 (8), 1404-1417.
- [148]. Nowack, B., Sigg, L., 1996, Adsorption of EDTA and metal-EDTA complexes onto goethite, *Journal of colloid and interface science*, 177 (11), 106-121.
- [149]. Shcolnick, S., Shaked, Y., Keren, N., 2007, A role for mrgA, a DPS family protein, in the internal transport of Fe in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803, *Biochimica et biophysica acta*, 1767, 814-819.
- [150]. Utkilen, H., Gjölme, N., 1995, Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*, *Applied and environmental microbiology*, 61 (2), 797.
- [151]. Efteland, S.P., 2004, *The effects of iron on growth and physiology of the cyanobacterium Microcystis aeruginosa*, Thesis (Msc), University of Tennessee, Knoxville.
- [152]. Öngen, B., 2009, *Laboratuvarlarda DAS uygulamaları*, 6. Ulusal sterilizasyon dezenfeksiyon kongresi, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul, 361-386.
- [153]. Keller, M.D., Bellows, E.K., Guillard, R.R.L., 1988, Microwave treatment for sterilization of phytoplankton culture media, Elsevier Science Publishers B.V., 117, 279-283.
- [154]. Keren, N., Aurora, R., Pakrasi, H.B., 2004, Critical roles of bacterioferritin in iron storage and proliferation of cyanobacteria, *American society of plant biologists*, 135, 1666-1673.
- [155]. Dağlı, S., 2012, *Tehlikeli atık yönetimi eğitimi*, *Tehlikeli atıkların belirlenmesinde uygulanacak analizler*, 28 Kasım 2012, Eresin hotel, İstanbul, Gebze, Kocaeli, Tübitak Marmara araştırma merkezi, 1-13.
- [156]. Guillard, R.R., Sieracki, M.S., 2005, *Counting cells in cultures with the light microscope*, Algal culturing techniques, In: Cynar, F. (ed), Chapter 16, Elsevier Inc., China, ISBN: 0-12-088426-7.
- [157]. Nusch, E.A., 1980, Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination, *Arch. Hydrobiol. Ergebn. Limnol.*, 14, 14-36.
- [158]. Maniatis, T., Sambrook, J., Fritsch, E., 1982, *Molecular cloning a laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Harbour, Newyork, ISBN: 0-87969-576-5.
- [159]. Sümer, H., 2008, *Nokta mutasyonlarının saptanmasında yüksek çözünürlüklü erime tekniğinin verim ve hassasiyetinin değerlendirilmesi*, Thesis (Msc), Ankara üniversitesi biyoteknoloji enstitüsü.

- [160]. Esmaeilian, Y., 2010, *Fare ovaryumu kök hücrelerinin real time-pcr ve immünhistokimyasal yöntemlerle araştırılması*, Thesis (Msc), Ankara üniversitesi biyoteknoloji enstitüsü.
- [161]. Yüzbaşıoğlu, A., 2008, *Dejenerasyon sürecindeki kas dokusunda housekeeping genlerin ekspresyon düzeyinin incelenmesi*, Thesis (Msc), Ankara üniversitesi biyoteknoloji enstitüsü.
- [162]. Kurmayer, R., Kutzenberger, T., 2003, Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis sp.*, *Applied and environmental microbiology*, 69 (11), 6723-6730.
- [163]. Ginn, H.P., Pearson, L.A., Neilan, B.A., 2010, NtcA from *Microcystis aeruginosa* pcc 7806 is autoregulatory and binds to the microcystin promoter, *Applied and environmental microbiology*, 76 (13), 4362-4368.
- [164]. Çakiris, A., 2006, *Ailevi Akdeniz Ateşi'ne bağlı inflamatuvar ataklarda asc, casp-1 ve IL-1B genlerinin ekspresyonlarının incelenmesi*, Thesis (Msc), Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi.
- [165]. Marzec, H.M., Matusiak, G.B., Forcyka, K., Kobos, J., Plinski, M., 2010, Morphological, genetic, chemical and ecophysiological characterisation of two *Microcystis aeruginosa* isolates from the Vistula Lagoon, southern Baltic, *Oceanologia*, 52(1), 127-146.
- [166]. Pan, H., Song, L., Liu, Y., Borner, T., 2002, Detection of hepatotoxic *Microcystis* strains by PCR with intact cells from both culture and environmental samples, *Archives microbiology*, 178, 421-427.
- [167]. Saker, M.L., Vale, M., Kramer, D., Vasconcelos, D.M., 2007, Molecular techniques for the early warning of toxic cyanobacteria blooms in freshwater lakes and rivers, *Applied microbiology and biotechnology*, 75, 441-449.
- [168]. Qiu, Y., Yuan, T., Kon, T., Zurawell, R., Huang, Y., Graham, M., Gabos, S., Pang, X., 2013, Rapid detection and quantitation of microcystin-producing *microcystis* using real-time pcr, *Molecular biomarkers & diagnosis*, S5, 1-7.
- [169]. Yoshida, M., Yoshida, T., Takashima, Y., Hosoda, N., Hiroishi, S., 2007, Dynamics of microcystin-producing and non-microcystin producing *Microcystis* populations is correlated with nitrate concentration ina Japanese lake, *Federation of european microbiological societies*, 266, 49-53.
- [170]. Valerio, E., Chambel, L., Paulina, S., Faria, N., Pereira, P., Tenreiro, R., 2009, Multiplex PCR for detection of microcystins-producing cyanobacteria from freshwater samples, *Environmental toxicology*, 1-10.

- [171]. 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, *Microbial ecology*, 43, 107-118.
- [172]. Wilson, A.E., Sarnelle, O., Neilan, B.A., Salmon, T.P., Gehringer, M.M., Hay, M.E., 2005, Genetic variation of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* within and among lakes: Implications for harmful algal blooms, *Applied of environmental microbiology*, 71 (10), 6126-6133.
- [173]. Pearson, L.A., Hisbergues, M., Börner, T., Dittmann, E., Neilan, B.A., 2004, Inactivation of an ABC transporter gene, *mcyH*, results in loss of microcystin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, *Applied of environmental microbiology*, 70 (11), 6370-6378.
- [174]. Gagala, I., Izydorczyk, K., Jurczak, T., Pawelczyk, J., Dziadek, J., Wojtal-Frankiewicz, A., Józwik, A., Jaskulska, A., Mankiewicz-Boczek, J., 2014, Role of environmental factors and toxic genotypes in the regulation of microcystins-producing cyanobacterial blooms, *Microbial ecology*, 67 (2), 465-479.
- [175]. Boopathi, T.K.J., 2014, Impact of environmental factors on the regulation of cyanotoxin production, *Open access toxins*, 6, 1951-1978.
- [176]. Al-Shehri, A.M., 2010, Toxin-producing blooms of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in rainwater ponds in Saudi Arabia, *Institute of Oceanography*, 39 (4), 171-187.
- [177]. Hartnell, D., 2013, *Growth autoinhibition in the cyanobacterium, Microcystis aeruginosa (PCC 7806) as a research target for novel control strategies*, Thesis (PhD), Bournemouth University, UK.
- [178]. Lax, J.E.M., Arteni, A.A., Boekema, E.J., Pistorius, E.K., Michel, K.P., Rögner, M., 2007, Structural response of Photosystem 2 to iron deficiency: characterization of a new photosystem 2–IdiA complex from the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, *Biochim biophys acta*, 1767, 528–534.
- [179]. Boekema, E.J., Hifney, A., Yakushevskaya, A.E., Piotrowski, M., Keegstra, W., Berry, S., 2001, A giant chlorophyll–protein complex induced by iron deficiency in cyanobacteria, *Nature*, 412, 745–748.
- [180]. Kaneko, T., Nakajima, N., Okamoto, S., Suzuki, I., Tanabe, Y., Tamaoki, M., Nakamura, Y., Kasai, F., Watanabe, A., Kawashima, K., Kishida, Y., Ono, A., Shimizu, Y., Takahashi, C., Minami, C., Fjishiro, T., Kohara, M., Katoh, M., Nakazaki, N., Nakayama, S., Yamada, M., Tabata, S., Watanabe, M.M., 2007, Complete genomic structure of the bloom-forming toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* NIES-843, *DNA research*, 14, 247-256.

- [181]. Rodas, L.V., Costa, E., 1997, Characterization of morphospecies and strains of microcystis (cyanobacteria) from natural populations and laboratory clones using cell probes (lectins and antibodies), *Journal of phycology*, 33, 446-454.
- [182]. Lyra, C., Suomalainen, S., Gugger, M., Vezie, C., Sundman, P., Paulin, L., Sivonen, K., 2001, Molecular characterization of planktic cyanobacteria of *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* and *Planktothrix* genera, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 513-526.
- [183]. Held, P., 2011, Monitoring of algal growth using their intrinsic properties, *Biofuel research*, 1-5.
- [184]. Phelan, R. R., 2009, *A potential biological role for microcystin in photosynthesis in microcystis aeruginosa*, Thesis (PhD), Mandela Metropolitan University.
- [185]. Briand, E., Bormans, M., Quiblier, C., Salençon, M., Humbert, J., 2012, Evidence of the cost of the production of microcystins by *Microcystis aeruginosa* under differing light and nitrate environmental conditions, *Plos one*, 7 (1), e29981.
- [186]. Taa, B.Y., Mao, X., Huc, J., Mok, H.O.L., Wang, L.N., Aub, D.W.T., Zhud, J., Zhanga, X., 2013, Mechanisms of photosynthetic inactivation on growth suppression of *Microcystis aeruginosa* under UV-C stress, *College of architecture and environment*, 10, 1016-1025.
- [187]. Tewari, R.K., Kumar, P., Neetu, Sharma, P.N., 2005, Signs of oxidative stress in the chlorotic leaves of iron starved plants, *Plant science*, 169, 1037–1045.
- [188]. Bradley, F.M., Janes, H.W., 1985, Carbon partitioning in tomato leaves exposed to continuous light, *Acta horticulturae*, 174, 293-302.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Dilek SEVER KAYA
Uyruğu	T.C.
Doğum tarihi, Yeri	1979, İstanbul
Telefon	0532 397 07 08
E-mail	dsever@istanbul.edu.tr
Web adres	-

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Doktora	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/ Su Ürünleri Temel Bilimleri /İçsular Biyolojisi Programı	2014
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/ Su Ürünleri Temel Bilimleri / İçsular Biyolojisi Programı	2008
Lisans	İ.Ü. Biyoloji Bölümü İ.Ü. Su Ürünleri Fakültesi	2005 2004
Lise	Şehremini Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi	1997