

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**YÖRESEL KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN YEŞİL
MİKROALG *CHLORELLA* sp. VE SİYANOBAKTERİ
OSCILLATORIA AMPHIBIA' NİN ÇEŞİTLİ
EKSTRAKTLARININ FARMAKOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

Fethiye Ferda YILMAZ KÖZ

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 401.01.04

Sunuş tarihi: 30/01/2009

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Güven ÖZDEMİR

Bornova-İzmir

2009

Fethiye Ferda YILMAZ KÖZ tarafından **DOKTORA** tezi olarak sunulan **“Yöresel Kaynaklardan İzole Edilen Yeşil Mikroalg *Chlorella* sp. ve *Oscillatoria amphibia*’nın Çeşitli Ekstraktlarında Farmakolojik Aktivitenin İncelenmesi”** başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 30/01/2009 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Doç. Dr. Güven ÖZDEMİR

Raportör Üye : Doç. Dr. Meltem CONK DALAY

Üye : Prof Dr. İsmail KARABOZ

Üye : Yrd. Doç. Dr. H. Halil BIYIK

Üye : Yrd. Doç. Dr. Kubilay METİN

ÖZET

**YÖRESEL KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN *CHLORELLA* sp.
VE SİYANOBAKTERİ *OSCILLATORIA AMPHIBIA*’ NIN
ÇEŞİTLİ EKSTRAKTLARININ FARMAKOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

YILMAZ KÖZ, Fethiye Ferda

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Güven ÖZDEMİR

Ocak 2009, 173 sayfa

Günümüzde doğal ürünlerin araştırılması, biyolojik olarak aktif yeni kaynakların keşfedilmesi ve geliştirilmesi bakımından büyük önem taşımaktadır. Tez çalışmamızda ülkemizin göllerinden izole edilen *Chlorella* sp. (Salda Göl’ ü) ve *Oscillatoria amphibia* (Acı Göl)’ nın bazı farmakolojik aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır. Belirlenen türlerin optimum koşullarda üretimi yapılmış ve Sokslet ekstraktöründe aseton, kloroform, etanol, hekzan, diklorometan, metanol ekstraktları ile Klevenger cihazında uçucu yağ ekstraktları hazırlanmıştır.

Gaz Kromatografi/Kütle Spektrometresi (GK/KS) analizlerinde *Chlorella* sp. uçucu yağında bulunan maddeler % 92,21 oranında tanımlanmış, temel bileşenler; nitrik asit, 2-metilpropil ester (% 51,11) ve fitol (% 29,84) olarak belirlenmiştir. *O. amphibia* uçucu yağında bulunan maddeler % 70,0 oranında tanımlanmış, temel bileşenler; nitrik asit, 2-metilpropil ester (% 22,62) ve sikloheksilheptadekan (% 12,87) olarak belirlenmiştir.

VI

Chlorella sp.’nin fenolik bileşikler bakımından zengin olduğu belirlenen metanol ve etanol ekstralarının 2,2’-azinobis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit (ABTS) radikal katyon dekolorizasyon metoduna göre en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. β -karoten renk açılması metoduna göre metanol, 2,2-difenil-2-pikrilhidrazil hidrat (DPPH) radikal süpürme metoduna göre ise etanol ekstralarının en yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. *O. amphibia*’nın fenolik bileşiklerce zengin olduğu belirlenen kloroform ekstresinin DPPH metodu hariç tüm antioksidan aktivite testlerinde en yüksek aktiviteyi gösterdiği bulunmuştur. *Chlorella* sp. ve *O. amphibia*’nın tüm çözen ekstralarının bütil hidroksi toluen (BHT) ve E vitaminine göre düşük veya orta düzeyde antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Total fenolik bileşiklerin miktarı Folin-Ciocalteu reaktifi ile galik asit standart eğrisine göre belirlenmiştir.

Antimikrobiyal etki çözen ekstralarında disk difüzyon ve mikrodilüsyon metotları ile standart antibiyotiklerle karşılaştırılarak araştırılmıştır. Disk difüzyon metoduna göre *Chlorella* sp.’nin tüm ekstralarının Gram pozitif mikroorganizmalar üzerinde etkili olduğu, *O. amphibia*’nın sadece hekzan ekstresinin hem Gram pozitif hem de Gram negatif mikroorganizmalar üzerinde etkili olduğu gözlenmiştir. Mikrodilüsyon test sonuçlarına göre ise ekstraların tüm ekstraların Gram pozitif ve Gram negatif ve mikroorganizmalar üzerinde etkilerinin olduğu görülmüştür.

Çözen ekstralarının analjezik ve antiinflamatuvar aktiviteleri morfinle karşılaştırılarak formalin testi ile akut toksisiteleri ise limit test

VII

yöntemi ile Swiss albino farelerde araştırılmıştır. *Chlorella* sp.' nin aseton ve kloroform ekstreleri morfinle karşılaştırıldığında hem akut hem de inflamatuvar fazda oldukça iyi aktivite göstermiş, sadece diklorometan ekstresi her iki fazda da etkili bulunmamıştır. *O. amphibia*' nin aseton ve diklorometan ekstreleri hem akut fazda hem de inflamatuvar fazda etkili bulunmuş, metanol ekstresi ise her iki fazda da en düşük aktiviteyi göstermiştir. *Chlorella* sp. ekstrelerinde akut toksisite gözlenmemiştir. *O. amphibia*' nin etanol ekstresi dışındaki ekstrelerinin akut toksisitesi gözlenmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Mikroalgler, siyanobakteriler, farmakolojik aktivite, ekstre, uçucu yağ, *Chlorella*, *Oscillatoria*.

ABSTRACT

**PHARMACOLOGIC ACTIVITY INVESTIGATION IN VARIOUS
EXTRACTS OF GREEN MICROALGA, *CHLORELLA* sp. AND
CYANOBACTERIUM, *OSCILLATORIA AMPHIBIA* ISOLATED
FROM LOCAL SOURCES**

YILMAZ KÖZ, Fethiye Ferda

Doctorate Thesis Biology Department

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR

January, 2009, 173 pages

Today, natural product researches are of great importance for discovering and improving new biologically active sources. In our thesis study, it was aimed to investigate some pharmacologic activities in the extracts of *Chlorella* sp. (Lake Salda) and *Oscillatoria amphibia* (Lake Acigöl) isolated from lakes in our country. Firstly, the selected isolates were cultivated under optimum conditions, at the end of the stationary growth phase they were harvested and extracted by Soxhlet apparatus with acetone, chloroform, ethanol, dichloromethane, hexane, methanol, and a Clevenger-type apparatus for obtaining volatile components.

Compounds of the essential oil from *Chlorella* sp. were identified by Gas Chromatography/Mass spectrometry (GC/MS) analysis at the rate of 92.21 %, and the main compounds were determined as; nitric acid, 2-methylpropyl ester (51.11 %) and phytol (29.84 %). Compounds of the

IX

volatile oil from *O. amphibia* were determined at the rate of 70.0 %, and the main components were defined as nitric acid, 2-methylpropyl ester (22.62 %) and cyclohexylheptadecane (12.87 %).

The methanol and ethanol extracts of *Chlorella* sp. were found as rich in phenolic compounds and showed the highest antioxidant activity, according to the 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical cation decolorisation method. It was seen that while the methanol extract had the best activity considering β carotene bleaching method, the ethanol extract exert the highest activity to the 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazil hydrate (DPPH) radical scavenging activity method when compared with the other extracts. The chloroform extracts of *O. amphibia* were found as rich in phenolic compounds and had the highest antioxidant activity at all the antioxidant activity tests, except the DPPH method. It was seen that all the solvent extracts of *Chlorella* sp. and *O. amphibia* had middle or little activity as compared to the synthetic antioxidants butylated hydroxy toluene (BHT) and vitamin E. The amounts of fenolic contents of the extracts were determined by Folin-Ciocalteau reagent according to a gallic acid standard curve.

Antimicrobial activities of the solvent extracts were investigated by disc diffusion method and microdilution method comparing standart antibiotics. To the disc diffusion method, all the solvent extracts of *Chlorella* sp. were found as active on the Gram positive microorganisms, while only the hexane extracts of *O. amphibia* were found as active against both Gram positive and Gram negative microorganisms. In addition, all the extracts were found as antimicrobially active on Gram

positive and Gram negative microorganisms in respect of the microdilution test results.

Analgesic and antiinflammatory activities of the solvent extracts were analysed by formalin test as compared to the morphine and acute toxicities were determined by limit test in Swiss albino mice. The acetone and the chloroform extracts of *Chlorella* sp. exerted considerably good inhibitory activity for acute phase and also inflammatory phase of the pain, the dichloromethane extracts were only found as ineffective both two phases of the pain. The acetone and dichloromethane extracts of *O. amphibia* were found as operative on both the acute phase and inflammatory phase of the pain, methanol extracts exerted the smallest activity on both two phases of the pain. Acute toxicity of the *Chlorella* sp. solvent extracts was not observed. Except the ethanol extracts of *O. amphibia*, acute toxicity was not observed.

Key Words: Microalgae, cyanobacteria, pharmacologic activity, extract, volatile oil, *Chlorella*, *Oscillatoria*.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada öncelikle, bilgi, tecrübelerini benimle paylaşan, yardım ve destekleriyle her zaman yanımda olan tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Güven ÖZDEMİR' e ve Tez İzleme Komitesi Üyeleri Sayın Prof. Dr. İsmail Karaboz'a (Ege Üniv. Fen Fak. Biyoloji Bölümü), Sayın Doç. Dr. Meltem CONK DALAY' a (Ege Üniv. Mühendislik Fak. Biyomühendislik Bölümü) çok teşekkür ederim. Ayrıca çalışmanın çeşitli aşamalarında büyük yardımlarını aldığım Sayın Doç. Dr. Nefise Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU' ya (Ege Üniv. Fen Fak. Biyoloji Bölümü, Yrd. Doç. Dr. Remziye Deveci'ye (Ege Üniv. Fen Fak. Biyoloji Bölümü), Ege Üniv. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü doktora öğrencileri Uzm. Biyolog Zeliha DEMİREL, Uzm. Biy. Gönenç AKYAR, Uzm. Biy. Ebru TEKİN ve Uzm. Biy. Özge KAHRAMAN'a ve desteklerini esirgemeyen tüm Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü çalışanlarına teşekkür ederim. Ayrıca Uzm. Biyokim. Ebru MANAV'a, Araş. Gör. Esra İMAMOĞLU' ya (Ege Üniv. Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü), bu çalışmanın gerçekleşmesi için imkan ve ortam sağlayarak büyük katkıda bulunan Ege Üniv. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Sanver EKMEKÇİ' ye ve Ege Üniv. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı eski Başkanı Sayın Prof. Dr. Güner COŞAR' a, ayrıca beni daima destekleyen aileme, eşime ve emeği geçen herkese çok teşekkür ederim.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (2004/Fen/034).

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VIII
TEŞEKKÜR.....	XI
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	XIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XVI
ÇİZELGELER DİZİNİ	XVIII
1 GİRİŞ	1
2 LİTERATÜR ÖZETİ.....	12
2.1 Mikroalg ve siyanobakterilerin genel özellikleri	12
2.1.1 Siyanobakterilerde hücre yapısı	12
2.1.2 Mikroalglerde hücre yapısı	14
2.2 Elde edilen doğal ürünler	14
2.2.1 Tıp ve eczacılık alanında kullanılan ürünler	17
2.2.2 Vitaminler, karotenoidler ve yağ asitleri.....	24
2.2.3 Toksik etkili bileşikler.....	26
2.3 Mikroalgal biyoteknoloji.....	27
2.3.1 Kültür sistemleri ve sınıflandırılması.....	30
2.3.2 Kültür koşulları	35
2.3.3 Kültürlerde büyümenin izlenmesi.....	40
2.4 Çözgen ekstraksiyonu ve uçucu yağlar	42
2.5 Gaz kromatografi ve kütle spektroskopisi	45
2.6 Farmakolojik aktivitenin araştırılması	45
2.6.1 Antimikrobiyal aktivite testleri	45

İÇİNDEKİLER(devam)

2.6.2	Antioksidan aktivite testleri	46
2.6.3	Analjezik ve antiinflamatuvar etki	49
2.6.4	Toksisite testleri	56
3	MATERYAL ve METOT	59
3.1	Mikroalg ve siyanobakteri kültürleri	59
3.1.1	Kültürü yapılan organizmalar	59
3.1.2	Kültür ortamları ve kimyasallar	62
3.1.3	Stok kültür hazırlama	64
3.1.4	Kültür sisteminin hazırlanması	65
3.1.5	Büyümenin ölçülmesi	66
3.2	Ekstrelerin hazırlanması	70
3.2.1	Organik çözümlerle ekstraksiyon	71
3.2.2	Hidrodistilasyon ile uçucu yağ ekstraksiyonu	73
3.3	Uçucu yağlarda Gaz kromatografi ve kütle spektroskopisi (GK-KS) analizi	74
3.4	Çözgen ekstrelerinin aktivite testleri	75
3.4.1	Antioksidan aktivite testleri	75
3.4.2	Antimikrobiyal aktivite testleri	80
3.4.3	Formalin pençe testi ve akut toksisite	86
3.5	Denemelerde kullanılan araçlar ve ekipmanlar	89
4	BULGULAR	91
4.1	Büyüme eğrileri	91
4.1.1	<i>Chlorella</i> sp. büyüme eğrileri	91
4.1.2	<i>O. amphibia</i> büyüme eğrileri	93

İÇİNDEKİLER(devam)

4.1.3	Kültürlerin spesifik büyüme hızı (μ) ve ikilenme zamanı(DT)	96
4.2	Elde edilen ekstrelerin verimi	97
4.3	GK/KS analiz sonuçları.....	98
4.4	Antioksidan aktivite sonuçları	100
4.5	Antimikrobiyal aktivite sonuçları	107
4.6	Formalin testi sonuçları.....	117
4.7	Akut toksisite sonuçları.....	123
5	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	124
6	ÖNERİLER.....	140
	KAYNAKLAR DİZİNİ	145
	ÖZGEÇMİŞ	168

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Sümerce ilaç reçetesi	1
Şekil 1.2 Baltık Denizi'nde aşırı mikroalgal çoğalma	10
Şekil 2.1 Akrilik asit	21
Şekil 2.2 Texcoco Göl'ü	31
Şekil 2.3 Açık havuzlarda üretim	32
Şekil 2.4 Karboylarda <i>Spirulina</i> üretimi, Adana, Türkiye	33
Şekil 2.5 Polietilen torbalarda üretim	33
Şekil 2.6 <i>Chlorella</i> üretimi yapan Klötze Tesisi, Almanya	34
Şekil 2.7 Klötze Tesisi (tübüler sistem)	34
Şekil 2.8 Fotobiyoreaktörde <i>Porphyridium</i> sp. üretimi	34
Şekil 2.9 Mikroalgal kültürlerde büyüme kinetiği	41
Şekil 3.1 <i>Chlorella</i> sp mikroskopdaki görünüşleri	60
Şekil 3.2 <i>O. amphibia</i> 'nın mikroskopdaki görünüşleri	61
Şekil 3.3 Stok kültür hazırlama	64
Şekil 3.4 Kültür sistemi	65
Şekil 3.5 Neubauer sayım kamerası	68
Şekil 3.6 Liyofilizatör	70
Şekil 3.7 Liyofilizatörde kurutulmuş örnekler	70
Şekil 3.8 Sokslet ekstraktörü	71
Şekil 3.9 Rotary evaporatör	72
Şekil 3.10 Klevenger cihazında uçucu yağ ekstraksiyonu	73
Şekil 3.11 GK-KS cihazı şematik gösterimi	74
Şekil 3.12 DPPH radikali ve antioksidan bileşik arasındaki reaksiyon ..	76

XVII

ŞEKİLLER (devam)

Şekil 3.13 β -karoten	79
Şekil 3.14 Disk difüzyon testi	84
Şekil 3.15 Mikrodilüsyon metodu.....	85
Şekil 3.16 Swiss albino fareler	87
Şekil 3.17 Formalin testi	88
Şekil 4.1 <i>Chlorella</i> sp. büyüme eğrileri	93
Şekil 4.2 <i>O. amphibia</i> büyüme eğrileri	96
Şekil 4.3 Total fenolik bileşik miktarını belirlemek için kullanılan standart eğri.....	106
Şekil 4.4 <i>Chlorella</i> sp. formalin testi sonuçları.....	120
Şekil 4.5 <i>O. amphibia</i> formalin testi sonuçları	123

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Kültürü yapılan organizmaların genel özellikleri	59
Çizelge 3.2 Rudic Ortamı (RD) (Rudic and Dudnicenco, 2000).	62
Çizelge 3.3 Modifiye Erdschreiber Ortamı (EM) (Provasoli, 1971).	63
Çizelge 4.1 Büyüme eğrilerine göre spesifik büyüme hızı (μ) ve ikilenme zamanı (doubling time-DT).	97
Çizelge 4.2 <i>Chlorella</i> sp. ve <i>O. amphibia</i> ekstralarının verimleri	98
Çizelge 4.3. <i>Chlorella</i> sp. uçucu yağ bileşenleri	99
Çizelge 4.4 <i>O. amphibia</i> uçucu yağ bileşenleri	99
Çizelge 4.5 DPPH metoduna göre antioksidan aktivite.....	103
Çizelge 4.6 ABTS metoduna göre antioksidan aktivite.....	104
Çizelge 4.7 β -karoten metoduna göre antioksidan aktivite.....	105
Çizelge 4.8 Total fenolik bileşik miktarı	106
Çizelge 4.9 <i>Chlorella</i> sp. aseton, etanol, hekzan ekstralarının disk difüzyon testi sonuçları.....	109
Çizelge 4.10 <i>Chlorella</i> sp. kloroform, metanol, diklorometan ekstralarının disk difüzyon testi sonuçları	110
Çizelge 4.11 <i>O. amphibia</i> aseton, etanol, hekzan ekstralarının disk difüzyon testi sonuçları.....	111
Çizelge 4.12 <i>O. amphibia</i> kloroform, metanol, diklorometan ekstralarının disk difüzyon testi sonuçları	112
Çizelge 4.13 <i>Chlorella</i> sp. aseton, etanol, hekzan ekstralarının mikrodilüsyon testi sonuçları.....	113

XIX

ÇİZELGELER(devam)

Çizelge 4.14 <i>Chlorella</i> sp. kloroform, metanol, diklorometan ekstrelerinin mikrodilüsyon testi sonuçları	114
Çizelge 4.15 <i>O. amphibia</i> aseton, etanol, hekzan ekstrelerinin mikrodilüsyon testi sonuçları	115
Çizelge 4.16 <i>O. amphibia</i> kloroform, metanol, diklorometan ekstrelerinin mikrodilüsyon testi sonuçları	116

1 GİRİŞ

İnsanlar tarafından ilaç kullanımının tarihi, prehistorik devirlere dayanmaktadır. Daha o zamanlardan başlayarak insanların doğadaki bitkisel, hayvansal ve mineral maddeleri kendi üzerlerinde denedikleri ve asırlar boyu çok sayıda doğal maddenin hastalıklara karşı kullanıldığı bilinmektedir. İlaçlar ile ilgili en eski bilgiler milattan 3000 yıl kadar önce yazıldığı saptanmış olan Sümer tabletlerinde bulunur (Şekil 1.1). Daha sonraları, Mısır Papirüslerinde, Çin, Hint, Arap ve Acem yazmalarında bu konuda geniş bilgilere rastlanmaktadır. 17. Yüzyıldan başlayarak da ilaçların tedavide kullanımlarında gözlem ve deneye dayanma ilkesi ön plana çıkmaya başlamıştır (Dökmeci, 2000).



Şekil 1.1 Sümerce ilaç reçetesi
(İ. Ö. 3000) (Kramer, 1999)

Günümüzde sıkça gündeme gelen fitoterapi kavramı içerisinde doğal kaynakların sağlık açısından daha yoğun bir ilgi görmesi, bu alandaki çalışmalar için ayrılan kaynakların artmasına neden olmaktadır. Doğal kaynaklar arasında farmakolojik aktiviteye sahip olan mikroalg ve siyanobakteriler gibi mikroorganizmaların da önemli bir yeri vardır. Ülkemiz elverişli coğrafi özellikleri bakımından pek çok avantaj sağlamakta, denizlerinden göllerine oldukça zengin biyolojik çeşitliliğe sahip kaynaklarıyla yurt içinde ve dışında birçok araştırmacının yoğun ilgisini çekmektedir ve bu konuda çeşitli araştırmalar literatürde yerini almaktadır (Aysel at al., 2001; Conk Dalay, 2002; Jaffrezo et al., 1978; Everest et al., 1997; Taşkın et al., 2001; Tüney et al., 2006; Ozdemir et al., 2006).

Algler uzun yıllardan beri tedavi amacıyla kullanılmaktadır. 1950'lerde makroalglerle biyoaktif bileşikler özellikle de antibiyotiklerin keşfine yönelik sistematik çalışmalara başlanmıştır. 1970'lerde bu bileşiklerin saf olarak izole edilerek kullanılması fikrinin yerini, öncelikli olarak kaynaktan elde edilen ham ekstraktın kullanılması ve sonra içindeki bileşiklerin izole edilerek tanımlanması fikri almıştır (Borowitzka, 1999).

Mikroalgler ve siyanobakterlere ilişkin daha ayrıntılı araştırmalar 1980'lerde başlamış ve günümüzde kapsamlı çalışmaların odağı haline gelmiştir. Mikroalg kültürleri laboratuvar koşullarında kolayca hazırlanabilmekte ve içerdikleri önemli bileşikler izlenebilmektedir. Fotosentez yoluyla organik madde sentezlemektedirler. Akuakültürden su

arıtımına, çeşitli metabolitlerin ve farmasötiklerin eldesinden insan besini ve hayvan yemi olarak kullanımına kadar geniş bir alanda değerlendirilebilme olanakları vardır (Borowitzka, 1999; Sukatar, 2002, Walker et al., 2005).

Tüm mikroskopik tek hücreli veya filamentöz algler taksonomileriyle bir ilişkisi olmadığı halde genellikle mikroalg olarak adlandırılmaktadırlar. Eskiden mavi-yeşil algler (Cyanophyta) olarak adlandırılan siyanobakteriler (Cyanobacteria) kloroplast içermeleriyle ökaryotik alglere benzemekle beraber prokaryotik özellikler taşımaktadırlar. Pek çok siyanobakterinin morfolojik karakteristiği ve filogenetiği çok az anlaşılabilmektedir. Sonuç olarak siyanobakterilerin taksonomisi pek çok kez gözden geçirilmiş ve botanik kriterler yerine bakteriyolojik kriterler temel alınarak yeniden sınıflandırılmıştır (Henson et al., 2004; Kreitlow et al., 1999; Pulz and Gross, 2004; Yoldaş vd., 2003)

Bitki/hayvan ayırımı 1866 yılında resmi olarak Haeckel tarafından değiştirilmiş ve her iki kategoriye de yerleştirilmemiş olan, hem hayvan hem de bitkilerden ayrılan özelliklere sahip tek hücreli formlar da (protistler) ele alınarak canlılar 3'e ayrılmıştır. Daha sonraları 1930 yılında Edward Chatton canlıları ökaryot ve prokaryot olmak üzere 2 kategoriye ayırmış ancak önerisi rededilmiştir. Daha sonra Coepland, bakterileri de ekleyerek canlıları 4 dala ayırmıştır. 1969 yılında ise Whitakker, Bitki, Hayvan, Protist, Monera (bakteri) gruplamasına Fungi (mantarlar) alemini de ekleyerek canlıları 5 dala ayırmıştır. Bu sınıflama

yakın zamana kadar en çok kabul gören yaşamın temel organizasyon şeması olmuştur (Özcan, 2004; Woese et al., 1990).

Sonraki yıllarda, mikroorganizmalar açısından moleküler yapılar ve dizilerin, klasik fenotipik özelliklere göre evrimsel ilişkileri daha iyi ortaya çıkardığı görüldüğünden, taksonların tanımlanmasında temel alınan organizmal→hücresele seviye, moleküler düzeye (16S ve 18S rRNA dizi karşılaştırmaları) kaydırılmıştır. Moleküler karşılaştırmalar sonucu 1977 yılında Carl Woese tarafından canlılar 3 ana gruba ayrılmıştır: Bakteriler, Ökaryotlar ve Arkeler. Bu sınıflandırmada herbir kategori "Domain" olarak adlandırılmış olup herbir domain 2 ya da daha fazla alem içermektedir. Arke, Bakteri ve Ökaryotlara bağlı farklı alemler bulunduğu için daha esnek ve daha açıklayıcı olmalarından dolayı en üst hiyerarşi seviyesini adlandırmak amacıyla en yüksek taksona Domain adının verilmesi önerilmiştir (Özcan, 2004; Brock et al., 2005; Woese et al., 1990).

Mikroalgler ve siyanobakteriler protein, karbonhidrat, lipid, vitamin, enzim ve diğer biyoaktif bileşikler açısından çok önemlidir. Farmasötik olarak aktif bileşikler, antibiyotikler, algisitler, antineoplastikler, antiviral bileşikler, toksinler, ve bitki gelişimi düzenleyici gibi bileşikler içermektedir. Son yıllarda antibiyotik ve farmasötik olarak aktif bileşiklerin eldesi açısından siyanobakteriler araştırmalara gittikçe artan bir oranda konu olmuş ve çok sayıda antibiyotik etkili yeni bileşiğin izolasyon ve karakterizasyonu

gerçekleştirilmiştir (Bérđy, 2005; Kreitlow et al., 1999; Pulz and Gross, 2004; Yoldaş vd., 2003).

Birçok çalışmada aktif bileşiklerin üretiminin büyüme fazına veya kültür şartlarına bağılı olduğı görülmüştür, bu nedenle biyoaktif bileşiklerin üretimi için kültür koşullarının optimize edilmesi gerekmektedir. Biyoaktif bileşiklerin çoğı yavaş büyüyen kültürlerde veya stasyoner fazda oluşan sekonder metabolitlerdir (Borowitzka, 1999; Imamoglu, 2007; Walker et al., 2005).

Çeşitli organizmalardan izole edilen biyoaktif materyaller

Uçucu yağlar temel olarak monoterpenler, diterpenler, karbonillenmiş ürünler ve polienler içeren organik bileşiklerin kompleks bir karışımıdır. İnsan ve hayvan sağığı üzerine yararlı etkileri olan bu bileşiklerin antibakteriyal, antifungal, antitümör ve antioksidan aktiviteleri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Tıbbi bitkilerin çoğı uçucu yağlar gibi aromatik bileşikleri sentezleme yeteneğine sahiptirler (Ceylan, 1996; Demo et al., 2005). Pek çok bitki türünün meyve kabuklarında, köklerinde, tohumlarında ve yapraklarında bulunurlar. Uçucu yağlar, buhar distilasyonu ve solvent ekstraksiyonu gibi yöntemlerle elde edilirler. Yağın kalitesi ve aromatik bileşiklerin stabilitesine bağılı olarak istenen özelliklere göre son ürün redistilasyon ve saflaştırma ile elde edilir. Aromatik özellikleri nedeniyle gıda ve kozmetik sanayiinde kullanılmaktadır (Semen and Hiziroğlu, 2005; Ceylan, 1996).

Yaklaşık 13500 doğal antibiyotiğin varlığından söz edilmektedir. Bunların 5500 tanesi aktinomisetlerden elde edilirken yaklaşık 3300 tanesi yüksek bitkilerden elde edilmektedir ve yaklaşık 90 tanesi günümüzde kullanılmaktadır. Bu doğal ürünler, ilaç olarak kullanılmakla beraber aynı zamanda sentetik analogların hazırlanmasında ve yapı-aktivite çalışmalarında model teşkil etmektedir. Son yıllarda yeni biyo-aktif moleküllerin veya yeni bileşikler için öncü olabilecek bileşiklerin keşfine ihtiyaç duyulmaktadır. Mikroalgler ise bu tip bileşikler için önemli bir potansiyel kaynak olarak gösterilmektedir (Borowitzka, 1999).

Antimikrobiyal maddeler, sentetik olarak veya çeşitli doğal kaynaklardan elde edilen, küçük dozlarda uygulandığında mikroorganizmaları öldüren ve konak canlıya zararlı etkisi görülmeyen veya az olan bileşiklerdir. Bir antimikrobiyal ilaçta olması gereken en önemli özellik ise “seçici toksik” etki yani konağa zarar vermeden mikroorganizmanın inhibe edilmesidir (Ustaçelebi, 1999).

1953 yılında yapılan çalışmalarda mikroalglerin antibiyotik ürettiği görülmüş ve ardından çok sayıda mikroalgal ekstre ve/veya ekstraselüler ürünün antimikrobiyal (antibakteriyal, antifungal, antialgal, antiprotozoal) aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. 1988’de yapılan bir çalışmada 300 tatlısu alginin % 10’ unda antibakteriyal, 532 deniz ve tatlı su alginin % 5’inde antifungal aktivite saptanmıştır. Buna rağmen henüz bulunan çoğu aktif bileşiğin yapısı bilinmemektedir (Borowitzka, 1999).

Bazı mikroalg türlerinde çeşitli stres koşulları (azot yetersizliği, yüksek ışık şiddeti, yüksek tuzluluk vb.) β -karoten, astaksantin,

zeaksantin, lutein gibi güçlü antioksidan özelliği olan pigmentlerin birikmesine neden olur. Bu şekilde çeşitli parametrelerle oynayarak hücreler üzerinde yaratılan fizyolojik stres ile kültüre alınan hücrelerin istenen ürünü daha fazla üretmesi sağlanabilmektedir (Pulz and Gross, 2004; Gökpınar vd., 2006).

Antioksidan bileşikler başka moleküllerle kolayca elektron alışverişi yaparak onların yapısını bozan serbest radikalleri nötralize ederek vücudun onlardan etkilenmesini önleyen veya kendini yenilemesini sağlayan maddelerdir. Serbest radikaller, lipid peroksidasyonuna yol açarak ve ayrıca aminoasitlere, proteinlere, nükleik asitlere, karbonhidratlara, kofaktörlere, nörotransmitterlere etki ederek biyolojik sistemlere büyük zararlar verirler (Dökmeci, 2000; Gökpınar vd., 2006, Krishnaiah et al., 2007).

Doğal antioksidanlar, hastalıklardan korunmada, nutrasötik olarak, kalite, stabilite ve gıda ürünlerinin güvenliğini sağlamak için gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Bütıl hidroksi anisol (BHA), bütıl hidroksi toluen (BHT), propil gallat (PG), terbütılhidrokinon (TBHQ) gibi antioksidanlar en çok bilinen sentetik antioksidanlardır. Ancak, BHT ve BHA'nın bazı sakıncalı fiziksel özellikleri (yüksek buharlaşma ve yüksek sıcaklıklarda stabil olmaması), sentetik gıda katkı maddeleriyle ilgili katı yasal düzenlemeler ve tüketici tercihleri üreticilerin dikkatlerini doğal antioksidanlara çevirmelerine neden olmuştur. Özellikle son birkaç yılda gıdalarda lipidlerin oksidatif bozulmasının geciktirilmesinin yanı sıra insanlarda serbest radikaller ve ROS' la ilişkili pek çok kronik

hastalığın oluşumunu geciktirmesi ve engellemesi nedeniyle doğal antioksidanların araştırılmasına artan bir ilgi görülmektedir (Gülçin et al., 2004; Krishnaiah et al., 2007; Marxen et al., 2007).

Mikroalg ve siyanobakteriler analjezik ve antiinflamatuvar etkili bileşikler de sentezlemektedirler (Borowitzka, 1999). Analjezik maddeler ağrıya karşı kullanılan ajanlardır. Ağrı, doku zedelenmesi (yanık, batma, sıkışma, bazı kimyasal ve toksik maddeler) uyarılarına periferik serbest sinir uçları tepki verdiğiğinde başlayan kompleks fizyolojik bir olaydır. Uyarıların algılanmasında nosiseptör (ağrılı uyarıları algılayan sensitif reseptör) gibi identifiye edilmiş histolojik bir yapı varlığı gösterilmiş değildir. Nosiseptörlerin ağrıyı iletmesi küçük çaplı miyelinli A delta ve miyelinsiz C lifleriyle sağlanmaktadır. Böylece uyarılar spinal korda kadar taşınırlar ve beyine ulaşmadan önemli ölçüde modifiye olurlar (Dökmeci, 2000).

Cilt içindeki nosiseptörler mekanik, termal yada kimyasal uyarılarla aktive olurlar. Bu nedenle nosiseptörlere termoreseptör veya mekanoreseptörler adı verilmektedir. Aşırı ısı ve soğukla etkilenen termoreseptörler, hafif dokunma ile de uyarılabilmektedir (polimodal reseptörler). Titreşim, dokunma ve basınç duyuları Pasini ve Meissner korpüskülleri ve Merkel hücrelerinde sonlanan A beta lifleriyle taşınmaktadır. Cilde uygulanan ağrılı bir uyarı erken dönemde kesin ve batıcı bir ağrı, geç dönemde ise yanıcı bir ağrıya yol açmaktadır. Kesin ve batıcı ağrının A delta lifleriyle, yanıcı ağrının da C lifleriyle taşındığı gösterilmiştir (Dökmeci, 2000).

Antiinflamatuvar maddeler, vücutta inflamasyonla oluşan belirtilere karşı kullanılan ajanlardır. İnflamasyon; aşırı yada anormal hücresel bir uyarı yada lezyona karşı canlı varlıkların gösterdiği bir savunma reaksiyonudur. Bu durum travma, yanık sonucu yada dış patojen ajanların (virus, bakteri, parazit, antijenler) yada otoantijenlerin organizmaya girmesiyle oluşabilir. Antijen yada otoantijen oluşumunda organizma kendi immüniter sistemiyle savunma yapar. İnflamatuvar immün yanıt, kısmen immün yanıt katılan hücreleri (reaktif helper T₄ ve supresör T lenfositler, T₈) kısmen de çok hızlı elimine yada inhibe edilemeyen sitokinler gibi hücresel mediyatörlerin oluşumunu kapsamaktadır. Bu sitokinler akut yada kronik inflamasyon basamaklarına göre, inflamatuvar prosesler üzerine retrokontrol bir etkiyle (feed back) bir etkiyle inhibitör yada aktivatör senteze yönlendirme yapabilirler (Dökmeci, 2000).

Amerika'da Upper Klamath Gölü'nden (Oregon) izole edilen *Aphanizomenon flos-aquae* antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklere sahip olan fikosiyanın pigmenti bakımından zengin bir siyanobakteridir. Yaş ağırlığının % 30-40'ı kadar fikosiyanın içeren *A. flos-aquae* ekstreleri gıda desteği olarak alındığında oksidatif stres ve inflamasyonla bağlantılı klinik vakaların tedavisinde ko-faktör olarak yardımcı rol oynayabilmektedir (Benedetti et al., 2004).

Aşırı mikroalg üremeleri (harmful algal blooms, HAB's) son yıllarda giderek daha sık ve yaygın olarak rapor edilmektedir (Şekil 1.2). Bu üremeler, sucul hayvanların tür düzeyinde popülasyon artışlarını

bozmakta, ekosistemin sürdürülebilirliği, yetiştiricilik ve turizm gibi önemli endüstri sahalarını hatta insan sağlığını olumsuz olarak etkilemektedir (Hernández-Becerril et al., 2007; Katıroğlu et al., 2004; Koray ve Çolak-Sabancı, 2004). Ülkemizde rapor edilen türlerin yaklaşık % 10'unun zehirli ve/veya zararlı aşırı üreme oluşturdıkları ve bunlardan sadece % 5' inin bilinen toksinleri sentezleyerek balık ölümleri ile birlikte ekosistem düzeyinde katastrofi oluşturabildikleri bilinmektedir (Koray ve Çolak-Sabancı, 2004).



Şekil 1.2 Baltık Denizi'nde aşırı mikroalgal çoğalma
13-Haziran-2006 (Envisat's MERIS) (www.physorg.com)

Toksikolojik maddeler, canlı organizmada zararlı etki gösteren herhangi bir madde olarak tanımlanabilir. Uygun yol ve dozda alınmayan her madde toksik etki yapabilir. Bu etki bir yapı değişikliği şeklinde veya

biyokimyasal lezyon şeklinde olabilir. Ortaya çıkan etki, reversibl olabileceği gibi hücre ölümü şeklinde de olabilir (Saygı, 2003).

Çalışmamızda laboratuvar şartlarında *Chlorella* sp. ve *Oscillatoria amphibia* kültürleri hazırlanarak elde edilen hücrelerin ortamdan ayrılarak liyofilizatörde kurutulmasıyla elde edilen biyokütleden hidrodistilasyonla uçucu yağ elde edilmesi ve Gaz Kromatografi/Kütle Spektroskopisi (GK/KS) analizleriyle kimyasal içeriğinin tayin edilmesi, ayrıca çeşitli çözgen ekstraktlarının antimikrobiyal, analjezik, antiinflamatuar ve antioksidan aktiviteleri ile toksisitelerinin araştırılması amaçlanmıştır. Yeşil mikroalg *Chlorella* sp. (CC-1, Salda Göl'ü-Burdur) ve siyanobakteri *Oscillatoria amphibia* (CC-14, Acı Göl-Denizli), “İçsularda bulunan bazı mikroalglerin kültür koleksiyonu (YDABAG101Y05)” isimli TÜBİTAK projesi kapsamında oluşturulan Ege Üniversitesi Mikroalg Kültür Koleksiyonu (Ege-MACC)’ ndan sağlanmıştır. Tez çalışmamız, ülkemizdeki doğal kaynakların değerlendirilmesi, farmakolojik açıdan değerli biyolojik zenginliğimizin ortaya konulması ve bu alandaki yeni çalışmaları teşvik etmesi bakımından özel bir öneme sahiptir. Farmakolojik aktivite gösterdiğini belirlediğimiz türlerin gelecekte, büyük ölçekli üretimleri ve yaygın kullanımıyla hem dünyaya hem ülkemize önemli katkılar sağlaması beklenmektedir.

2 LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Mikroalg ve siyanobakterilerin genel özellikleri

Genellikle klorofil a içeren ve bir tallusdan oluşan; kök, gövde ve yapraklar şeklinde farklılaşmış yapıları olmayan organizmalara “alg” denmektedirler. Bakteri olmalarına rağmen siyanobakteriler de bu sınıflandırmaya dahil edilmektedirler. Bu nedenle “mikroalg” terimi mikroskopik algleri ve oksijenik fotosentetik bakteriler olan siyanobakterileri de kapsamaktadır (Tomaselli, 2004).

Mikroalgler dünyanın her yerinde bulunabilirler ve her tür toprak yüzeyinde, genel olarak da suda geniş bir yayılım gösterirler. Çok az bir kısmının simbiyotik yaşam şekilleri vardır. Tek hücre, koloni veya filamentli olmak üzere çeşitli tipte hücre organizasyonlarına sahiptirler. Tek hücreli siyanobakterilerin çoğu hareketsizdir, hareketli olanlar ise flajelleri olmadığı halde kayma ve yüzme hareketi yapabilirler. Tek hücreli mikroalgler hareketli veya hareketsiz olabilirler. Hareketli formlarında flajel bulunmaktadır (Tomaselli, 2004).

2.1.1 Siyanobakterilerde hücre yapısı

Siyanobakteriler, murein (peptidoglikan) tabakası içeren ve dışında lipopolisakkarit bir tabakadan oluşan dört katlı, Gram negatif boyanan bir hücre duvarına sahiptirler. Bazı durumlarda hücre duvarını müsilajlı bir zar çevreleyebilmektedir. Hücre duvarının altında ince bir hücre zarı veya plazmalema bulunur (Becker, 1995; Koray, 2002; Tomaselli, 2004).

Siyanobakterilerde, fotosentetik kısımlar içeren ve sitoplazmada serbestçe dolaşan tilakoid adı verilen yapılar bulunmaktadır. Tilakoidler, sitoplazmik yüzeye düzenli olarak sıralanmış fikobilizomlar ile de gösterilmektedir. Fikobilizomlar fikosiyanin gibi fikobiliproteinleri içerirler. Siyanobakterilerde fotosentetik pigment olarak sadece klorofil a bulunmaktadır. Siyanobakteriler selüloz içermediğinden sindirilmeleri diğer alglere oranla daha kolaydır (Becker, 1995; Koray, 2002; Tomaselli, 2004).

Siyanobakteriler karbon, azot ve oksijen çevrimlerinde çok önemli bir rol üstlenmişlerdir. Filamentli (*Oscillatoria* sp.) ve serbest yaşayan tek hücreli formlar halinde de bulunabilirler (*Synechococcus* sp.). Filamentli olanlarda uç veya aradaki hücreler azot yakalamak üzere farklılaşmış olup sadece sudaki azotu değil, havada N₂ formundaki serbest azotu da yakalayabilme yeteneğine sahiptirler (Koray, 2002).

Esas depolama ürünleri glikojen olup hücre sitoplazması içinde inklüzyonlar şeklinde sıkça rastlanır. Ayrıca denizel siyanobakteriler çoğunlukla “gaz vezikülleri” adı verilen sitoplazmik inklüzyonlar içerirler. Gaz vezikülleri şişme-inme özellikleri ile siyanobakterilerin suda, fotosentez için gerekli optimum sıcaklık ve derinlikte asılı kalabilme yeteneklerini arttırırlar (Koray, 2002).

Siyanobakteri hücreleri ikiye bölünerek (binary fission) çoğalırlar. Ayrıca çoklu bölünme (multiple fission), fragmentasyon (hormogonia) ile de çoğalırlar. Bazı filamentöz siyanobakteriler akinetler oluştururlar.

Genetik varyasyon ise transformasyon ve konjugasyonla sağlanmaktadır (Koray, 2002; Tomaselli, 2004).

2.1.2 Mikroalglerde hücre yapısı

Mikroalgal hücre duvarı bazı durumlarda bir amorf tabaka ile çevrilmiş, mikrofibriler selülöz tabakadan oluşmaktadır. İnce bir membran tabaka sitoplazmayı çevreler. Sitoplazma, nükleus ile plazma membranı ve endoplazmik retikulumun içeriye doğru katlanması ile oluşmuş çeşitli kısımlar ve organelleri içerir. Kloroplast ve sitoplazmik lipidler çoklu doymamış yağ asitleri (polyunsaturated fatty acids-PUFA) için önemli bir kaynaktır. Kloroplastlar klorofil içeren tilakoid yapılardan meydana gelmektedir. Tilakoidler serbest halde veya fikobilizomlar içerisinde fikobiliproteinler içerirler. Hücre bölünmesiyle vejetatif çoğalma yaygındır (Tomaselli, 2004).

2.2 Elde edilen doğal ürünler

Mikroalg ve siyanobakterilerde, çeşitli vitaminler, farmasötik etkili bileşikler, karotenoidler ve biliptoteinler gibi pigmentler, çeşitli vitaminlerin perkürsörü olan fitol, gıda ve yem endüstrisinde geniş bir yeri olan amino asitler, viskozite arttırıcı polisakkaritler, yüzey aktif bileşikler olan biyoflokülanlar ile polioller ve pek çok karbonhidrat bulunmaktadır (Borowitzka, 1992a; Pulz and Gross, 2004).

Geçtiğimiz yirmi yılda alg ve diğer bazı mikroorganizma formları tek hücre proteini (single cell protein) kaynağı olarak artan bir ilgiyle karşılanmaktadır. Alglerde total lipid oranı genellikle çevresel faktörlere

bağlı olarak % 1 ile 70 arasında değişir. Alglerdeki yağların çoğu gliserol esterleri ve yağ asitleridir. Siyanobakteriler % 25-60 oranında çoklu doymamış yağ asidi (Poli Unsaturated Fatty Acids-PUFA) içerirler. Yeşil alglerde α -linolenik asit, siyanobakterilerde γ -linolenik asit temel yağ asitleridir. Her iki yağ asidi de gıda ve yem sanayiinde önemlidir. (Becker, 1995).

Alglerin kuru ağırlığının % 4-6' sını nükleik asitler oluşturur. RNA:DNA oranı ise yaklaşık 3:1'dir. Mayalarda % 8-12, bakterilerde yaklaşık % 20'dir. Kuru ağırlığın % 5' i klorofil ve karotenoidler gibi lipofilik pigmentlerden oluşmaktadır. Yeşil alglerin pigment yolağı yüksek bitkilerdeki gibidir. Siyanobakteriler klorofil b içermeyen ve ekinenon ve zeaksantin ile çeşitli karotenoid glikozidlerini içerirler (Becker, 1995).

Klorofil, biliprotein ve karotenoidler fotosentezde görev alan üç grup pigmenttir ve endüstriyel boyutta üretim temelde bu biliprotein ve karotenoidler üzerine yapılmaktadır. Fikobiliproteinler ticari anlamda doğal boya olarak, diagnostik testlerde floresan madde olarak ve immun floresan analizlerde antikor işaretlemeye kullanılmaktadır. Ayrıca siyanobakteri *Spirulina platensis*' den elde edilen bir biliprotein olan fikosiyaninin lösemi hücreleri üzerine inhibitör etkisi nedeniyle potansiyel antitümör bir bileşik olduğu düşünülmektedir. Medikal biyokimya alanında ve sağlıklı gıda katkı maddesi olarak kullanılan yağ asitleri bakımından zengin bazı mikroalglerin ticari üretimi C₁₈ linoleik (18:2 ω 6) asit (LA) ve γ -linolenik (18:3 ω 3) asit (GLA) ile C₂₀

ekosapentanoik (20:5 ω 3) asit (EPA) ve araşidonik asit (20:4 ω 6) (AA) için yapılmaktadır (Skulberg, 2004).

Uzun yıllar halk arasında kullanıldığı ve bilindiği için algilerle ilgili yapılan çalışmaların çoğu Uzak Doğu'dadır. Aktif bileşenler bilinmemekle beraber algler, zengin vitamin ve mineral içerikleri nedeniyle kullanılmaktadır (Becker, 1995). Mikroalglerde ve siyanobakterilerde antibiyotik etkili bileşiklerin ve diğer farmasötiklerin araştırılması ile ilgili çalışmalara ilgi her geçen gün artmaktadır. Mikroalglerden izole edilen antimikrobiyal ve antifungal özellikteki ilk bileşik 1960 yılında *Phaeocystis poucheti* den elde edilen "akrilik asit" tir (Skulberg, 2004). Son yıllarda sıklıkla gündeme gelen fitoterapi kavramı içerisinde doğal kaynakların insan sağlığı açısından daha yoğun bir talep görmesi bu tip çalışmalara ayrılan kaynakların artmasına neden olmaktadır (Borowitzka, 1999; Katircioglu, 2006; Ozdemir et al., 2004; Rodriguez-Garcia and Guil-Guerrero, 2008).

Araştırmalar sırasında bir biyolojik aktiviteye rastlandığında ve sekonder metabolit tanımlandığında, bir sonraki adım bu bileşiğin moleküler yapısının belirlenmesidir. Laboratuar şartlarında yapılan bazı denemeler için mikrogram düzeyde materyal yeterli olabilmektedir. Bu miktar genellikle küçük çaplı bir kültür işlemiyle sağlanabilmektedir. Ancak ilaç dizaynı amaçlanıyorsa Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektroskopisi veya X-ray kristalografi gibi yöntemler kullanılır ve bu araştırmalarda 1-100 mg kadar materyale ihtiyaç duyulabilmektedir. Böyle bir durumda üretici organizmanın büyük çapta üretimi yada

bileşimin kimyasal sentezinin yapılması gerekebilir. Rasyonel bir değerlendirme için *in vitro* testler tek başına yeterli değildir, test sonuçları ancak *in vivo* testlerle birlikte bir anlam ifade etmektedirler. (Skulberg, 2004).

2.2.1 Tıp ve eczacılık alanında kullanılan ürünler

Yapılan çalışmalarda algal preparatların en iyi sonuç verdiği durumların çocuklardaki ekzema, ülser ve jinekolojik hastalıklar olduğu gösterilmiştir. Algelerde bulunan bazı steroller, doymamış yağ asitleri, betainler, hipokolesterolemik aktiviteye sahiptir. *Scenedesmus obliquus* ile beslenen ratlarda kolesterol ve trigliserit seviyeleri düşmüş, kolesterolün karaciğerde depolanması azalmıştır (Becker, 1995).

Scenedesmus sp. jinekolojik hastalıklarda, ülser tedavisinde, çocuklarda ekzemanın tedavisinde kullanılmaktadır. Merhemleri, varis, çıban ve iyileşmeyen yaralarda % 90 oranında iyileşmeye sebep olmaktadır (Akbaba, 2003). Çekoslovakya’da 1975 yılında yapılan bir çalışmada *S. obliquus*’ un alkolik ekstreleri % 20 oranında merhemle karıştırılarak trofik ve varikoz ülser, yanık, iyileşmeyen yara veya ekzeması olan 109 hastaya uygulanmıştır. Bu hastaların yaklaşık % 90’ ı iyileşmiş, %7’ sinde ise fark edilir düzeyde bir gelişme gözlenmiştir. 112 kişilik kontrol grubuna ise plasebo uygulanmış ve sadece bir hastada iyileşme gözlenmiştir (Becker, 1995).

Haematococcus sp. alzheimer ve parkinson hastalıklarının tedavisinde, omurilik zedelenmesi ve sinir sistemi incinmelerinde, zarar

görmüş retinanın iyileştirilmesinde, damar sertliği ve koroner hastalıkları önlemede, immün sistemin güçlendirilmesinde ve tümöre karşı etkin bir şekilde kullanılabilmektedir (Akbaba, 2003).

Chlorella tabletlerinin tedavi edilemeyen yaraların iyileşmesinde etkili olduğu ve epitel oluşumunu hızlandığı görülmüştür. Japonya’ da 1966 yılında yapılan bir çalışmada sağlıklı yetişkinlerde kilo artışı ve seyahatler sırasında soğuk algınlığı nedeniyle meydana gelen ölümlerde azalma sağladığı gösterilmiştir. 1984 yılında yapılan bir çalışmada ise *Chlorella vulgaris*’ in sıcak su ekstrelerinin antitümör aktivitesinin olduğu görülmüştür (Becker, 1995).

Chlorella’ nın karaciğer ve kolon sağlığını koruduğu, cilt, böbrek, akciğer ve bronşlarla ilgili hastalıkları iyileştirdiği, vücuttaki toksinlerin atılmasında, immün sistem üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Yara iyileştirici özelliği ile ülser tedavisinde, kan şekerini düzenleme etkisiyle şeker hastalığında, pankreas fonksiyonlarını dengeleyici ve düzenleyici olarak, yaşlanma sürecini yavaşlatmada, kanser hastalarında lökopeniyi önlemede etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Akbaba, 2003).

Rivularia firma’ dan izole edilen bi-indol bileşikleri antiinflamatuvar ve antiamfetamin aktiviteye sahiptir, fakat ratlarda tremor oluşturduğu gözlenmiştir. Daha az oranda izole edilen diğer bi-indol bileşikleri ise tremor oluşturmada da aktivite gösterebilmiş veya hiç aktivite gözlenmemiştir. Bu bileşiklerin sentetik analogları istenmeyen yan etkilere sebep olmadan etkili olabilmektedir. *Tolypothrix nodosa*’ dan izole edilen diterpenoid bir bileşik olan tolipodiol ise güçlü

antiinflamatuvar aktiviteye sahip bir diğ er bileşiktir (Borowitzka, 1999). Yapılan bir  alışmada da kırmızı mikroalg *Porphyridium cruentum*’ dan edilen s ľfolipidlerin antiinflamatuvar etkilerinin bulunduğ u g sterilmiştir (Berg e et al., 2002). *Fischerella*’ dan izole edilen hapalindol A ve B, konjestif kalp yetmezliğı, hipertansiyon,  dem ve hiponatremi tedavisinde kullanılmak  zere vazopressin antagonisti olarak patent almıştır (Borowitzka, 1999).

Dunaliella tertiolecta antihipertansif, bronkodilat r, antiserotonin, polisinaptik blok, analjezik, kas gevşetici, anti dem etkili; *Phaeodactylum tricornutum* nikotinik blok; *Navicula* sp., n romusk ler blok şeklinde etki yapmaktadırlar. Ayrıca *Phaeodactylum tricornutum* ve *D. tertiolecta*’nın sulu ekstrelerinin SSS (Santral Sinir Sistemi) depresanı ve kas gevşetici etkileri de vardır. *Spirulina platensis* ve *Chlorella vulgaris* ekstrelerinin immun sistem  zerine de etkili oldukları  eşitli  alışmalarda g sterilmiştir (Borowitzka, 1999)

Mikroalglerden elde edilen aljinatlar, dermal ve oral yoldan kullanılabilen preperatlarda ila  ham maddesi veya etken madde olarak kullanılabilmektedir. Baryum s ľfatla beraber sodyum aljinat r ntgen filmlerinin  ekiminde kullanılmaktadır. Ayrıca sodyum aljinat bitkisel yağlarla karıştırılıp belli bir akışkanlıkta tutularak etken maddelerle karıştırılıp sıvı preperatların hazırlanmasında sıvağ olarak kullanılmaktadır (Akbaba, 2003).

Siyanobakterilerin hidrofilik ekstreleri fare kalp kasında kardiotonik aktivite g stermiştir. Siyanobakteriler aynı zamanda tıpta

inme, koroner arter tıkanıklığı ve amfizem gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan çok sayıda proteaz inhibitörü için de kaynak teşkil etmektedir. Örneğin bir serin proteaz inhibitörü olan trombin, hastalıklarda kanın pıhtılaşmasını kontrol etmek amacıyla kullanılabilir. Benzer olarak anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri antihipertansif ajanlar olarak kullanılmaktadır. Proteaz inhibitörleri ayrıca HIV enfeksiyonlarının da tedavisinde kullanılmaktadır (Borowitzka, 1999).

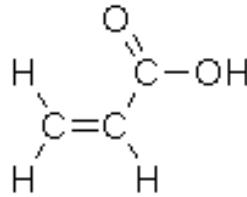
Spirulina' nın kendisi ve ekstraktları yara iyileştirici farmasötik preparat olarak krem, merhem, solüsyon ve süspansiyon olarak hazırlanmıştır. *Spirulina* ve enzimatik hidrolizatları deri metabolizmasını arttırarak keratinizasyonu önlemektedir. *Spirulina* ayrıca iştah azaltıcı etkisiyle obezitede fazla kiloların kontrol edilmesi için yararlı olmaktadır. *Spirulina'* nın % 20' sini oluşturan suda çözünen pigment fikosiyaninin immun sistemi uyarıcı, kanserden ve birçok hastalıktan koruyucu etkisi vardır (Akbaba, 2003; Becker, 1995). Orta düzeyli hipertansiyon ve hiperlipidemi hastalarına sekiz hafta her gün 4,2 g *Spirulina* verildiğinde total serum kolesterol düzeylerinin azaldığı gözlenmiştir (Becker, 1995). Ayrıca *S. platensis'* den elde edilen fikosiyanin (Hirata et al., 2000), *Chlorella sorokoniana'* nın (Matsukawa et al., 2000) antioksidan aktivitelerinin olduğu gösterilmiştir.

Çok sayıda siyanobakteri pigment ve sitonemin üretmektedir. Bu pigmentler güneşin yaydığı UV-A ışınlarını büyük oranda absorbe ederek güneşten korunmayı sağlamaktadır. Siyanobakteriler aynı zamanda mikosporin benzeri bileşikler üreterek de UV koruyucu etki yaparlar. Son

zamanlarda sitoneminin eterifikasyonu veya açılması ile hazırlanan bis-siklo-penteno-indol alkaloidleri güneşten koruyucu ve antiinflamatuvar bileşikler olarak patent almışlardır. *Oscillatoria* sp. den izole edilen bir bioprotein glukozit UV-A absorblayan bir diğer bileşiktir (Borowitzka, 1999).

2.2.1.1 Antibiyotik etkili ürünler

Alglerden izole edilen antibiyotik etkili ilk bileşik akrilik asit, kısmen serbest halde kısmen de enzimatik veya kimyasal olarak akrilik asit ve dimetil sülfite ayrılan inaktif dimetilpropiotetin şeklinde bulunur (Borowitzka, 1992a). Akrilik asit Gram pozitif, daha az olarak da Gram negatif mikroorganizmaları inhibe eder (Becker, 1995).



Şekil 2.1 Akrilik asit

GLA ve EPA da algler arasında oldukça yaygın antibiyotik etkili yağ asitlerindendir (Becker, 1995; Borowitzka, 1992b). *Chlorella*'nın klorellin ve bazı yağ asitleri ile çeşitli ekstraktları antibiyotik etkilidir (Becker, 1995). GLA içeren bir siyanobakteri *Spirulina platensis*'in metanol ekstresinin *Candida albicans*'a karşı aktivitesi de bu etkiye bağlanabilir (Borowitzka, 1999). Mikroalglerde, daha yaygın olarak da makroalglerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşikler de antimikrobiyal etkilidir (Becker, 1995).

Fungusid aktiviteli tjipanazol içeren *Tolypothrix tjipanensis* gibi siyanobakterlerin aktinomisetler kadar etkili olduğu görülmüştür. Antibakteriyal ve antimikotik aktiviteye sahip hapalindol A gibi hapalindoller ve benzeri alkaloidler *Hapalosiphon fontinalis* ve daha sonra da *H. hibernicus*, *Fischerella ambigua* ve *Westelliopsis prolifica*'dan da izole edilebilmiştir. Hapalindollerin çoğu A89271 faktörler dahil antibakteriyal ve antifungal ajanlar olarak patentlidir. Deniz dinoflagellatlarından *Amphidinium klebsii*' den izole edilen polien-hidroksi bileşiği olan amfidinol-2 *Aspergillus niger*' e karşı antifungal aktiviteye sahiptir. Dinoflagellatların gambierik asitler, cigatoksin, okadaik asit vb bileşikler ile yessotoksin gibi çeşitli toksinleri de *in vitro* antifungal aktiviteye sahiptir (Borowitzka, 1999; Hernández-Becerril, 2007; Katırcıoğlu et al., 2004).

Bazı algler algisid etkileriyle “algal blooms” olayının engellenmesi için kullanılırlar. *Scytonema hofmanni* tarafından üretilen γ -lakton ve siyanobakterin, *Fischerella muscicola*' dan fişerelin ve *Oscillatoria* sp.' in tanımlanmamış ekstraselüler ürünleri örnek verilebilir. Siyanobakterin bir herbisit olarak patent almıştır (Borowitzka, 1999).

Çeşitli çalışmalarda, *Nostoc* (Bloor and Englan, 1991), *Phormidium* (Fisch and Codd, 1994), *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Pseudoanabaena*, *Synechocystis* (Kreitlow et al., 1999), *Calothrix parietina* (Issa, 1999), *Spirulina platensis* (Ozdemir et al., 2004) ekstraktlarının bazı patojen mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkilerinin olduğu gösterilmiştir.

2.2.1.2 Antiviral etkili ürünler

Mikroalgler ve siyanobakterler antiviral bileşiklerin oldukça zengin kaynaklarıdır. Rinehard ve arkadaşları 1981’de ürettikleri siyanobakteri kültürlerinin %5’ inin *Herpes simplex* tip 2 (HSV-2) ve %5’ den fazlasının da *Respiratory syncytial virus*’ e (RSV) karşı etkili olduğunu saptamışlardır. Benzer olarak Patterson ve arkadaşları 1993’de 600 siyanobakteri kökeninin yaklaşık % 10’ unu HSV-2 ve HIV-1 virüslerine etkili bulmuştur (Borowitzka, 1999). Denizlerde izole edilen mikroalglerden *Porphyridium cruentum*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis suecica*, *Chlorella autotrophica*, *Dunaliella tertiolecta* ekstralarının in vitro olarak viral replikasyonu inhibe ettiği gözlenmiştir (Fabregas et al., 1999).

AIDS nedeni HIV-1 virüsü üzerine sitopatik etkileri olan çeşitli algal bileşikler tanımlanmıştır. Çok sayıda algal ekstre AIDS virüsüne karşı oldukça aktif bulunmuştur (Becker, 1995). Bu güne kadar aktif bileşiklerin çok az bir kısmı tanımlanmıştır. Yapısı bilinen bileşiklerden biri olan anti-HIV sülfolipid, *Lyngbya lagerheimi*’ den izole edilmektedir. Sülfatlı sterollerin de anti-HIV aktiviteye sahip olduğu çalışmalarla gösterilmiştir. Aynı zamanda anti-HSV-2 etkisi de olan indolokarbazoller *Nostoc sphaericum*’ dan ve bir grup β -karbolin *Dichothrix baueria*’dan izole edilmiştir. *Fischerella ambigua*’ dan elde edilen ambigüol A, HIV-1 transkriptaz ve siklooksijenaz enzimlerini inhibe etmektedir (Borowitzka, 1999).

Spirulina platensis'den HSV-1, HIV-1, human sitomegalovirus gibi zarflı viruslerin replikasyonunu inhibe eden kalsiyum spirulan adı verilen bir sülfatlı polisakkarit elde edilmiştir. Bu polisakkarit ramnoz, riboz, fruktoz, galaktoz, ksiloz, glukoz, glukronik asit, sülfat ve kalsiyumdan meydana gelmiştir. Burada kalsiyumun replikasyonun inhibisyonunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Borowitzka, 1999; Singh et al., 2005). Kırmızı mikroalg *Porphyridium* sp.' nin sülfatlı polisakkarid hücre duvarı *Herpes simplex* virüs tip 1 ve 2 (HSV 1, 2) ile *Varicella zoster* virüslerine (VZV) karşı önemli oranda antiviral aktivite göstermektedir (Huleihel et al., 2001).

2.2.2 Vitaminler, karotenoidler ve yağ asitleri

Mikroalglerin aynı zamanda vitamin ve yağ asidi kaynağı oldukları bilinmektedir. Bir çok mikroalg β -karoten, B₁₂, B₆, biotin vb. gibi vitaminleri sentezlerler. β -karoten, Avustralya, USA ve İsrailde gıda katkı maddesi ve renklendirici olarak, yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Borowitzka, 1992b; Gökpınar vd., 2006). E vitamini (tokoferol) de antioksidan özelliği nedeniyle alglardan izole edilen ticari öneme vitaminlerdendir. Vitamin içeriğini zenginleştirmek amacıyla genetik modifikasyon işlemi de uygulanabilmektedir (Borowitzka, 1999, Pulz and Gross, 2004).

Karotenoidlerin kanserden koruyucu etkileri vardır. UV ışıkla indüklenen cilt tümörlerinin büyümesini yavaşlatmaktadır. β -karoten ve diğer karotenoidler ışığa duyarlı cilt hastalıklarında fotosensitiviteye karşı koruyucu bir etkiye sahiptir. Deride oluşan kalıtsal anormal

fotosensitivite reaksiyonlarının tedavisinde kullanılır. β -karoten, günlük dozu 30-180 mg olacak şekilde reçete edilebilir (Becker, 1995; Singh et al, 2005).

Yeşil halofilik bir alg olan *Dunaliella salina* β -karotenin en önemli kaynağıdır. Kuru ağırlığının % 10' undan fazla β -karoten, % 40'ından fazla gliserol biriktirebilir (Borowitzka, 1992b; Gökpinar vd., 2006). β -karoten ve fukoksantin gibi karotenoidler antitümör ve kanserden koruyucu etkilere sahiptirler (Borowitzka, 1999).

Astaksantin, mikroalglerden elde edilen, güçlü antioksidan özelliği ile insanların ve hayvanların sağlığı üzerine olumlu etkileri olan bir karotenoiddir. Yeşil mikroalg, *Haematococcus*, astaksantin üretiminde bilinen en zengin kaynak olma özelliğini halen korumaktadır (Gökpinar vd., 2006; Göksan ve Gökpinar, 2005).

Mikroalgler % 1 ile 40 arasında lipid içerirler (Becker, 1995). Mikroalglerde lipidler genellikle gliserol esterleri ve C_{14} - C_{20} uzun zincirli doymuş veya doymamış yağ asitleridir. Mikroalgler, gama-linoleik asit, araşidonik asit, eikosopentanoik asit ve dokosaheksanoik asit gibi doymamış yağ asitlerinin önemli kaynaklarıdır. Bu yağ asitleri tedavide, çeşitli hastalıklardan korunmada ve beslenmede önemli bir yere sahiptir. Alg türlerinin yağ asidi içeriği kültür koşulları düzenlenerek istenen ölçüde değiştirilebilmektedir (Borowitzka, 1992b).

Mikroalglerdeki nonpolar lipidler (nötral lipidler); trigiseridler ve serbest yağ asitleridir. Polar lipidler ise esansiyel gliseridlerdir. Bunlar

bir yada daha fazla yağ asidinin fosfolipidler ve glikolipidler gibi bir polar grupta yer değiştirmesi ile meydana gelir. Bazı algler önemli oranda uzun zincirli yağ asitleri ve uzun zincirli alkollerin esterlerinden oluşan vakslar içerirler (C_{27} - C_{30}) Kuru ağırlığın % 5' inden azı hidrokarbonlardan oluşmaktadır (C_{15} - C_{27}) (Becker, 1995).

Algal sıvı ve katı yağlar bitkisel yağlar gibi kullanılabilirler. Bitkisel yağların % 80' i insan beslenmesinde, kalan kısmı da endüstride (deterjan, tekstil, kozmetik) kullanılır (Borowitzka, 1992b).

2.2.3 Toksik etkili bileşikler

Algler bazı toksinler içerebilirler. Doğal ortamlarında toksik bileşikler üretirken kültüre alındığında bu özelliklerini yitirdikleri de gözlenmiştir. Alglerin yetiştiği ortamda kurşun, kadmiyum, cıva gibi toksik maddelerin bulunması antropojenik toksik bileşiklerin oluşmasına neden olabilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO, 1972), haftalık 3 mg kurşun, 0,5 mg kadmiyum ve 0,3 mg cıva absorblanmasına izin vermektedir (Becker, 1995).

Mikroalg ve siyanobakteriler, nükleik asit içerikleri nedeniyle serumdaki ürik asit miktarını yükselterek böbrek taşı oluşumu, nefropati ve diğer sağlık problemlerine neden olabilmektedirler. Günlük nükleik asit alımı 2-4 g' ı geçmemelidir. % 6 DNA içeren bir algin günlük alımı bir yetişkin için 30 g' ı geçmemelidir (Becker, 1995).

Japonya' da *Chlorella* tüketiminin, klorofilaz enzimi ile klorofilin içeriğindeki fitol esterlerinin degradasyonu ve magnezyumun

uzaklaştırılması sonucu oluşan “faeformid a” isimli madde nedeniyle fotosensitiviteye bağlı deri iritasyonlarına neden olduğu bildirilmiştir. Enzimi inhibe etmek için 100 °C’de 3 dak ısıya maruz bırakmak gerekmektedir. Japon Hükümeti Sağlık Bakanlığı, faeformid oranını 100 g algde en fazla 100 mg olacak şekilde sınırlamıştır (Becker, 1995).

Alglerin toksisitesi ile ilgili hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalarda, alg içeren diyet yüksek konsantrasyonlarda bile kullanıldığında tolere edilebilmiştir. Çok ciddi anormalliklere kısa süreli ve 3 yıla kadar uzun süreli kullanımlarda rastlanmamıştır. Yine de daha kapsamlı araştırmalarla bu bulguların desteklenmesi gerekmektedir. Alglerin günlük alımı en fazla 100 g civarında olmalıdır ve kişilerin sağlık durumuna göre azaltılmalıdır (Becker, 1995).

Ötrofik sularda bulunan toksik siyanobakteriler letal toksinler içerdiklerinden hayvanları ve insanları etkileyebilmektedir. *Anabaena*, *Microcystis*, *Nostoc* ve *Oscillatoria* gibi bazı siyanobakteri türlerinin “mikrosistin” isimli hepatotoksik peptidleri ve nörotoksik alkaloidleri içerdikleri bilinmektedir. Mikrosistinle kontamine olmuş içme suyu uzun süre kullanıldığında karaciğer kanserine neden olabilmektedir (Singh et al., 2005; Carvalho et al., 2007).

2.3 Mikroalgal biyoteknoloji

Uygulamalı fikolojinin temelleri 1890 yılında Berjerinck tarafından yeşil mikroalg *Chlorella*’nın saf kültürünün gerçekleştirilmesiyle atılmıştır. Günümüzde de *Chlorella*, hala bu mikroorganizmaların ticari kullanımında ilk sıralarda yer almaktadır (Kargın Yılmaz, 2006; Oh-

Hama and Miyachi, 1992; Tomaselli, 2004). 1940'ların sonlarında potansiyel olan mikroalglerin yığın kültürlerinin yapılması konusunda çalışmalara ilgi duyulmaya başlanmıştır. Bu sebeple pek çok mikroalgin ortamı besin ve çevre ihtiyaçları belirlenmiştir (Kargın Yılmaz, 2006; Oh-Hama and Miyachi, 1992). Ticari mikroalglerin üretimi 1960'ların başlarında Japonya'da *Chlorella* kültürü ile başlamış ve 1970'lerin başında Meksika' da Texcoco Gölü' nde *Spirulina* üretim ve kültür tesisi kurulmasıyla devam etmiştir. 1977'de Tayland' da *Spirulina* tesisi kurulmuştur. Avustralya' da β -karoten kaynağı olan *Dunaliella salina*' nın ticari üretimi 3. büyük mikroalg endüstrisi haline gelmiştir. Bunları daha sonra İsrail ve ABD'deki diğer ticari tesisler takip etmiştir. Yaklaşık aynı zamanlarda Hindistan' da da siyanobakterilerin üretimi üzerine çalışmalar başlamıştır (Kargın Yılmaz, 2006; Pulz, 2001).

Mikroalgal biyoteknolojinin genel hedefi tüketicinin ihtiyaçlarını karşılayacak özel ürünlerin üretimidir. Tüm algal biyokütlenin protein kaynağı olarak kullanımı veya sağlık alanında terapötik ajan olarak da kullanılan ekstraksiyonla elde edilen bazı değerli bileşenlerin (pigmentler ve enzimler) kullanımına yer verilmektedir (Becker, 1995; Pulz and Gross, 2004).

Mikroalgler, fotosentez ile organik bileşik üretimi için güneş enerjisini kullanan en verimli biyolojik sistemler olması, tüm biyokütlenin hasat edilmeye ve kullanıma uygun olması, proteinler, karbonhidratlar, lipidler ve pigmentler gibi ticari yönden değerli bileşiklere sahip olmaları nedeniyle geleneksel tarıma göre avantajlıdır.

Dünyanın pek çok yerinde çorak topraklar ve tatlı su kıtlığı nedeniyle tarımsal üretim çok düşük hatta hiç yoktur. Mikroalg çiftlikleri böyle çorak arazilerde biyokütle üretiminin yapılabilceğı ve protein kaynağı sağlanabilecek tek yoldur. Mikroalgal biyokütle üretim sistemlerinde farklı işletme ve teknolojik düzeylerin kullanılması mümkündür; yoğun işçiliğın olduğı basit üretim ünitelerinden, daha yüksek yatırım gerektiren tam otomatik sistemlere kadar çiftliklerde algal biyokütle üretimi yapılabilir (Becker, 1995; Borowitzka, 1997; Spolaore et al, 2006).

Alglerin mineral beslenmesi yüksek bitkilerinkinden farklı değildir. Temel ihtiyaçları; karbon, fosfor, azot, kükürt, potasyum ve magnezyumdur. Demir ve mangana ise daha az oranda ihtiyaç duyulur. Bir çoğunun sodyuma ihtiyacı yoktur. Kalsiyum, kobalt, çinko, bor, bakır ve molibden gerekli iz elementlerdendir. Vitaminler, nükleik asitler, büyüme faktörleri gibi organik maddelere de gereksinim duyulmaktadır (Becker, 1995).

Son gelişmeler, polisakkaridler, lipidler, proteinler, karotenoidler, pigmentler, vitaminler, steroller, enzimler, antibiyotikler ve yararlı diğer kimyasallar yada prekürsörlerin, ayrıca hidrojen, hidrokarbonlar ve diğer biyoyakıtlar (metan, alkol) gibi çeşitli bileşiklerin üretimi için alglerin potansiyel bir kaynak olduğunu ortaya koymuştur. Günümüzde sağlıklı gıda üretimi için genellikle filamentöz siyanobakteri *Spirulina* ve tek hücreli yeşil mikroalg *Chlorella*, daha az olarak da yeşil mikroalg *Scenedesmus*' un kültürü yapılmaktadır. Ayrıca *Dunaliella* ve *Spirulina*

pigment üretimi için değerlendirilen türlerdendir (Becker, 1995; Borowitzka, 1997; Spoloare et al, 2006).

2.3.1 Kültür sistemleri ve sınıflandırılması

Laboratuvar koşullarında amaca uygun olarak izole edilmiş, uygun bir biçimde besleyerek çoğaltılıp üreme imkanı sağlanan bilimsel veya ekonomik amaçlı sürdürülebilir popülasyonlara kültür denilmektedir. Kültür tek tür içeriyorsa “saf kültür”, saf kültür bakterisiz ise “aksenik kültür”, bakteriler ve başka türler de bulunuyorsa “ksenik kültür” olarak adlandırılmaktadır (Sukatar, 2002).

Hasat sistemlerine göre ise; kültürdeki hücrelerin yavaşlayan büyüme fazındayken daha büyük kültür ortamlarına inoküle edilip belli bir büyüme periyodundan sonra hasat edilmesiyle sürdürülen “kesikli kültürler”, eski ortamın taze ortam ile değiştirilmesiyle kültürün logaritmik kültür evresinde tutulmasıyla devam eden “sürekli kültürler” ve periyodik olarak kısmi hasat yapıldıktan sonra alınan kültür kadar besleyici ortam ilave edilmesiyle sürdürülen “yarı sürekli kültürler” olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (Sukatar, 2002).

Mikroalg üretim sistemleri, “açık ve kapalı alan kültür sistemleri” olmak üzere iki şekilde bulunmaktadır. Kültür sisteminin seçimi alglerin biyolojisine, arazi, laboratuvar, enerji, su ve beslenme maliyetlerine, iklime ve elde edilmek istenen son ürüne göre değişmektedir (Naz ve Gökçek, 2004; Pulz, 2001; Sukatar, 2002).

Açık alan kültür sistemlerinde (Şekil 2.2, Şekil 2.3) sadece ekolojik toleransı geniş ve kontaminasyonlara az duyarlı olan algler üretilmektedir. Malzeme ve ışık kaynağının sağlanması açısından ekonomik açıdan kapalı sistemlere göre avantajlıdır. Açık alan kültür sistemlerindeki temel sorun ise kontrol edilemeyen çevre şartları nedeniyle teorik olarak elde edilebilecek verimden çok daha düşük miktarlarda verim elde edilmesidir. Açık alan kültür sistemleri tanklar, alveolar panel sistemler, kanal havuzlar, dairesel havuzlar, karıştırılmayan büyük havuzlar ve doğal alanlar olmak üzere altı şekilde görülmektedir (Kargın Yılmaz, 2006; Naz ve Gökçek, 2004; Pulz; 2001, Sukatar, 2002; Tredici, 2004).



Şekil 2.2 Texcoco Göl'ü

(<http://www.spirulina-program-org/4texcoco.htm>)



Şekil 2.3 Açık havuzlarda üretim

(www.naturland.com)

Kapalı alan kültürleri (Şekil 2.4,Şekil 2.5,Şekil 2.6,Şekil 2.7,Şekil 2.8)ekonomik olmasa da ekolojik toleransı dar ve kontaminasyon riski fazla olan türler için gerekli olan, temiz üretim, etkin ışık kullanımı, yüksek biyokütle ile çalışabilme, sıcaklığın ve ışık şiddetinin kontrol edilebilmesi bakımından avantajlı sistemlerdir. Karboylar, torbalar, basit tanklar, asansörlü fotobiyoreaktörler, içten aydınlatmalı fotobiyoreaktörler, ince panel fotobiyoreaktörler, çift havalandırılmalı fotobiyoreaktörler, tüplü fotobiyoreaktörler, heterotrofik fermentörler, heterotrofik/ototrofik fotobiyoreaktörler kapalı sistemlerin önemli örneklerindendir (Kargın Yılmaz, 2006; Naz ve Gökçek, 2004; Pulz, 2001; Sukatar, 2002; Tredici, 2004).



Şekil 2.4 Karboylarda *Spirulina* üretimi, Adana, Türkiye

(www.ntv.msnbc.com/news)

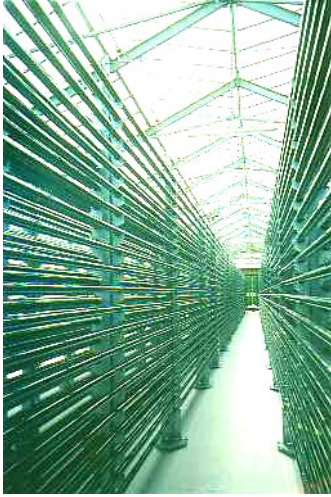


Şekil 2.5 Polietilen torbalarda üretim

(www.fao.org)



Şekil 2.6 *Chlorella* üretimi yapan Klötze Tesisi, Almanya
(www.igv-gmbh.de)



Şekil 2.7 Klötze Tesisi (tübüler sistem)
(www.kutz.de/werke/algenhtm)



Şekil 2.8 Fotobiyoreaktörde *Porphyridium* sp.
üretimi
(www.activalg.fr/img)

2.3.2 Kültür koşulları

2.3.2.1 Kültür kaplarının seçilmesi

Kaplar, daima ışığı geçirmek koşuluyla, piramidal, silindirik, küresel, prizmatik şekillerde olabilir. En önemli problemlerden biri hücrelerin kültür kapları cidarına yapışmasıdır, bu nedenle plastik kaplar yerine daha çok cam kaplar tercih edilir (Cirik ve Gökpınar, 1999; Koray, 2002).

Kültürün hangi amaçla yapıldığı kapların seçiminde önemli bir faktördür. Sıvı kültürler amaca göre 100 mL'den 20 L'ye kadar olan cam kaplarda yapılabilir. Katı stok kültürler için petriler, 5-20 cm uzunluktaki deney tüpleri ve 50-250 mL hacimli erlenmayerler kullanılabilir. Tüplerin ve erlenmayerlerin ağzı iyice kapanmalı, hava sirkülasyonuna izin verilmemeli, steril edildikten sonra kullanılmalıdır. Ancak kullanım veya fiziko-kimyasal araştırmalar için yapılan kültürlerin 1-20 L'lik cam kaplar, havuz ve tanklarda yapılması gerekebilir (Koray, 2002; Sukatar, 2002).

2.3.2.2 Aydınlatma

Alg kültürleri fotosentez yapabilmek için bir ışık kaynağına gereksinim duyar. Işığın yoğunluğu ve süresi kültürlerin verimliliği açısından önemlidir. Yüksek ışık yoğunluğu fotosentezi inhibe ederken düşük ışık yoğunluğu fotosentezi sınırlayabilmektedir. Suni aydınlatma kaynakları kullanılacaksa bunların güneş ışığına eşdeğer olmasına dikkat edilir. Genel olarak 1000 lux ışık yoğunluğu stok kültürleri devam ettirmede yeterli olmakta yüksek bir üretim için 3500-5000 lux ışık

yoğunluğu gerekmektedir. Işık şiddetini ölçmek için lüksmetre veya kuantum sensörlü kuantum metreler kullanılmaktadır (Cirik ve Gökpınar, 1999; Sukatar, 2002)

Fotosentez için uygun olan enerji Fotosentezik Uygun Radyasyon – FUR ("Photosynthetic Active Radiation" veya "Photosynthetic Available Radiation"-PAR) olarak ifade edilir. FUR, bitkilerin fotosentez yaptığı 400-700 nm dalga boyları arasında yayılan görünür bölgedeki ışığı ölçer, lükse yakın bir ölçümleme sistemidir. Lambaların 400 ile 700 nm aralığındaki ürettiği fotonlar diğer tüm parametrelerin sabit olduğu varsayımı ile fluks gibi hesaplanabilir. Farklı lambalar için hesaplanacak FUR değeri karşılaştırma yapmak veya ihtiyaca uygun lamba seçmek için yararlı olabilmektedir (Çıngı, 2003; Masojidek et al., 2004). Açık kültür sistemlerinde doğal ışık aydınlatma için yeterlidir. Kapalı fotobiyoreaktörler ise iç ortamda veya dış ortamda kurulmuş olabilirler. Güneş enerjisinden yararlanmak için dış ortamdaki sistemler yaygındır (Grima et al., 2003).

FUR saniyede yüzeye ulaşan foton sayısıdır ve mikromol/saniye/m² veya microEinstein/saniye/m² olarak ifade edilir. Lumen gibi gerçek bir enerji değeri değildir, birbirleri arasındaki birim dönüşümü dolaylı yoldan spektral eğri kullanılarak hesaplanmaktadır (Çıngı, 2003). Işık akışı lumen (lm) olarak, aydınlatma şiddeti lux (lm m⁻²) veya eski ifadesiyle footcandle (1fc=10,76 lux) olarak bilinmektedir. Kuantum teorisine göre, ışık enerjisi foton yada kuantum adı verilen paketçikler halinde dağılır. Tek bir ışık paketçigi yada foton, frekans (ν)

ve Planck sabitinin ($h=6,626 \times 10^{-34}$ Js) bir ürünüdür ve enerjisi $E=h\nu$ olarak ifade edilir. Einshtein kanununa göre bir reaksiyonun başlaması için 1 mol bileşik, Avogadro sayısı ($N=6,023 \times 10^{23}$) foton kadar enerji absorblar ($N=E/h\nu=6,023 \times 10^{23}$ foton) (Masojidek et al., 2004).

1 mol foton= $6,02 \times 10^{23}$ foton
 1 mikromol foton= $6,02 \times 10^{17}$ foton
 $1 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}=1 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{sn}$
 $1 \text{ W daylight}=5-4,6 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$
 $1 \text{ W cool white}=4,6 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$

Farklı tipteki floresan lambaların dönüşüm katsayıları;

	<u>Katsayı</u>	
Cool-white (40 W)	C=0,30	Lux X C = $\mu\text{W}/\text{cm}^2$
Day Light	C=0,34	
Gro-lux	C=0,90	

(Cirik ve Gökpınar, 1999; İmamoğlu, 2004).

2.3.2.3 Sıcaklık ve pH

Kültür sistemlerinde genellikle optimum sıcaklık 18-22°C arasındadır, ancak alglerin çoğu 16-27°C arasındaki sıcaklığı tolere edebilmektedir. Düşük sıcaklıklar büyümeyi geciktirmekte çok yüksek sıcaklıklarsa kültürler için öldürücü olabilmektedir. Bir çok kültüre edilmiş alg için ideal pH sınırları ise 7 ile 9 arasında olup optimum pH 8,2 ve 8,7 arasında değişmektedir (Cirik ve Gökpınar, 1999; Sukatar, 2002). Fotosentez olayı sonucunda pH'nın 9,4'e ulaşması halinde kültürde ölüm fazına geçildiği anlaşılır ve bu pH'da fotosentez durduğundan hücre bölünmesi gerçekleşemez (Koray, 2002).

2.3.2.4 Havalandırma ve karıştırma

Karıştırma ve havalandırma mikroalglerin üremesini arttırdığı, biyokütlenin çökmesini engellediği, alglerin besin maddelerinden ve ışıktan eşit miktarlarda yararlanmasını sağladığı, ortamda sıcaklık katmanlaşmasını engellediği, fotosentetik O₂ oluşumunun sistemden uzaklaştırılmasını sağladığı ve reaktör ile hava arasındaki gaz alışverişini tetiklediği için önemli ve gerekli bir parametredir (Richmond, 2000; Sukatar, 2002). Yoğun kültürler elde etmek için havadaki CO₂ oranı (% 0,03) yeterli olmayabilir, havayla beraber CO₂ ilave edilmesi gerekebilir (Koray, 2002; Sukatar, 2002). Geniş hacimli kültürlerde havalandırma bazı türlerin maximum büyüme hızına ulaşması bakımından önemlidir. Ancak küçük hacimli kültürlerde havalandırma gerekmebilir. Kültüre verilen hava çeşitli toz partikülleri ve sporları içerebileceğinden önce bir filtreden geçirilmelidir (Sukatar, 2002; Cirik ve Gökpınar, 1999).

2.3.2.5 Kontaminasyon

Laboratuvar koşullarında yapılan kültürlerde başlangıçta kültüre edilecek organizmadan daha fazla miktarda olan bakterilerin kontrol altına alınması gerekir. Küçük hacimli kültürlerde otoklav sterilizasyonu yeterli olabilir. Antibiyotik kullanımı ise kültürlerin saflığını korumak, sterilizasyon yapılamadığı durumlarda bakteri çoğalmasını kontrol altına almak veya tür izolasyonu için gerekebilir. Antibiyotikler ne kadar az kullanılırsa kullanılsın bakterilerin yanı sıra diğer hücrelere de zarar verirler. Deniz suyu antibiyotiklerin etki miktarı ve süresinde önemli azalmalara sebep olabilmektedir. Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerin kültür kaplarındaki gelişimini engelleyen en uygun karışım

150 mg Penicillin+100 mg Streptomycin/ L' dir. Kùltürler kendileri antimikrobiyal maddeler üretinceye kadar başlangıçtan itibaren 3-5 gün ara ile antibiyotik ilavesi gerekebilir (Koray, 2002).

2.3.2.6 Biyokütlenin ortamdan ayrılması (hasat) ve saklanması

Algal biyokütle genel olarak; *Spirulina* gibi filamentöz algler için sıkça tercih edilen, oldukça ucuz ve etkili bir yöntem olan “filtrasyon”, filamentöz olan ve olmayan tüm algler için uygun olan “santrifüjleme”, son olarak da temelde atık su arıtımında kullanılan ve bazı kimyasalların ilavesini gerektiren “flokülasyon ve sedimentasyon” metodu gibi yöntemlerle ortamdan ayrılır (Becker, 1995; Mohn, 1988; Grima et al., 2003; Grima et al., 2004).

Dehidrasyon veya kurutma, biyokütlenin raf ömrünü uzatmak için gereklidir. İleride kullanılmak üzere saklanacak olan algal biyokütlerdeki nem oranının %10 olması istenmektedir. Aksi halde nem; bakteri,küf ve mantarların üremesini kolaylaştırarak bozulmaya neden olur. Mikroalgler için spreyci kurutma, davul tipi kurutucuda kurutma, dondurarak kurutma ve güneşte kurutma gibi yöntemler kullanılmaktadır. Büyük çaplı üretimler için liyofilizasyon çok pahalıdır ancak araştırma laboratuvarlarında sıkça kullanılmaktadır. Liyofilizasyon veya dondurarak kurutma (freeze-drying)' da algin tüm orijinal içeriği değişmeden kalmaktadır. Bazı durumlarda kuru biyokütlenin çözgen ekstraksiyonu intraselüler metabolitlerin kazanılması açısından daha verimli olmaktadır. Yağlar gibi intraselüler ürünlerin solvent ekstraksiyonu yaş biyokütle

kolay parçalanmadığından zor olmaktadır (Becker, 1995; Grima et al., 2003; Grima et al., 2004).

Liyofilizasyondan önce algal biyokütlenin içeriğindeki suyun buz hale gelmiş olması gerekmektedir. Liyofilizasyonda birincil kurutmada; nem miktarı % 20'nin (w/w) altına düşürülür, ikincil kurutmada ise; nem miktarının genellikle % 1 (w/w) olan son değerine ulaşması sağlanır. Liyofilizasyon sırasında buz halindeki su 4,6 mmHg kısmi basınç altında erimeden buharlaşır (süblimasyon). Bu işlem sırasında her 1 kg buz için 2800 kJ civarında ısı enerjisine ihtiyaç vardır (Grima et al., 2004).

2.3.3 Kültürlerde büyümenin izlenmesi

Mikroorganizmaların birim hacimde veya birim alanda, belirli bir zaman aralığında, kuru veya yaş ağırlığında organik kütle artışının kantitatif olarak değerlendirilmesi hücre sayısı, optik yoğunluk, kuru veya yaş ağırlık, klorofil miktarı, organik karbon vs. gibi algal büyüme ile ilgili parametrelerin hassas bir şekilde ölçülmesiyle yapılır (Becker, 1999).

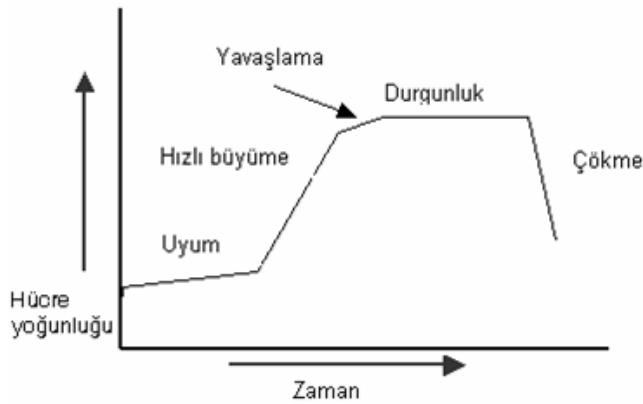
Kültür ortamına aşıl原因 hücrelerin ortama uyum sağlayıp çoğalmaya başlayıncaya kadar geçen süreye gecikme fazı (uyum-lag faz) denir. Burada yavaş bir şekilde artan hücre konsantrasyonu belli bir düzeye ulaşıncaya kadar logaritmik evreye (hızlı büyüme) varılır. Bu evrede hücreler eşit zaman aralıklarında logaritmik olarak artar. Sabit hacimde yapılan kesikli kültürlerde (batch) bu artış ortamdaki besinler tükeninceye kadar sürer. Daha sonra büyümeyi sınırlayan çeşitli faktörlerin etkisiyle büyüme bir duraklama evresine (yavaşlama) girer.

Bu evreyi büyüme hızının sabit bir katsayı halinde kaldığı sabit evre (durgunluk) izler. Ölü hücreler ve canlı hücrelerin sayısı neredeyse eşit hale gelmiştir. Hücre konsantrasyonunda zamana göre net bir artış yada azalma gözlenmez. Daha sonra kültür ölüm fazına girer ve sona erer (çökme) (Şekil 2.9) (Becker, 1999; Sukatar, 2002; Cirik ve Gökpınar, 1999).

Spesifik büyüme hızı ($\mu = (\ln x_2 - \ln x_1) / \Delta t$) biyokütlede birim zamanda meydana gelen nisbi ya da kısmi artışı ifade eder. Alg kültürlerinde göz önüne alınan zaman birimleri genellikle saat^{-1} veya gün^{-1} 'dir. (Becker, 1995; Cirik ve Gökpınar, 1999).

x_1 ve x_2 ; t_1 ve t_2 zamanındaki hücre konsantrasyonları

$\Delta t = t_2 - t_1$ İkilenme süresi ($D. T$) = $\ln 2 / \mu$



Şekil 2.9 Mikroalgal kültürlerde büyüme kinetiği

2.4 Çözgen ekstraksiyonu ve uçucu yağlar

Ekstreler 1974 Türk Farmakopesi' nde “bitkisel ve hayvansal maddelerin, su, etanol ve eter gibi uygun bir çözügendeki ürününün belli bir kıvama gelene kadar uçurulması ile elde edilen farmasötik preparasyonları” olarak tanımlanmaktadır. Eğrelti Otu (*Dryopteris filixmas*)' nun barsak parazitlerine karşı kullanılan “filisin” maddesini içeren (% 21-23) eter ekstraktı Filicis Extractum adıyla; Belladon otu' (*Atropa belladonna*) nun % 70' lik etanolle hazırlanan ve sindirim sistemi ile safra kesesinde kasılma, kolik benzeri ağrılarda kullanılan hiyosiyamin alkaloidi (% 0,95-1,05) içeriği ile Belladonnae Extractum Siccum (Belladon Kuru Ekstraktı) 1974 Türk Farmakopesinde yer almaktadır.

Doğal ürünlerin ilk saflaştırma aşamalarında katı-sıvı ekstraksiyon tekniklerinin geniş bir kullanım alanı vardır. Katı materyalin ekstraksiyonu için yaygın olarak Sokslet, maserasyon, perkolasyon, turbo-ekstraksiyon (yüksek hızda karıştırma) ve sonikasyon gibi klasik yöntemlerin yanı sıra süperkritik sıvı ekstraksiyonu, mikrodalga eşliğinde ekstraksiyon ve basınçlı çözgen ekstraksiyonu gibi hızlı yöntemler de kullanılmaktadır (Djilani et al., 2006; Huie, 2002; Kaufmann and Christen, 2002).

Çözgen ekstraksiyonu algal biyokütleden astaksantin, β -karoten ve esansiyel yağ asitlerinin alınması için sıkça kullanılan bir yöntemdir. Hekzan, etanol, kloroform ve dietil eter gibi çözgenler EPA, DHA, AA gibi yağ asitlerini ekstrakte edebilmektedir. Sulu tamponlarda yapılan ekstraksiyonda *P. cruentum*' dan fikobiliproteinler ve *C. vulgaris*' den

lutein elde edilmiştir. Pek çok proteinin ekstraksiyonu için biyokütlenin önceden kurutulmamış olması gerekmektedir (Grima et al., 2003).

Uçucu yağlar, bitkisel kaynaklardan çeşitli yöntemlerle elde edilen, genellikle oda sıcaklığında sıvı halde olan, renksiz veya açık sarı renkte ve kolayca kristalleşebilen, kuvvetli kokulu, su buharı ile sürüklenabilen yağimsı karışımlardır. Uçucu yağlar açıkta bırakıldığında oda sıcaklığında bile buharlaşabildiğinden eterik yağ olarak da ifade edilebilmektedir. Su ile karışmayıp yüzeyde tabaka oluşturdıklarından yağ adı ile anılırlar. Suda az tüm lipofil çözücülerde iyi çözünürler. Genel olarak uçucu yağlar sudan hafiftirler, ancak bazı aromalı veya kükürtlü uçucu yağların yoğunluğu 1' den büyüktür. Uçucu yağlar su buharı ile sürüklenme, sulu etanolde çözünebilme ve süzgeç kağıdında leke bırakmama gibi özelliklere de sahiptir. Sabit yağlar ise su buharı ile sürüklenmez, sulu etanolde çözünemez ve süzgeç kağıdında leke bırakırlar. Uçucu yağlar yağ asidi, gliserol esterleri yapısında olmadığından zamanla acılaşırlar. Ancak ışık ve hava karşısında zamanla oksitlenir ve reçineleşirler (Ceylan, 1996).

Uçucu yağlar distilasyon (su, su ve buhar, buhar), mekanik yöntem (presleme), anfloranj (yağ ile ekstraksiyon) ve uçucu çözücüler yardımı ile ekstraktörde tüketme metotları ile elde edilir (Ceylan, 1996). Lipidler, lipofilik organik çözücüler (eter, petrol eteri, kloroform vb.) ile ekstrakte edilir ve “total lipidler” olarak ifade edilir. Lipidler polaritelerine göre; nonpolar (lipofilik) karbon zincirleri (yağ asitleri) ve polar (hidrofilik) lipidler (karboksilik gruplar, alkoller ve şekerler) olarak sınıflandırılırlar (Becker, 1995).

Uçucu yağlardaki maddeler, terpenik, aromatik, düz zincirli hidrokarbonlar ile azot ve kükürt taşıyan bileşikler olarak dört grup altında toplanabilir. Uçucu yağların çoğu terpenik maddelerden oluşmaktadır (Ceylan, 1996). Hidrokarbonlar (alkanlar ve alkenler) uçucu yağlarda bol miktarda bulunmaktadır. Hidrokarbonların oranı uçucu yağlarda ve çözgen ekstraktlarında farklıdır. C_{15} , C_{17} , AC_{17} , C_{27} , AC_{27} hidrokarbonları lipofilik ekstraktlarda ağırlıklı olarak bulunmaktadır. Uçucu yağlarda ise C_{11} - C_{30} yaygın olarak bulunmaktadır. Hücredeki tüm membranlar bu yağları içermektedirler. Çözgen ekstraksiyonu tüm membranlardan total hidrokarbonların izolasyonunu sağlamaktadır. Hidrokarbon kompozisyonundaki farklılıklar buhar distilasyon ürününün intraselüler membranlar dışında sadece plazma membranı kaynaklı olması nedeniyle gözlenir. Dolayısıyla, uçucu yağlarda uzun zincirli yağ asitlerinin metil esterleri bulunmamaktadır (Kamburova et al., 2003).

Alglerden suya ve atmosfere salınan uçucu yağlar çevreyi etkilemektedir. Denizel makroalglerden salgılanan uçucu bileşenler hakkında yeterince bilgi bulunmaktadır. Siyanobakterilerde hidrokarbonlar uçucu yağların temel bileşenleridir. Tatlı su mikroalglerinin çok az bir bölümünde uçucu yağ araştırılmıştır (Kamburova, et al.; 2003). Uçucu yağlar çok eskiden beri fizyolojik etkileri nedeniyle tedavide, tat ve kokuları güzel olduğundan ilaç yapımında katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Ayrıca parfümeri, kozmetik, sabun, deterjan, diş macunu, şeker sanayiinde bol miktarda kullanılmaktadır (Ceylan, 1996).

2.5 Gaz kromatografi ve kütle spektroskopisi

Kromatografi ayrılacak olan komponentlerin iki faz arasında dağıldığı fiziksel bir ayırma metodudur. Bu fazlardan bir tanesi geniş yüzeyli sabit bir yatak teşkil eder, diğeri sabit yatak boyunca süzülerek geçen bir gaz veya sıvıdır. Kromatografi ilk defa 1906 yılında bir Rus botanist olan Tswett tarafından bitkilerin renk verici komponentlerinin ayrılmasında kullanıldı. Tswett renkli maddelerin ayrı bantlarını elde ettiği için bu metodu “kromatografi” olarak isimlendirdi (Orhun, 1968).

Gaz-likid partiyon kromatografisi ilk defa olarak James ve Martin tarafından 1952 yılında uçucu yağ asitleri karışımlarının analizlerinde ve ayrılmasında kullanıldı. Gaz kromatografisi kimya alanında gazların ve uçucu maddelerin analizleri ve ayrılmasında uygun bir metod olarak yaygın bir şekilde kabul edilmiştir. Kromatografik metodların ayırma cihazının daha basit oluşu, çalışma kolaylığı ve dikkate değer şekilde az zamana ihtiyaç göstermesi bakımından üstünlükleri vardır (Orhun, 1968).

2.6 Farmakolojik aktivitenin araştırılması

2.6.1 Antimikrobiyal aktivite testleri

Günümüzde bakterilerin antibiyotiklere duyarlılıklarını belirlemede standardize edilmiş testler disk difüzyon, agarda dilüsyon, tüpte dilüsyon ve e-test gibi testlerdir. Disk difüzyon testi ucuz, esnek bir test olması ve özel aletler gerektirmemesi nedeniyle avantajlıdır. Ancak yavaş yada güç üreyen mikroorganizmalarla doğru sonuç alınamayabilir. Kalitatif bir yöntemdir. Duyarlılığı kantitatif olarak belirlemek için minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) belirlemek gerekmektedir. MİK testleri

zaman alıcı ve çok sayıda bakteri için kullanımındaki güçlükler nedeniyle her zaman tercih edilmemektedir (Gür, 1997; Sümerkan ve Gökahmetoğlu).

Antibiyotik duyarlılık testlerinin standardizasyonu için İngiltere’de The British Society for Antimicrobial Chemoterapy (BSAC) ve Amerika Birleşik Devletleri’nde National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) gibi çeşitli komiteler oluşturulmuştur. Ülkemizde 1994 yılında Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin standardizasyonu (ADTS) Çalışma Grubu kurulmuştur (Gür,1997).

2.6.2 Antioksidan aktivite testleri

Hücre çoğalmasının doğasında var olan oksijen tüketimi bir grup reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna neden olur. Bunlar süperoksit anyon radikalleri ($O_2^{\cdot -}$) ve hidroksil radikalleri ($OH^{\cdot}$) gibi moleküllerdir. Serbest radikal türü olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) ve tekli oksijen (O_2) de *in vivo* olarak oluşmaktadır. Her iki oksijen türü de enerji üretimi, fagositoz, hücre büyümesinde, hücre içi sinyallerin düzenlenmesinde ve biyolojik olarak önemli bileşiklerin sentezinde pozitif rol oynamaktadırlar. Ancak ROS çok zararlı olabilmekte, hücre membranındaki lipidlere ve DNA’ ya zarar verebilmektedir. ROS ile indüklenen oksidasyon, hücre membranının parçalanmasına, membran protein hasarına ve DNA mutasyonlarına neden olarak pek çok hastalığın başlamasına ve oluşumuna neden olur (Gökpınar vd., 2006; Gülçin et al., 2004; Hernández-Becerril, 2007).

Lipid peroksidasyon, gıdaların bozulması ve besin değerini kaybetmesine neden olur. Lipid peroksidasyonun temel yol izi kendiliğinden gerçekleşen serbest radikal zincir reaksiyonudur. Işık, oksijen, serbest radikaller ve metal iyonları gibi çevresel faktörler tarafından da katalizlenebilirler. 1940'ların sonlarında bazı fenolik bileşikler tarafından lipid peroksidasyonun inhibisyonunun keşfi sentetik antioksidanların gıda endüstrisinde kullanılmasını sağlamıştır (Gülçin et al., 2004; Marxen et al., 2007).

Antioksidanlar etkilerini; oksidanları tutma ve zayıf bir moleküle dönüştürme (temizleme-sacavenging), oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme (baskılama-quencher), organizmanın onarım mekanizmasını aktive etme (onarım-repair) ve oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını önleme (zincir koparma-chain breaking) ile gerçekleştirirler (Gökpınar vd., 2006).

Çeşitli mekanizmalar sonucu ortaya çıkan serbest radikallere karşı vücutta süperoksit dismutaz-SOD, katalaz-CAT, glutatyon peroksidaz-GP, glutatyon redüktaz, sitokrom-C-oksidad, hidroksiperoksidaz gibi enzimler, seruloplazmin, transferrin, ferritin, miyoglobulin, haptoglobulin gibi makromoleküller ve β -karoten, A-vitamini, C-vitamini, tokoferoller, tiyol içeren, glutatyon (GSH), N-asetil sistein, metyonin, kaptopril, ubikinon gibi mikromoleküllerin rol oynadığı doğal bir savunma mekanizması vardır (Gökpınar vd., 2006).

Düzgün çalışan bir metabolizmada mitokondriyal sitokrom sistemi, sitozoldeki organeller organizmayı oksidanların zararlı etkilerinden

korumaktadır. Bu sistem yetersiz kaldığında doğal enzimler devreye girmektedir. Enzimlerce etkisiz hale getirilemeyen oksidanlar ilk olarak hücre membranındaki lipidleri etkileyerek “lipid peroksidasyonunu başlatmaktadır. Lipid peroksidasyonu, membranlarda bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehitler gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur ve sonuçta ortaya çıkan biyo-aktif aldehitler hücre hasarına neden olmaktadır. Lipid peroksidasyonu sırasında yeterli düzeyde E vitamini ve C vitamini gibi antioksidan bileşiklerin bulunması halinde bu tip hücresel hasarların önüne geçilebilmektedir (Gökpınar vd., 2006).

Tokoferoller (E vitamini), askorbik asit (C vitamini), karotenoidler, bioflavonoidler ve retinoidler karasal kaynaklı ürünlerde ve alglerde bulunabilen antioksidan bileşiklerdir. İnsan vücudunda tokoferol sentezlenemediği için dışarıdan alınması gerekmektedir. Vücuda alınan tokoferol incebağırsakta emilir ve lenf yolu ile dolaşıma katılır. E vitamininin antioksidan özelliği, serbest radikallerin başlattığı lipid peroksidasyonunu inhibe etmesinden ileri gelir (Gökpınar vd., 2006).

Sadece fitoplankton, algler, bitkiler ve sınırlı sayıdaki mantar ve bakteriler tarafından üretilebilen, 700’ün üzerinde yağda çözünebilen bir grup bileşik olan karotenoidler önemli antioksidan maddelerdir. Diyetteki yağ miktarıyla orantılı olarak ince barsakta % 5-50 oranında pasif difüzyon ile emilmektedir. Karotenoidler hücreyi oksidatif stresten; triplet molekülleri ve singlet oksijeni süpürerek, serbest radikalleri inhibe ederek korumaktadır. Karotenoid biriktirme yeteneğine sahip olan türler

arasında *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella zofingiensis*, *Dunaliella salina* ve *Haematococcus pluvialis* bulunmaktadır (Gökpınar vd., 2006; Marxen, 2007).

Provitamin A aktivitesi gösteren karotenoidler α , β , γ karoten ve kriptoksantindir. Zeaksantin ve lutein pigmentleri *Dunaliella salina*' dan elde edilmektedir. Güçlü bir antioksidan özelliğe sahip olduğu için süper karotenoid olarak adlandırılan “astaksantin” pigmenti *Haematococcus pluvialis*' ten elde edilebilmektedir. Alglerin fotosentetik pigmentleri arasında yer alan karotenoidlerin çoğu fotosentez işleminde aktif olarak rol oynamayıp ışıktan kapılan enerjinin klorofil moleküllerine aktarılmasını sağlamaktadır ve aksesuar pigmentler arasında kabul edilmektedir (Gökpınar vd., 2006).

A vitamininin hammaddesi olan β -karoten, serbest radikalleri süpürme etkisiyle organizmayı oksidasyonun neden olduğu hasara karşı korumaktadır. Karotenoidlerin antioksidan aktivitelerine bağlı olarak kanser oluşumunu inhibe ettikleri, bazı karotenoidlerin UV ışık ve kimyasalların neden olduğu tümörleri inhibe ettikleri ve immun cevabı arttırdıkları, yüksek antioksidan aktiviteye sahip E vitamininin ise cildi UV ışığın neden olduğu hasarlara karşı koruduğu gösterilmektedir (Gökpınar vd., 2006).

2.6.3 Analjezik ve antiinflamatuvar etki

Akut ve kronik ağrı yakınmasına yönelik tedavi yaklaşımları yüzyıllardır tıbbın ve araştırmacıların başlıca ilgi alanlarından biridir. Ağrı çok sayıda subjektif ve öngörülemeyen, tanımlanamayan faktörlerin

bileşiminden ileri gelmektedir. Organik bir bozuklukla ilişkili veya ilişkisiz bir psikolojik stres haline işaret eden bir semptom veya bundan kaynaklanan bir reaksiyonun dışı vurumu olarak düşünülebilmektedir. Ağrı, emosyonel durumu ve karakter özelliklerini etkileyebilir ve dikkat düzeyinde değişikliklere yol açabilmektedir (Kelle, 2006).

Ağrı 1979 yılında “International Association for the Study of Pain Subcommittee on Taxonomy” tarafından “gerçek yada olası bir doku hasarına bağlı olarak yaşanan, hoş olmayan duyuşsal veya duygusal bir deneyim” olarak tanımlanmaktadır. Ağrı bireysel bir deneyimdir fakat insanlarda ve hayvanlarda oldukça belirgin etkileri görülmektedir. Klinik düzenlemelerde, ağrı yaşayan hastaların sıkça ağrıyla ilişkili olarak bazı davranışlarında değişikliklere rastlanmıştır. Bu değişiklikler aktivite azalması, ilaç alımının artması, yüz ifadelerinde veya vücut pozisyonundaki değişikliklerdir. Ağrı davranışları açık olduğunda, gözlenebilir veya kaydedilebilir niteliktedir. (Keefe et al., 1991).

Ağrı davranışlarına yönelik sistematik çalışmalar hayvanlarda ve artarak da insanlardaki ağrı araştırmalarında görülmektedir. Hayvanlarda ağrı ile ilgili testlerden bazıları tail-flick (kuyruk çekme), hot plate (sıcak zemin), formalin pençe yalama testi ve flinch-jump (kaçınma-sıçrama) testidir (Keefe et al., 1991).

Formalin testi Dubuisson ve Dennis (1977) tarafından geliştirilmiş, kedilerde ve ratlarda ağrı ve analjezinin araştırılması için kullanılan metottur. Yöntem sıçanın arka pençesine %5’lik (v/v) formalin çözeltisinin subkütanöz enjeksiyonuna dayanmaktadır. Formalin

insanların işaret parmağına enjekte edildiğinde başlangıçta yoğun, keskin, yakıcı ve arı sokmasına benzer bir ağrı oluşturmaktadır. 4-5 dak sonra ağrı devamlı ve zonklayıcı bir hal almakta ve 30-60 dak sonra orta şiddette bir hassasiyet kalmaktadır. Hayvanlarda ağrının 30 dak içinde geçtiği düşünülmektedir (Keefe et al., 1991).

Formalin testi, nosisepsiyonun en doğru ve güvenilir modelidir ve değişik sınıflardaki analjezik ilaçlar için duyarlıdır. Bu test bifazik cevap oluşturur; erken faz (0-5 dak), ağrı oluşturan sinir liflerine (C sinir lifleri) direkt kimyasalın iritan etkisini gösterirken, geç faz (15-30 dak) periferik antiinflamatuvar cevabı ve sinir uçlarında ağrı oluşturuca maddelerin salınımını göstermektedir (Karabay-Yavasoglu et al., 2007a; Tjolsen et al., 1992). Testin her iki fazı da farklı analjeziklerden etkilenebilmektedir. Bu sebeple formalin testi, farklı analjezik ilaçların olası mekanizmalarını ortaya çıkarmak için kullanılmaktadır (Morteza-Semnani et al., 2002).

2.6.3.1 Ağrının sınıflandırılması

Ağrı, fizyolojik-klinik, süresine göre, kaynaklandığı bölgeye göre, mekanizmalarına göre sınıflandırılabilir (Edirne, 2007) .

Fizyolojik-klinik ağrı sınıflandırması

“Fizyolojik ağrı” yoğun ağrı veren bir uyarana karşı koruyucu bir yanıttır. Vücut için hem koruma hem de uyarı sistemidir. “Klinik ağrı”da ise olaya bir çok süreç katılmaktadır (Edirne, 2007).

Süresine göre ağrı sınıflandırması

Akut ve kronik ağrı olmak üzere iki şekilde meydana gelmektedir. “Akut ağrı”, ani olarak doku hasarı ile başlayan, neden olduğu hasar ile arasında yer, zaman ve şiddet açısından yakın ilişkinin olduğu, iyileşme süresince giderek azalan ve kaybolan bir ağrı şeklidir. “Kronik ağrı”, akut ağrılı hastalığın olağan seyrinden veya bir yaralanmanın iyileşme süresinden çok daha uzun, aylar, hatta yıllar boyu aralıklarla devam eden ağrıdır (Edirne, 2007; Kelle, 2006).

Kaynaklandığı bölgelere göre ağrı sınıflandırması

“Somatik ağrı”, daha çok sinir lifleriyle taşınan, ani olarak başlayan, keskin, batma, sızlama, zonklama tarzında, genellikle travma, kırık, çıkık gibi durumlarda görülen ağrıdır. “Viseral ağrı”, iç organlardan kaynaklanan ağrılardır. Genellikle künt, yavaş yavaş artan, yeri kolay saptanamayan, başka bölgelere yayılan ve yansıma bölgeleri olan ağrılardır. “Sempatik kökenli ağrı”, sempatik sinir sisteminin tutulduğu, asıl hastalık geçtikten sonra haftalar, aylar sonra başlayıp şiddeti giderek artan yanma tarzında ağrılardır (Edirne, 2007).

Mekanizmalarına göre

“Nosiseptif ağrı”, fizyopatolojik bir takım olayların ve süreçlerin nosiseptör adı verilen ağrı algılayıcılarını uyarmasına bağlı olarak ortaya çıkar. Nosiseptörlerin çeşitli somatik kökenli ağrılarda viseral ağrılarda olduğu gibi uyarılmasıyla genellikle ağrı olarak bilinen ve tanımlanan ağrı ortaya çıkar. Nosiseptif ağrının tedavisinde aspirine benzeyen çeşitli

ilaçlar ve morfin gibi merkezi etkili ağrı kesiciler kullanılır (Edirne, 2007).

“Nöropatik ağrı”, sinirlerde, darbe yada diyabet gibi bir hastalık sonucu ağrı algılayıcılarının doğrudan etki altında kalmasıyla ortaya çıkan bir ağrıdır. Bel fıtığındaki gibi mekanik bir baskı yada şeker hastalarında olduğu gibi salgılanan çeşitli maddeler sinir dokusunu etkileyerek nöropatik ağrıya yol açabilir. Nöropatik ağrının merkezi etkili antidepresanlar, sedatifler gibi ikincil analjezikler denilen ilaç gruplarının desteğine ihtiyaç duyulur (Edirne, 2007; Kelle, 2006).

“Deaferantasyon ağrısı”, çevre ve merkez sinir sistemi bozukluklarına bağlı olarak sinir iletilsinin kesilmesi ile ortaya çıkar. Kolu bacağı kesilenlerde ortaya çıkan hayalet ağrıları, zona sonrası görülen şiddetli ağrılar örnek olarak verilebilir. “Reaktif ağrı”, çeşitli kas ağrıları, damarların büzüşmesine bağlı olarak ortaya çıkan ağrılar şeklinde ortaya çıkar. Kasların değişik bölgelerinde tetik noktası adı verilen noktaların uyarılmasıyla yansıyan ağrılar ortaya çıkar. “Psikosomatik ağrı”, psişik yada psikososyal sorunların ağrı olarak ifade edilmesidir (Edirne, 2007).

2.6.3.2 Analjezik ilaçlar

Ağrının kontrolünde opioid ve non-opioid olmak üzere başlıca iki grup ilaç tek başlarına veya kombine edilerek kullanılmaktadır. Ancak günümüzde bu ilaçlara karşı gelişen tolerans, bağımlılık, gastrointestinal kanama ve böbrek yetmezliği gibi yan etkiler nedeniyle yeni alternatif ilaçların araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Kelle, 2006).

Analjezikler toplumda antibiyotiklerle birlikte en sık kullanılan ilaçların başında yer almaktadır. Merkezi etkili ve bölgesel etkili olmak üzere iki grupta sınıflanır. Morfin-Opium benzeri türevleri 5000 yıldan beri, salisilik asit (aspirin) ise 100 yıldır kullanılmaktadır. Son 50 yılda da her iki gruptan çok sayıda yeni ilaç geliştirilmiştir. 1853’de Hoffman tarafından söğüt yaprağından aspirinin bulunması ile nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) olarak da bilinen bölgesel etkili ağrı kesiciler konusunda çığır açılmıştır. Hafif ve orta şiddetteki ağrılar, ateş, romatizmal ateş, romatoid artrit gibi inflamatuvar durumların, kronik ağrıların ve kanser ağrısının tedavisinde kullanılır (Edirne, 2007).

NSAİİ ilaçlar etkilerini hem periferik hem de santral yapılarda bulunan siklooksijenaz enzimini (COX) inhibe ederek göstermektedirler. Mide, böbrekler ve trombositlerin fizyolojik fonksiyonlarını sürdürmesinde hayati önem taşıyan COX-1 enzimini inhibe eden ilaçlar ve inflamatuvar süreçte rol oynayan indüklenabilir nitelikteki COX-2 enziminin aktivitesini baskılayarak etki gösteren ilaçlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar (Kelle, 2006).

Merkezi etkili analjezikler, opioidler ve ikincil analjezikler olarak ikiye ayrılır. Morfin 1803’de Setürner tarafından *Papaver somniferum* bitkisinin tam olgunlaşmamış tohum kapsüllerinin çizilmesiyle dışarı çıkan sıvının hava ile kararması ve sakız kıvamına gelmesi ile elde edilen opiumdan (afyon) izole edilmiştir. Morfin ve benzeri ilaçlar sıklıkla “narkotik analjezikler” olarak isimlendirilirler. Opioidler kendilerine özgü reseptörlere bağlanarak etkilerini gösterirler. Opioidler şiddetli ve sürekli ağrıda, yaralı iken, keskin ve arada sırada gelen ağrıda o kadar

etkili değildir. Kanser ve diğer ağır hastalıklara bağlı kronik ağrılarda kullanılabilir. İkincil analjezikler, esas kullanım alanları ağrı dışında olan, ancak günümüzde bazı ağrı sendromlarında etkili olduğu bilinen, farklı farmakolojik gruplara ait ilaçların tümünü kapsayan bir kavramdır. Antidepresanlar, sakinleştiriciler, kas gevşeticiler, kortizon ve daha bir çok ilaç bu gruptadır (Edirne, 2007).

2.6.3.3 Antiinflamatuvar ilaçlar

Antiinflamatuvar etkinlik en güçlü olarak antiinflamatuvar glukokortikoidler (steroid yapılı ilaçlar) tarafından gösterilmektedir. Bunun dışında NSAİİ ilaçlar da çeşitli derecelerde antiinflamatuvar etki potansiyeline sahiptir ve glukokortikoidlere göre yan etkileri de daha azdır (Dökmeci, 2000).

Deney hayvanlarında antiinflamatuvar aktivitenin varlığının ve gücünün ölçülmesi temelde deney hayvanının arka pençesine, kulak kepçesine, sırt altı derisine, plevra, periton veya mesane içerisine inflamasyon oluşturan bir ajan verilerek o bölgede inflamasyon oluşumunu sağlamak ve bu inflamasyonun antiinflamatuvar etkinliği olduğu varsayılan maddeler tarafından gerçekleştirilen inhibisyonun bilinen bir antiinflamatuvar ajanla kıyaslanması esasına dayanmaktadır (Özbek ve Öztürk, 2003).

Temelde analjezik etkinin ölçülmesinde yararlanılan formalin testi, nosisepsiyonun geçerli ve güvenilir bir modelidir ve pek çok gruptaki analjezik ilaçlar için duyarlı bir yöntemdir. Test bifazik yanıt oluşturmaktadır: erken fazın nosiseptif aferent fiberlerin doğrudan

kimyasal aktivasyonunun sonucu oluştuğu ve periferel inflamatuvar proseslerin de geç fazdan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Periferel aktiviteli ilaçlar sadece geç fazı inhibe ederken santral etkili analjezikler her iki fazı da inhibe ederler. Opioidler (Morfin) gibi santral etkili ilaçlar her iki fazda da açıkça uyumlu bir şekilde inhibisyon yaparlar. Formalin test sonuçlarına göre, indometazin, aspirin ve hidrokortizon gibi periferel aktiviteli ilaçlar sadece antiinflamatuvar yanıtın sonucu olan geç fazı inhibe etmektedirler (Karabay-Yavasoglu et al., 2007a).

2.6.4 Toksisite testleri

Toksisite testleri, sadece kimyasal maddelerin canlı organizmalar üzerindeki zararlı etkilerini açıklamak için değil bu maddelerin toksik etkilerinin görülmeyeceği doz, değerlerini saptamak için de yapılmaktadır. Eğer, uzun süreli madde maruziyetine bağlı toksik etkiler araştırılacak ise, deneyin yapıldığı zaman periyodu içinde de aynı özellikte maddelerin ve koşulların uygulanması gerekir. Beklenen toksik etkinin görülmesine yönelik testlerde, bu etkiyi oluşturduğu bilinen bir kimyasal maddenin, pozitif kontrol grubuna uygulanması ve deneyin sağlıklı işlediğinin test edilmesi gerekmektedir. Tüm ilaçlar, tarımsal ve zirai amaçlı maddeler, temizlik maddeleri, bazı kozmetikler vs. kullanıma sunulmadan önce toksisite testlerinden geçirilirler (Saygı, 2003).

Toksisite testleri, test süresinin uzunluğuna göre sınıflandırılabilirler. Bunlar; akut toksisite testleri, subakut toksisite testleri, subkronik toksisite testleri, kronik toksisite testleri ve özel toksisite testleridir. En yaygın kullanılan akut toksisite testi letalite testidir. Bu testin amacı, bir kimyasal maddeye maruziyetin sonucu

ortaya çıkabilecek toksik semptomları, beyin, böbrek, karaciğer gibi belli başlı organların etkileniş derecesi veya öldürücü doz (letalite) değerini saptamaktır. Letal doz değeri, o maddenin ne kadar güvenli kullanılabileceğinin de bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Saygı, 2003).

Testler genellikle fare veya sıçan gibi kolay bulunan ve maliyeti düşük deney hayvanları üzerinde yapılmaktadır. Bu hayvanlardan alınacak sonuçlara göre, test kobay veya tavşan üzerinde de tekrarlanabilmektedir. Testte kullanılacak deney hayvanlarının oldukça sağlıklı olmaları, test işlemlerinden önce laboratuvar ortamında fare ve sıçanların 1, köpeklerin ise 3-4 hafta gözetim altında tutulması gerekmektedir (Saygı, 2003).

Sıçan ve fareler daha çok toksisite testlerinin ilk aşamalarında insanlardaki yanıtı tahmin etmek için kullanılmaktadır. Benzer yanıtları farklı hayvan türleri üzerinde deneyerek görmek güvenilirliği arttırmaktadır (Weiderman, 1993). Hayvanlarda yapılan akut toksisite testleri hayvansız testlere göre daha zor valide edilmektedir. Zaman alıcı, uzmanlık gerektiren ve hayvanlara acı veren uygulamalardır. Ancak hücre kültürü ve dokularda yapılan testlerde geçirgenlik, enzimler, izlenen yol ve reseptörler elimine edilmiş olacağından gerçek toksik etkiyi görebilmek için *in vitro* metodlar daha yararlı olabilmektedir (Langley, 2005).

Bir defada verildiğinde test grubundaki hayvanların % 50' sini öldüren doza, o maddenin letal dozu (LD50) denir. Kimyasal maddelerin

kısa süreli maruziyetine bağı akut toksik etkilerini değerlendirmek açısından LD50 değeri önemlidir. LD değeri verilirken kullanılan deney hayvanı ve maruziyet yolunun da belirtilmesi gerekir. Bir maddenin LD50 değeri ne kadar düşükse, insanlar için toksisitesi o denli büyüktür. Deney gruplarında 1980' li yıllarda 80-100 hayvan kullanılırken, günümüzde *in vitro* tarama test sonuçları baz alınarak 6-10 sıçan veya tavşanın yeterli olacağı kabul edilmektedir. Deneysel letalite verileri, potansiyel kemoterapötik ajanların taranmasında veya pestisitlerin etkinlik derecesinin tayininde, ilaçların tedavi indeksleri ($TI = LD50 / ED50$), güvenlik derecesi [Margin Of Safety (MOS) = $LD1 / ED99$] ile kronisite faktörü ($CF = Akut\ LD50 / 90\ günlük\ LD50$) hesaplamalarında kullanılmaktadır (ED: efektif veya etkin doz). Kimyasal maddelerin hava veya sudaki öldürücü doz değerleri ise, letal konsantrasyon (LC50) ile ifade edilir ve belli zaman periyodunda (genellikle hava için 1-4 saat) maruz bırakıldığında deney hayvanlarının % 50' sini öldüren dozu ifade eder. Belli bir zaman periyodunda, solunum yolu ile verildiğinde deney hayvanlarının yarısını öldüren madde miktarı ise LCt50 ile ifade edilmektedir (Saygı, 2003).

3 MATERİYAL ve METOT

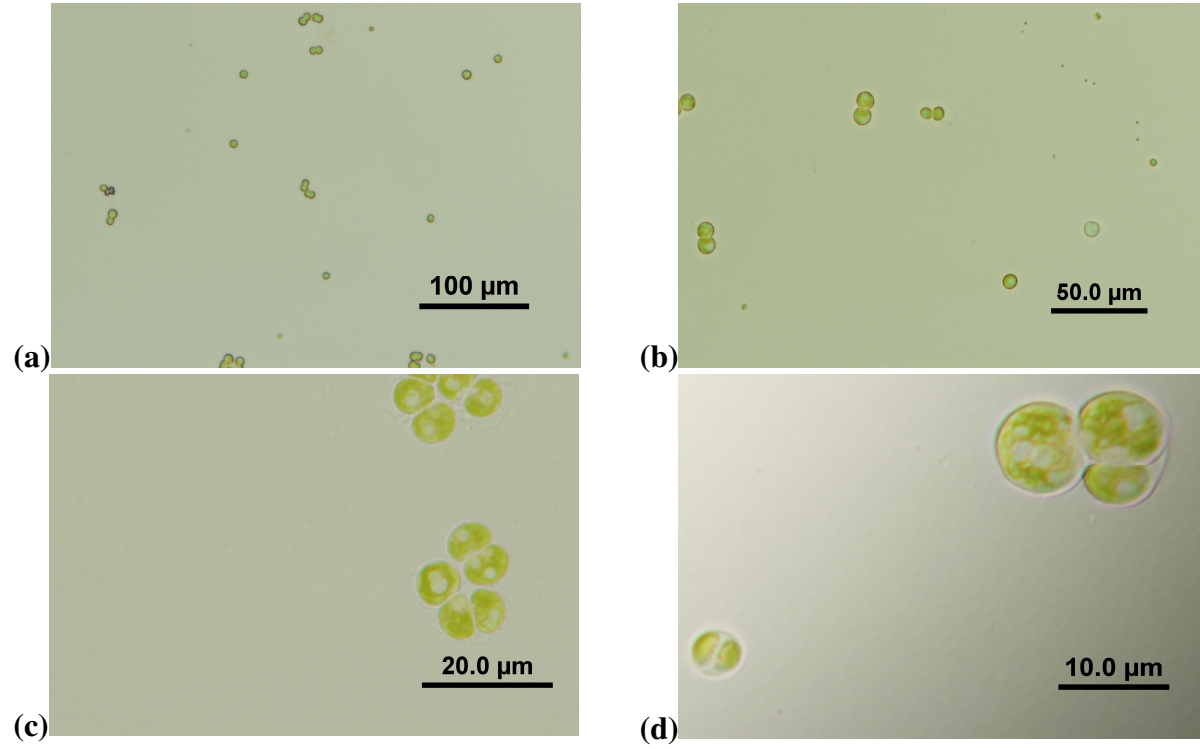
3.1 Mikroalg ve siyanobakteri kültürleri

3.1.1 Kültürü yapılan organizmalar

Yeşil mikroalg *Chlorella* sp. (Şekil 3.1) ve filamentöz siyanobakteri *Oscillatoria amphibia* (Şekil 3.2) örnekleri Ege Üniversitesi-Mikroalg Kültür Koleksiyonu'ndan (Ege-MACC) sağlanmıştır (Çizelge 3.1).

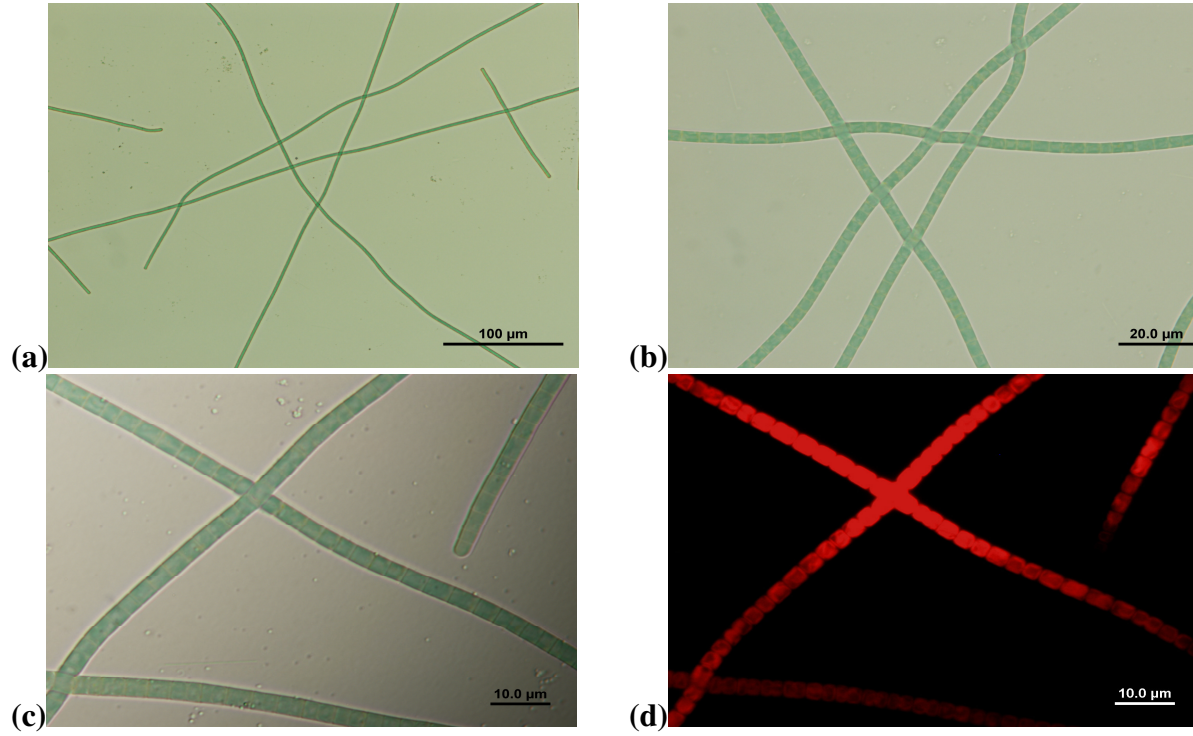
Çizelge 3.1 Kültürü yapılan organizmaların genel özellikleri

TÜR	CC1- <i>Chlorella</i> sp.		CC14- <i>Oscillatoria amphibia</i>	
Kaynak	Salda Gölü, Burdur		Acı Göl, Denizli	
Büyüme ortamı	Rudic's Medium, (Çizelge 3.2)		Modifiye Erdschreiber Medium, (Çizelge 3.3)	
En/Boy (çap)	4-5µ		5µ	
TAKSONOMİ	Divisio	Chlorophyta	Domain	Bacteria
	Clasis	Chlorophyceae	Phylum	Cyanobacteria
	Ordo	Chlorococcales	Section	III-Filamentous
	Familia	Chloroaceae	Genus	Oscillatoria



Şekil 3.1 *Chlorella* sp mikroskoptaki görünüşleri

a) 100 μm , b) 50.0 μm , c) 20.0 μm , d) 10.0 μm



Şekil 3.2 *O. amphibia*'nın mikroskoptaki görünümü

a) 100, b) 20.0, c) 10.0 , d) 10.0 Floresan mikroskop-FITC filtresi

3.1.2 Kùltür ortamları ve kimyasallar

Çizelge 3.2 Rudic Ortamı (RD) (Rudic and Dudnicenco, 2000).

Kimyasal Adı	Ortam(mg/L)	Stok (g/L)
NaNO ₃	300	3
KH ₂ PO ₄	20	0,2
K ₂ HPO ₄	80	0,8
NaCl	20	0,2
CaCl ₂	47	0,47
MgSO ₄ CaCl ₂ .7H ₂ O	10	0,1
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1	0,001
MnSO ₄ .H ₂ O	1,5	0,015
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08	0,0008
H ₃ BO ₃	0,3	0,003
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	0,3	0,003
FeCl ₃ .6H ₂ O	17	0,17
Co(NO ₃) ₂ H ₂ O	0,2	0,002
EDTA	7,5	0,075

1 L Rudic Ortamı hazırlamak için stoktan 100 mL alınıp distile su ile L' ye tamamlanmıştır.

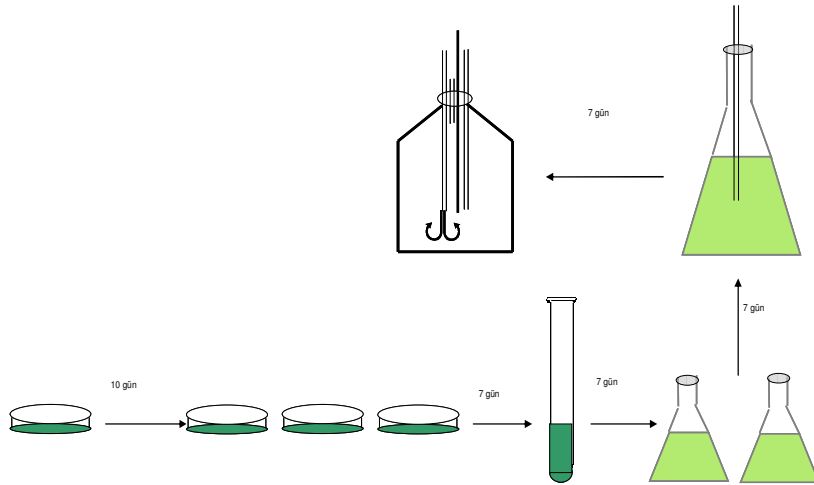
Çizelge 3.3 Modifiye Erdschreiber Ortamı (EM) (Provasoli, 1971).

Stok Solusyonları	g/10 mL		
NaNO ₃	0,2	1L deniz suyundaki total karışım (pH=7,5-7,7)	
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	0,03		
		NaNO ₃ solusyonu	10 mL
		Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O solusyonu	10 mL
		Na ₂ -EDTA	750 mg
		Metal solusyonu	12 mL
		Thiamine	1 mg
Metal Solusyonu	mg /L		
FeCl ₃ .6H ₂ O	97		
MnCl ₂ .4H ₂ O	41		
ZnCl ₂ .H ₂ O	5		
CoCl ₂ .6H ₂ O	5		
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	4		

Stok çözeltiler ve ortamlar hazırlanırken analitik kalitede kimyasal maddeler (Merck co.) ve saf su kullanılmıştır. Ortamlardaki kimyasalların konsantre stok çözeltileri, ayrı ayrı hazırlanarak ağzı kapalı olarak şişelerde, soğukta (+4 °C) ve karanlıkta saklanmıştır. Deniz suyu, süzülerek kaba partiküllerden arındırıldıktan sonra kullanılmıştır. Ortam çözeltileri hazırlandıktan sonra 121 °C’ de 20-25 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Ayrıca gerekli durumlarda sıvı büyüme ortamlarına % 1,5 agar (Merck co.) ilave edilerek katı ortamlar da hazırlanmıştır.

3.1.3 Stok kültür hazırlama

Mikroalg ve siyanobakteri örnekleri, sıvı büyüme ortamlarına % 1,5 agar ilave edilerek hazırlanmış petri kaplarındaki katı ortamlara çizgi ekim yöntemi ile inoküle edilmiş ve 10 gün boyunca koloni oluşturmak üzere kültür dolabında inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra steril sıvı ortam içeren otoklavlanmış 10 mL' lik test tüplerine aseptik koşullarda öze yardımıyla aktarılıp bir hafta boyunca vorteks ile karıştırılarak, çöken örneklerin homojen dağılması ve havalanması sağlanmıştır. Daha sonra 10 mL' lik tüplerden steril 250 mL' lik erlenlere aktararak kültür dolabında optimum koşullar altında gelişmeye bırakılmış ve bir haftanın sonunda hava beslemesi yapılan 500 mL' lik erlenlere, daha sonra da hacim artırılarak yarısı kültür şişesine, diğer yarısı ise kontrol olarak steril otoklavlanmış hava beslemeli şişelere aktarılmıştır (Şekil 3.3).

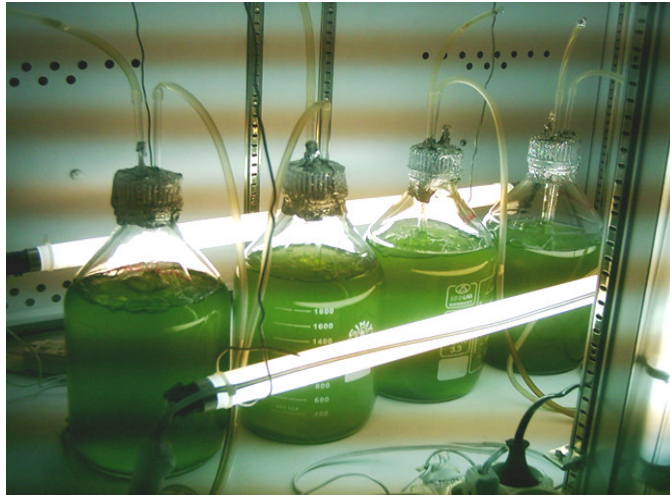


Şekil 3.3 Stok kültür hazırlama

(Demirel, 2006)

3.1.4 Kültür sisteminin hazırlanması

Mikroalg ve siyanobakteri üretiminde öncelikle mikroorganizmaların yaşamı, gelişmesi ve çoğalması için gereken besin maddelerini içeren kültür ortamı hazırlanmış ve türün isteğine uygun optimum fiziksel ve kimyasal koşullar sağlanmıştır (şekil 3.4).



şekil 3.4 Kültür sistemi

Logaritmik büyüme evresine giren hücreler (*Chlorella* sp. için $2,5 \times 10^5$ sayıda, *Oscillatoria amphibia* için $1,0 \times 10^5$) aseptik koşullarda 1L'lik şişelere aktarılarak aşılama (ekim) yapılmıştır. Kültür çalışmalarında otoklavlanabilen 2-5 L' lik cam kaplar (Duran-Shot) kullanılmıştır. Optimum sıcaklık 18-22 °C, ideal pH sınırları 7 ile 9 arasındadır. Kültürlere yaklaşık $55 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddeti uygulanmış, her

bir şişeye *Chlorella* sp. için 2L/dk, *O. amphibia* için 0,5 L/dk hava verilmiştir.

Kültürlerde büyümenin takibi her gün spektrofotometrik olarak türbiditenin ölçülmesi, Neubauer ölçekli hemositometrede ($0,0025\text{m}^2$) hücrelerin sayılması, pH ölçümü, kuru ağırlık ve klorofil-a miktar tayini ile gerçekleştirilmiştir. Alınan sonuçlara göre grafik düzenlenerek büyüme eğrileri çıkarılmış, durgunluk fazı belirlenmiş ve bu fazın sonunda ortamdan $3500\times g$ 'de 5 dakika santrifüjlenerek ayrılmıştır. Yaş materyal dondurarak kurutma işlemiyle kurutulup ekstraksiyon işlemi yapıncaya kadar $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de saklanmıştır.

3.1.5 Büyümenin ölçülmesi

3.1.5.1 Türbidite ölçülmesi

Kültürlerin konsantrasyonlarının izlenmesinde çok yaygın kullanılan bir yöntemdir. Süspanse katıların yoğunluğu veya optik dansitesi belirli bir dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçümlenebilir. Hücre şekli, büyüklüğü, içeriği ve çözelti içerisindeki istatistiksel dağılımı sonucu etkileyebilir Hızlı ve zararsız bir yöntem olması yönünden avantajlıdır. (Becker, 1995).

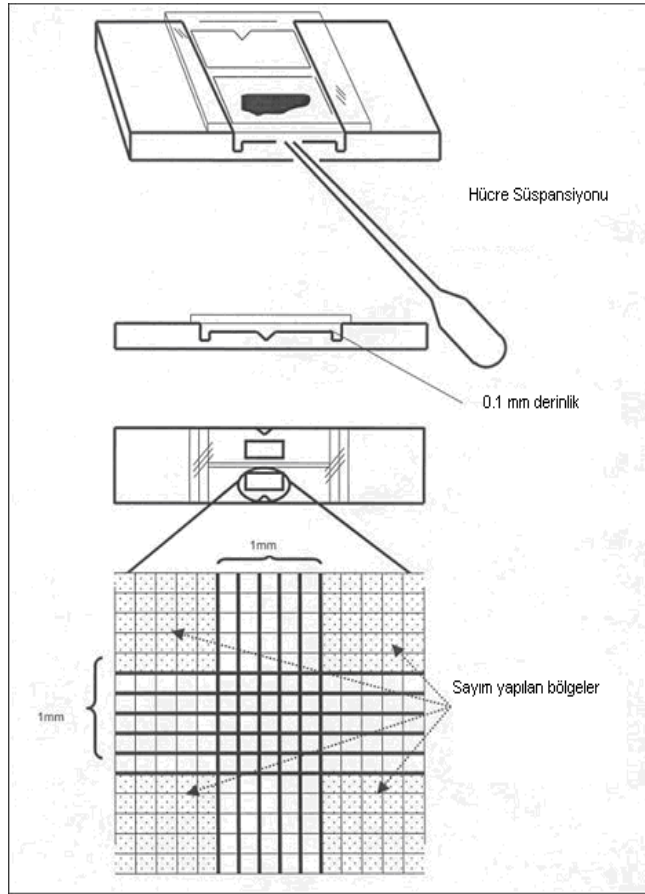
Örneklerin dalga boyu taraması ile belirlenen absorbans değerlerinde (560, 650, 685, 750 nm) ölçümler 2 mL kapasiteli 1 cm ışık yolu olan plastik, tek kullanımlık, küvetlerde spektrofotometre kullanılarak yapılmıştır. Ölçümler sırasında spektrofotometrede kültür ortamı kör olarak kullanılmıştır.

3.1.5.2 Hücre sayım Yöntemi

Hücre sayımı için çeşitli kan sayım kamaraları (Thoma, Neubauer) kullanılabilmektedir (Karaboz vd., 2002; Koray, 2002). Çalışmamızda Neubauer ölçekli sayım kamarasından yararlanılmıştır. Neubauer ölçekli sayım kamarasındaki 9 adet 1mm^2 lik kareler farklı şekillerde bölünmüştür (Şekil 3.5). Kamaranın total hacmi 9×10^{-4} mL' dir (Cirik ve Gökpınar 1999; Demirel, 2006).

Büyüyen kültürlerde hücre sayısını belirlemek için öncelikle, kamaranın üzerinde lamelin oturacağı yer hafifçe ıslatılıp lamel kamara üzerinde hareket etmeyecek şekilde kapatıldıktan sonra homojenize örnek pastör pipeti ile kamaraya dikkatlice doldurulmuş ve hücrelerin tüm kamara alanına homojen olarak dağılması sağlanmıştır. Hücrelerin çökmesi için biraz beklendikten sonra mikroskopta dört kez tekrar edilen sayımların ortalaması alınarak mL' deki hücre sayısı hesaplanmıştır (Cirik ve Gökpınar, 1999).

$$1 \text{ mL' deki hücre sayısı} = 1\text{mm'de sayılan hücre} \times (\text{dilüsyon}) \times 10000$$



Şekil 3.5 Neubauer sayım kamarası
(Demirel' den, 2006)

3.1.5.3 pH ölçümü

Mikroorganizmaların metabolik aktivitelerinin sonucunda ortamdaki asit-baz dengesinin değişimine göre büyüme eğrilerinin hazırlanması için kültürlerde her gün pH ölçümleri yapılmıştır (Becker, 1995). Alınan sonuçlar durağan fazın belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.1.5.4 Kuru ağırlık tayini

105 °C lik sıcaklıktaki etüvde 2 saat kurutulan Whatman GF/C filtre kağıtları (Whatman glass microfibre filters, 1,2 µm, 47 mm), yaklaşık 20 dakika, içi silika jel dolu desikatörde sabit tartıma gelene kadar bekletildikten sonra analitik terazide tartılarak darası alınmıştır. Membran filtre ünitesinde 5 mL örnek filtrelerden süzöldükten sonra filtrat asidik su (pH 4) ile yıkanarak ortamdan gelebilecek tuzlar uzaklaştırılmıştır. Filtre kağıtları üzerindeki hücrelerle beraber 105 °C lik sıcaklıktaki etüvde 2 saat kurutulup 20 dakika desikatörde bekletildikten sonra analitik terazide tartılmıştır ve sonuçlar mg/mL cinsinden hesaplanmıştır (Becker, 1995; Boussiba, 2004).

$$\text{Kuru ağırlık (mg/L)} = \frac{[\text{Filtre} + \text{Hücre (mg)}] - [\text{Filtre (mg)}]}{\text{Örnek Hacmi (mL)}} \times 1000$$

3.1.5.5 Klorofil-a tayini

Klorofil-a' nın ekstraksiyonu için 5 mL kültür GF/C filtreden süzöldükten sonra filtrat üzerine 5 mL metanol eklenmiştir. 70 °C' lik su banyosunda 2 dakika bekletilip ardından ekstrakt 8970 g de 5 dk santrifüjlenerek hücre artıkları uzaklaştırılmıştır. Daha sonra süpernatantın 665 ve 750 nm' lerdeki absorbanları saf metanole karşı spektrofotometre ile ölçölüp, değerler aşağıdaki formüle yerleştirilerek klorofil-a miktarları mg/L cinsinden hesaplanmıştır (Becker, 1995).

$$\text{Klorofil-a (mg/L)} = 13,9 \times (A_{665} - A_{750})$$

3.2 Ekstrelerin hazırlanması

Biyokütle ortamdan ayrıldıktan sonra liyofilizatörde (Şekil 3.6) kurutulmuş (Şekil 3.7) ve ekstraksiyon işlemlerine kadar alüminyum folyo içerisinde hava ve nemden korunmuş halde -20 °C' de saklanmıştır.



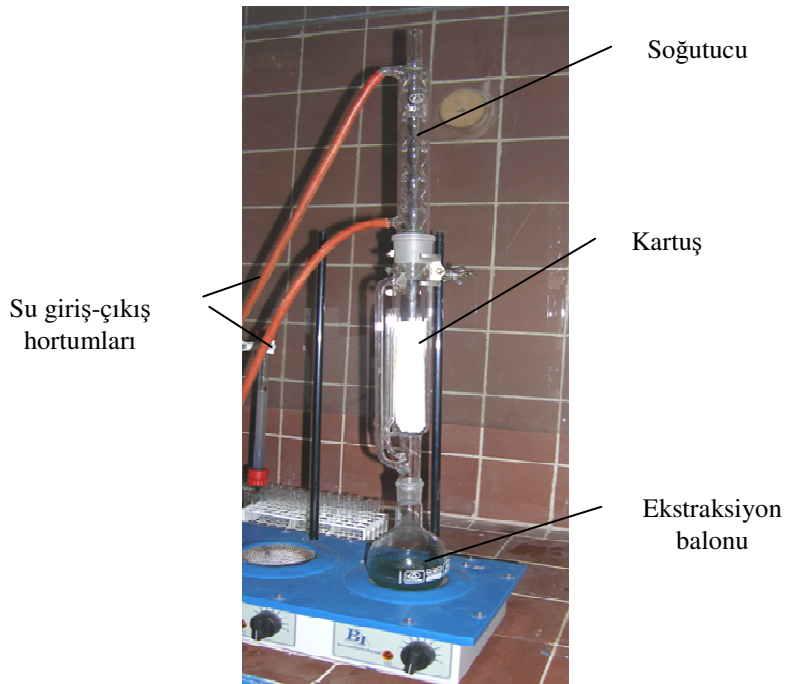
Şekil 3.6 Liyofilizatör



Şekil 3.7 Liyofilizatörde kurutulmuş örnekler

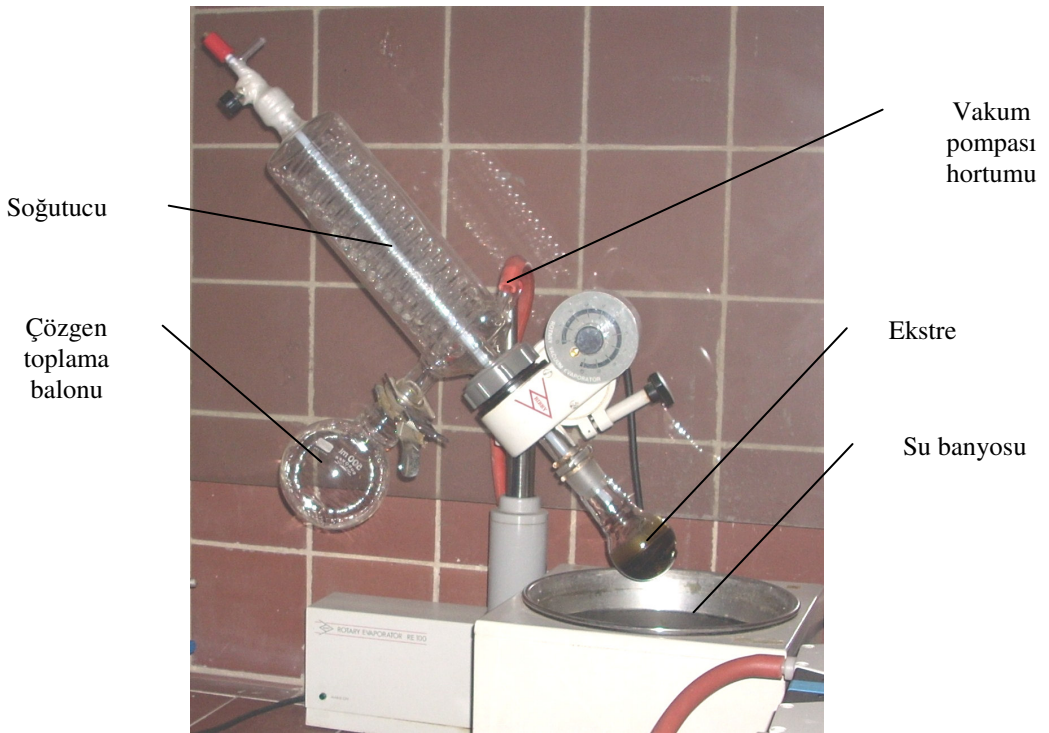
3.2.1 Organik çözüenlerle ekstraksiyon

Örneklerdeki kimyasallar, sokslet cihazında (Şekil 3.8), analitik saflıktaki aseton, diklormetan, etanol, hekzan, kloroform ve metanol (Merck co.) organik çözüenleri ile ekstrakte edilmiştir (Khan et al., 1988; Vlachos et al., 1996). Sokslet cihazına bağlanmış balon ısıtılırken içerisindeki çözüenin buharlaşarak dışarı çıkışı bir soğutucu yardımıyla önlenmiş ve burada yoğunlaştırılarak cihaza dönmesi sağlanmıştır. Sokslet cihazında kartuş içerisinde tutulan örneklerle temas eden çözüen cihaz tamamen dolduğunda üzerindeki borular aracılığıyla sürüklediği kimyasallarla beraber balona tekrar dönmektedir. Bu döngü ekstraksiyon işlemi bitinceye kadar devam ettirilmektedir.



Şekil 3.8 Sokslet ekstraktörü

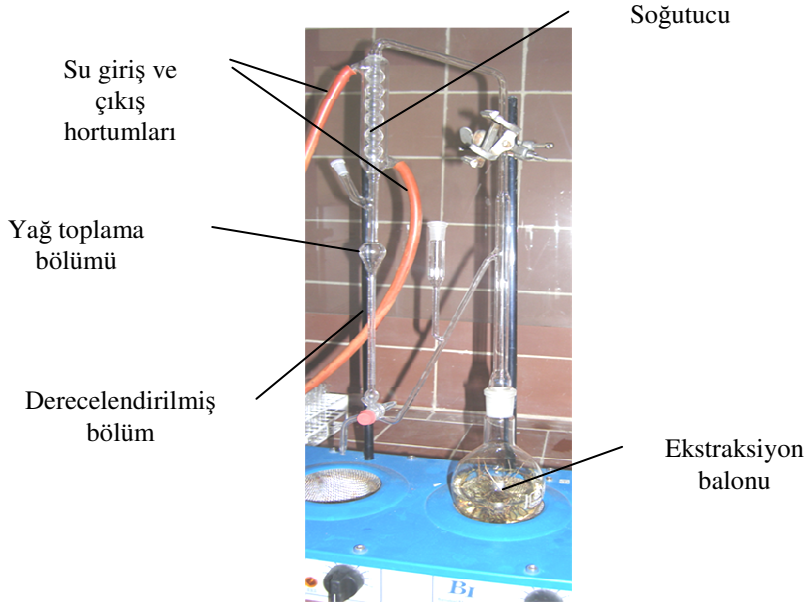
İşlem sonunda ekstrelerdeki çözen ~ 50-60 °C su banyosunda ve alçak basınç altında rotary evaporatör cihazı (Şekil 3.9) ile uzaklaştırılmıştır. Balonun içindeki çözen su banyosu ve vakum etkisiyle buharlaşarak soğutucu bölüme geçer, burada yoğunlaştırılarak çözen toplama balonuna dolar. Daha önce darası alınmış balon içerisindeki ekstrelerin miktarı çözen tamamen uzaklaştırıldıktan sonra balonun tekrar tartılması ve aradaki farkın hesaplanması ile belirlenmiştir. Her bir çözen için ekstrelerin % verimi (100 g örnekten elde edilen g ekstre miktarı) hesaplanmıştır.



Şekil 3.9 Rotary evaporatör

3.2.2 Hidrodistilasyon ile uçucu yağ ekstraksiyonu

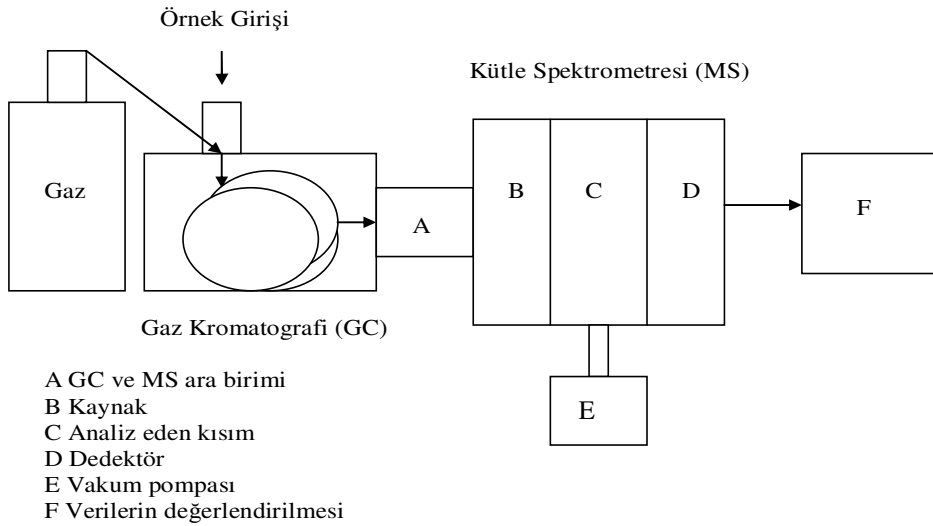
Mikroalg ve siyanobakteriden elde edilen kuru biyokütle ısıtılan bir balon içerisinde distile su ile kaynatılmış ve buharla beraber sürüklenen uçucu yağı toplamak için üzerine klevenger cihazı bağlanmıştır. Cihazın soğutucu bölümüne hortumlarla su giriş-çıkışı sağlanarak uçucu yağın su buharıyla beraber yoğunlaşıp yağ toplandığı bölümde birikmesi sağlanmıştır (Şekil 3.10). Buradaki yağ ekstraksiyon işlemi bittikten sonra cihazın derecelendirilmiş olan bölümünde hacmi ölçülerek % verim (100g örnekten elde edilen μL hacim uçucu yağ miktarı) hesaplanmıştır (European Pharmacopea, 1975; Ozdemir et al., 2004).



Şekil 3.10 Klevenger cihazında uçucu yağ ekstraksiyonu

3.3 Uçucu yağlarda Gaz kromatografi ve kütle spektroskopisi (GK-KS) analizi

Gaz Kromatografinin ayırma özelliği ile Kütle Spektroskopisinin identifikasyon yeteneğinin kombinasyonu ile oluşan bu metot kalitatif ve kantitatif verilerin eldesine imkan sağlamaktadır. Farklı bileşiklerin karışımını içeren örneklerin doğru bir şekilde ayırarak tanılanmasını sağlamaktadır (Şekil 3.11).



Şekil 3.11 GK-KS cihazı şematik gösterimi

Elde edilen uçucu yağın GK analizinde FID (Flame Ionization Dedector) dedektör donanımlı HP 6890 gaz kromatografi cihazı, GK/KS analizlerinde ise, aynı cihazla kombine HP 5973 kütle selektif dedektörü kullanılmıştır. Analizlerde HP-1 kapiller kolon (25m x 200 µm i.d., film kalınlığı 0,33 µm), taşıyıcı gaz olarak 20mL/dk akış hızında helyum kullanılmış, sıcaklık 50 °C' den 300 °C' ye dakikada 10 °C artacak

şekilde programlanmıştır. Otoenjektör (Agilent 6890) ısısı 150 °C, dedektör ısısı ise 250 °C'dir. Uçucu yağ örneği üçer kez analiz edilmiş, bileşiklerin relatif miktarlarının ortalamaları alınmıştır. Uçucu yağ bileşiklerinin tanımlanabilmesi için; GK/KS analizi yapılan uçucu yağların bileşenlerinin kütle spektrumları, Wiley 275 L kütüphanesindeki ve standart uçucu yağ bileşikleri ile oluşturulmuş ARGEFAR uçucu yağ kütüphanesindeki verilerle bilgisayar taraması yapılarak karşılaştırılmıştır. Alifatik hidrokarbon karışımının ve uçucu yağların GK analizleri yapılarak tutulma indeksleri (RI-Relative index) hesaplanmıştır (Adams, 1995).

3.4 Çözgen ekstrelerinin aktivite testleri

3.4.1 Antioksidan aktivite testleri

Kullanılan kimyasallar

DPPH (2,2-difenil-2-pikrilhidrazil hidrat), 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit (ABTS) (Sigma-Aldrich) , potasyum persülfat (Merck co.), β -karoten (Merck co.), Tween 20 (Merck co.), linoleik asit (Sigma-Aldrich), Folin reaktifi (Merck co.), sodyum karbonat (Merck co.), gallik asit (Merck co.), E vitamini (α -tokoferol) (Merck co.), Bütil hidroksi tolueen (BHT) (Merck co.), etanol (Merck co.), metanol (Merck co.).

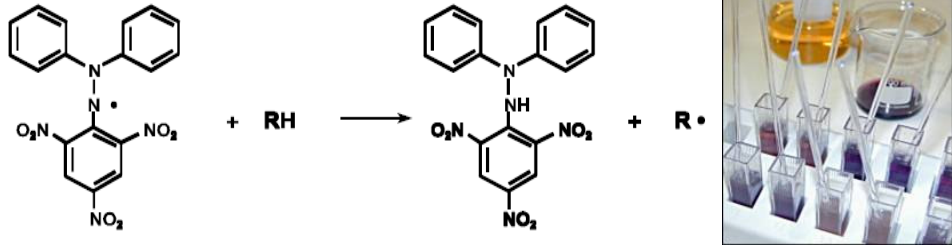
İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler SPSS for Windows, 11.0 istatistik paket programına yüklenmiştir. Tekrarlı ölçümlerde tek yönlü varyans analizi

(ANOVA) kullanılmıştır, p değeri <0,05 olan veriler anlamlı kabul edildi. Ortalama değerler “aritmetik ortalama $\pm$ standart hata (standart error)” olarak gösterilmiştir.

3.4.1.1 DPPH deneyi

Çözgen ekstrlerinde serbest radikal yakalama kapasitesi DPPH radikal çözeltisi kullanılarak spektrofotometrik olarak saptanmıştır. DPPH radikali antioksidan bileşiği indirgemektedir (Şekil 3.12). Bu reaksiyon sonucunda mor renkli DPPH radikal çözeltisi sarı renge dönüşmektedir ve absorbans değerlerinde meydana gelen değişim test edilen ekstrenin % antioksidan aktivitesinin hesaplanmasında kullanılmaktadır.



DPPH radikali Antioksidan bileşik

Şekil 3.12 DPPH radikali ve antioksidan bileşik arasındaki reaksiyon

Çözgen ekstrlerinin, metanoldeki çözeltilerinden (0,125-1,000 mg/mL) 500µL alınarak deney tüplerine dağıtılmıştır. Üzerilerine 2 mL DPPH radikalinin metanoldeki % 0,004 (w/v)’ lük çözeltisi eklenip 30 dk karanlıkta oda sıcaklığında bekletildikten sonra koyu mordan açık sarıya oluşan renk değişimi spektrofotometrede 517 nm dalga boyunda metanole karşı ölçülmüştür. Örneklerdeki absorbans değişimi ($A_{\text{örnek}}$) 500

μL metanol ve 2 mL DPPH çözeltisinin karışımıyla oluşan standarda (A_{standart}) göre % antioksidan aktivite aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır. Denemeler üç tekrarlı yapılmış ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Han et al., 2004; Tepe et al., 2004). Pozitif kontrol olarak E vitamini ve BHT'nin 0,1 mg/mL'lik (w/v) metanol çözeltileri kullanılmıştır.

$$\text{Aktivite (\%)} = [(A_{\text{standart}} - A_{\text{örnek}} / A_{\text{kontrol}}) \times 100]$$

3.4.1.2 ABTS katyon renk giderimi yöntemi

ABTS radikali çözeltisi antioksidan bileşiklerle etkileştiğinde yeşil renkten sarı renge dönüşmektedir. Örneklerin % antioksidan aktivitesi, renk açılımına bağlı olarak değişen absorbans değerleri 734 nm' de spektrofotometrik olarak ölçülmesi ve aşağıdaki formül ile hesaplanmasıyla belirlenmektedir.

Öncelikle, 7 mM ABTS radikali çözeltisi hazırlamak için 0,0192 g ABTS 5mL etanol içerisinde çözülmüştür. Radikal oluşumu için ABTS çözeltisine 88 μL kadar eklenen 140 mM potasyum persülfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) çözeltisini hazırlamak için 1mL distile su içerisinde 0,0379 g $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ çözülmüştür. Radikal oluşumunun tamamlanması için oda sıcaklığında ve karanlıkta 16 saat bekletildikten sonra radikal çözeltisi antioksidan aktivitenin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Yeşil renkli ABTS radikal çözeltisinin absorbans değeri 734 nm' de % 70' lik etanol ile $0,700 \pm 0,2$ olarak ayarlanmıştır. Metanol içerisinde çözülmüş (0,125-1,000 mg/mL konsantrasyonda) ekstrelerin 0,1 mL' si ile 0,9 mL ABTS radikal çözeltisi karıştırılıp 6 dk karanlıkta ve oda

sıcaklığında bekletildikten sonra yeşil renkten sarıya doğru olan açılma oranı 734 nm’ de ölçülerek izlenmiştir. Ölçümler sırasında, metanol (örnek yerine) ve ABTS radikal çözeltisinin karışımı kör olarak kullanılmış, antioksidan aktivite sonuçları 0,1 mL metanol ve 0,9 mL ABTS radikal çözeltisinin karışımıyla oluşan standarda (A_{standart}) göre örneklerdeki absorbans değişiminin ($A_{\text{örnek}}$) % oranının aşağıdaki formül ile hesaplanmasıyla belirlenmiştir. (Sun et al., 2007). Pozitif kontrol olarak 0,1 mg/mL’lik (w/v) E vitamini ve BHT metanol çözeltileri kullanılmıştır. Denemeler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir

$$\text{Aktivite (\%)} = [(A_{\text{standart}} - A_{\text{örnek}} / A_{\text{standart}}) \times 100]$$

3.4.1.3 β -karoten deneyi

β -karoten emülsiyonunun zaman ve sıcaklığa bağlı olarak sarı renginin açılmasını antioksidan madde ilavesiyle önlemesi beklenmektedir. Örneklerdeki antioksidan madde miktarının oranı bu renk değişiminin oranını etkilemektedir. % antioksidan aktivite, değişimi spektrofotometrede izlenen absorbans değerlerinin aşağıdaki formül ile hesaplanmasıyla bulunmaktadır.

β -karoten (Şekil 3.13) (2mg) 10 mL kloroform içerisinde çözüldükten sonra 1 mL’ si dibi yuvarlak bir balon içerisine aktarılmış, üzerine 0,02 mL linoleik asit ve 0,2 mL Tween 20 ilave edilmiştir. Karışımdaki kloroform evaporatörde 45 °C’ de uzaklaştırıldıktan sonra 50 mL distile su yavaşça ilave edilerek bir emülsiyon oluşturulmuştur. β -

karoten/linoleik asit emülsiyonu (2,5 mL) metanol içerisinde 0,125-1,000 mg/mL konsantrasyonda çözülmüş ekstreler (0,1 mL) üzerine eklenmiş ve spektrofotometre ile hemen 470 nm dalga boyunda ölçümlere başlanmıştır. 0-120 dk. boyunca, 50 °C' lik su banyosu içerisinde bekletilerek 15 dakika aralıklarla yapılan ölçümlerle absorbans değerindeki azalma izlenmiştir. Ölçülen absorbans değerleri kullanılarak, % absorbans değişimi aşağıdaki formül yardımı ile hesaplanmıştır. Ayrıca, standart olarak metanol ve 2,5 mL β -karoten/linoleik asit çözeltisi, kör olarak ise β -karotensiz olarak hazırlanan ikinci bir emülsiyon kullanılmıştır (İsmail and Hong, 2002; Kulisic et al., 2004). Denemeler üç tekrarlı olarak yapılmıştır ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

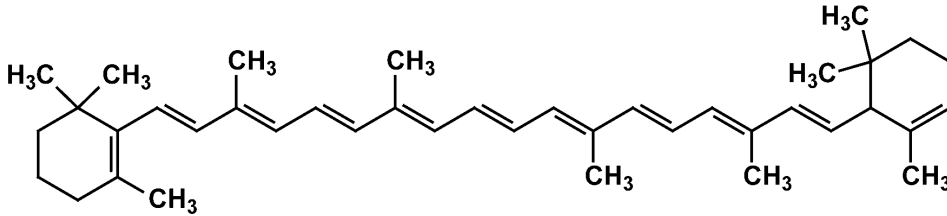
$$\text{Aktivite (\%)} = 100 \times [1 - (A_0 - A_t) / (A_0^0 - A_t^0)]$$

A_0 : 0. dak.' da örneklerin absorbans değerleri

A_t : 120. dak.' da örneklerin absorbans değerleri

A_0^0 : 0. dak.' da β -karoten/linoleik asit-metanol karışımının absorbans değeri

A_t^0 : 120. dak.' da β -karoten/linoleik asit-metanol karışımının absorbans değeri



Şekil 3.13 β -karoten

3.4.1.4 Total Fenol Miktar Tayini

Metanol içerisinde (0,125-1,000 mg/mL) çözölmüş ekstrelerin 0,1 mL' sine 0,75 mL Folin-Ciocalteau reaktifi (1/10, v/v) eklenip 5 dak sonra 0,75 mL % 6' lık sodyum karbonat çözöltisi ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 90 dak bekledikten sonra 725 nm' de absorbands değışimi izlenmiştir (Velioglu et al., 1998). Gallik asit çözöltisi ile hazırlanan standart eğriye göre ($R^2=0,9953$) ekstrelerdeki fenol miktarı hesaplanmıştır. Gallik asit çözöltisi. 100mL distile suda 0,05 g gallik asidin çözölmesiyle hazırlanmıştır. Fenolik bileşiklerin miktarının belirlenmesinde standart eğri hazırlamak için kullanılmıştır. Denemeler üç tekrarlı olarak yapılmış ve istatistiksel olarak değeriendirilmiştir

3.4.2 Antimikrobiyal aktivite testleri

Standart mikroorganizmalar

Testler için Ege Üniversitesi Fen Faköltesi Mikrobiyoloji bölümü költür koleksiyonundan sağlanan standart bakteriler, *Bacillus cereus* ATCC 6633, *B. subtilis* ATCC 7064, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-p, *Salmonella typhimurium* CCM 5445, *Proteus vulgaris* ATCC 6897, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *E. aerogenes* ATCC 13048, *E. cloaceae* ATCC 13047, *Escherichia coli* ATCC 29998) kullanılmıştır. Ekstrelerin antimikrobiyal aktiviteleri ayrıca iki spesifik patojen (metisilin-oksasilin dirençli *S. aureus* ATCC 43300, hemorajik *E. coli* (O157:H7) RSSK 232) ve bir maya türü, *Candida albicans* ATCC 10239 üzerinde de test edilmiştir.

Besiyerleri

Besiyeri 1. Nutrient Agar (NA) (Merck co.)

Et ekstraktı	3,0 g
Peptone	5,0 g
Agar-agar	12,0 g
Distile su	1000 mL

Dehidre besiyeri distile suda çözüldükten sonra agarı eritmek için kaynatılmış ve test tüplerine dağıtılarak otoklavda 1,5 atmosfer basınç altında 121 °C' de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Sterilizasyondan sonra yatık halde dondurulmuştur. Bu besiyeri antimikrobiyal testlerde kullanılan test organismaların kısa süreli stoklanmasında ve 24 saatlik kültürlerin hazırlanmasında kullanılmıştır. 25 °C' da pH' sı $7,0 \pm 0,2$ dir.

Besiyeri 2. Nutrient Broth (NB) (Merck co.)

Et ekstraktı	3,0 g
Pepton (Et)	5,0 g
Distile su	1000 mL

Dehidre besiyeri distile suda çözüldükten sonra deney tüplerine dağıtılarak otoklavda 1,5 atmosfer basınç altında 121 °C' de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Bu besiyeri test organizmaların aktivasyonu için kullanılmıştır. 25 °C' da pH' sı $7,0 \pm 0,2$ dir.

Besiyeri 3. Mueller-Hinton Agar (MHA) (Merck co.)

Et ekstraktı	2,0 g
Kazein hidrolizat	17,5 g
Nişasta	1,5 g
Agar	13,0 g
Distile su	1000 mL

Dehidre besiyeri, distile su içinde çözüldükten sonra otoklavda 1,5 atmosfer basınç altında 121 °C' da 15 dakika süreyle sterilize edilip, steril petri kutularına dökülmüştür. Katılaştıktan sonra disk difüzyon testi için kullanılmıştır. 25 °C' da pH' sı $7,4\pm0,2$ ' dir.

Besiyeri 4. Mueller-Hinton Broth (MHB) (Merck co.)

Et ekstraktı	2,0 g
Kazein hidrolizat	17,5 g
Nişasta	1,5 g
Distile su	1000 mL

Dehidre besiyeri distile su içinde eritilmiş ve tüplere dağıtılıp, otoklavda 1,5 atmosfer basınç altında 121 °C' da 15 dakika sterilize edilmiştir. Mikrodilüsyon testi için kullanılıncaya kadar +4°C' da buz dolabında saklandı. 25 °C' da pH' sı $7,4\pm0,2$ ' dir.

Besiyeri 5. Malt Extract Agar (MEA) (Merck co.)

Malt ekstresi	30,0
Pepton (soya)	3,0
Agar-agar	15,0
Distile su	1000 mL

Dehidre besiyeri distile su içinde ısıtılarak eritilmiş ve tüplere dağıtılıp, otoklavda 1,5 atmosfer basınç altında 121 °C' da 10 dakika sterilize edildikten sonra amaca uygun olarak tüplere veya petrilere dağıtılıp katılaşması sağlanmıştır. 25 °C' da pH' sı $5,6 \pm 0,2$ ' dir. Maya, *C. albicans*'ın kısa süreli stoklanması ve 24 saatlik kültürlerin hazırlanmasında kullanılmıştır.

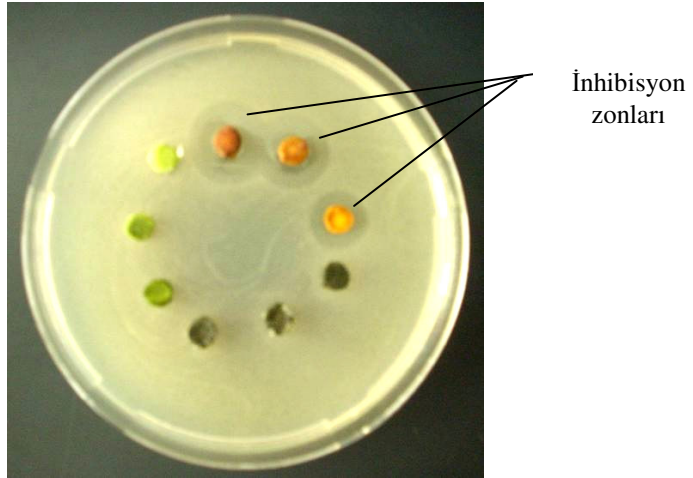
Besiyeri 6. Malt Extract Broth (MEB) (Merck co.)

Malt ekstresi	27,0 g/L
Distile su	1000 mL

Dehidre besiyeri distile su içinde ısıtılarak eritilmiş ve tüplere dağıtılıp, otoklavda 1.5 atmosfer basınç altında 115 °C' da 10 dakika sterilize edildikten sonra tüplere dağıtılıp katılaşması sağlanmıştır. 25 °C' da pH' sı $4,8 \pm 0,2$ ' dir. Maya *C. albicans*'ın 24 saatlik kültürlerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

3.4.2.1 Disk difüzyon metodu

Bakteri kökenleri Nutrient Broth besiyerinde 24 saat 37 °C’ de, maya ise Malt Extract Broth besiyerinde 48 saat 27 °C’ de inkübe edildikten sonra test organizmaların konsantrasyonu Mc Farland skalasına göre 0,5’ e ayarlanmıştır (bakteri; $1,0 \times 10^7$ - $1,0 \times 10^8$ mL⁻¹ ve maya; $1,0 \times 10^5$ - $1,0 \times 10^6$ mL⁻¹). 6 mm’ lik boş kağıt disklere (Schleicher and Schül, Nr 2668) çözgen ekstreleri 0,5-1,0-2,0 mg/disk konsantrasyonlarda 10-20-40 µL olacak şekilde emdirilip kurutulduktan sonra test organizmanın inoküle edildiği petrilerdeki Müeller Hinton Agar besiyerine yerleştirilmiştir. Bakteriler için 37 °C’, maya için 27 °C’ lik etüvde 18-24 saatlik inkübasyonun sonunda üremenin inhibisyonunun görüldüğü kısımların çapı mm olarak ölçülmüştür (Collins and Lyne, 1987; Bradshaw, 1992) (Şekil 3.14).

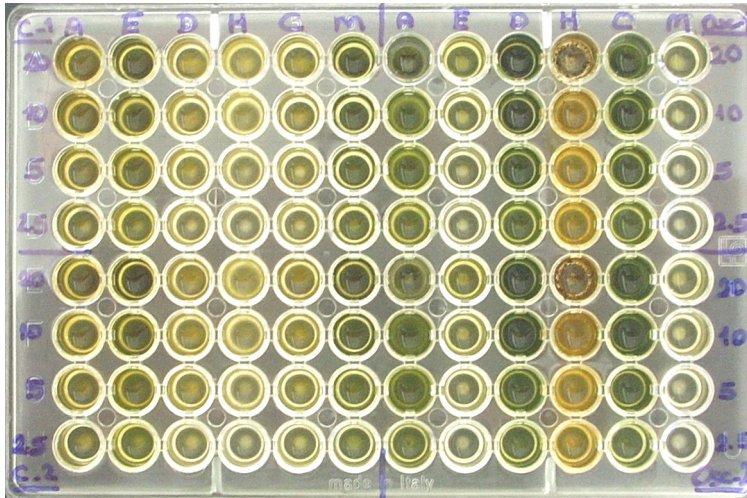


Şekil 3.14 Disk difüzyon testi

Tobramisin (10 µg/disk) ve Nistatin (30 µg/disk) antibiyotik diskleri pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Ayrıca ekstraksiyonda kullanılan çözenlerin antimikrobiyal denemelere etkilerinin olmadığı disklerle emdirilerek test edilmiştir. Denemeler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.4.2.2 Mikrodilüsyon metodu

Steril 96 mikrokuyucuklu plakaya 160 µL Mueller Hinton Broth besiyeri dağıtıldıktan sonra üzerilerine 250-2000 mg/mL konsantrasyon aralığında olacak şekilde, 20 µL çözen ekstresi eklenmiştir. Son olarak konsantrasyonu Mc Farland 0,5'e göre ayarlanmış olan test organizmaların süspansiyonları 1:100 oranında seyreltildikten sonra (bakteri; $1,0 \times 10^5$ - $1,0 \times 10^6$ mL⁻¹ ve maya; $1,0 \times 10^3$ - $1,0 \times 10^4$ mL⁻¹) bu karışıma ilave edilmiştir(Şekil 3.15).



Şekil 3.15 Mikrodilüsyon metodu

Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) değerleri bakteriler için 35 °C' de 18-24 saat ve maya için 27 °C' de 24-48 saat inkübasyon sonrası gözle görülür üremeyi engelleyen ekstre konsantrasyonuna bakılarak saptanmıştır. Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MBK) ise üremenin görülmediği kuyucuklardan petrilerdeki katı besiyerlerine spot ekim yapılarak 24 saat sonrasında da üreme olmayan kuyucukların belirlenmesiyle tespit edilmiştir (Zgoda and Porter, 2001). Denemeler üç kez tekrarlanmış, pozitif kontrol olarak Streptomisin, Ampisilin ve Nistatin antibiyotikleri 0,25-256 µg/mL konsantrasyon aralığında test edilmiştir

3.4.3 Formalin pençe testi ve akut toksisite

Çalışma Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Hayvan Etik Kurulu' nun onayı ile gerçekleştirilmiştir (25.07.2006 tarih ve 2006-32 sayılı onay). İstatistiksel analiz, Student-Newman-Keuls test (ANOVA) ile yapılmıştır ve p değeri istatistiksel önemi göstermek için 0,05 yada bu değerin altı olarak kabul edilmiştir.

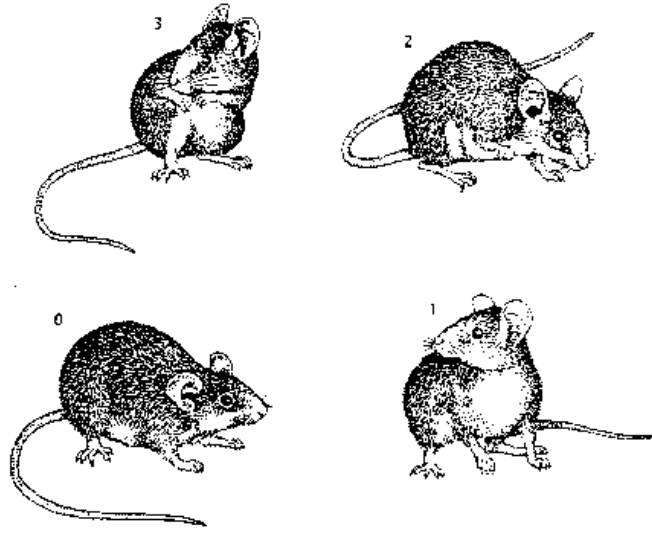
Çalışmada yaklaşık 20-30 g' lık Swiss albino erkek ve dişi fareler kullanılmıştır (Şekil 3.16) . Laboratuvar sıcaklığı 22 ± 1 °C ve nemi % 45-75 olarak düzenlenerek 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık periyodu uygulanmıştır. Deney hayvanlarının beslenmeleri için standart laboratuvar yemi (pellet) ve yeteri kadar su kullanılmıştır. Testler gün içi farklılıklar olabileceği göz önüne alınarak sabah 9:00-12:00 saatleri arasında, normal oda sıcaklığı (22 ± 1 °C) ve ışığında, sessiz bir odada gerçekleştirilmiştir.

Hayvanlar denemeden en az 2 saat önce sessiz laboratuvar ortamına adaptasyon için taşınıp kuyrukları işaretlenmiştir.



Şekil 3.16 Swiss albino fareler

Formalin testinde farelerin arka pençelerine deri altı formalin enjeksiyonu ile oluşan pençe yalama cevabının ekstreler ile olan inhibisyonu değerlendirilmiştir. Pençe yalama cevabının saniye cinsinden ölçülmesi 20 μ L formalinin (Smyras) fizyolojik tuzlu sudaki çözeltisinin (% 2,5 v/v) enjeksiyonunu takiben birinci faz (0-5 dakika) ve ikinci faz (15-30 dakika) olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Ekstreler, Tween 20'nin (Merck co.) % 0,02' lik (w/v) distile sudaki çözeltisi içerisinde çözüldükten sonra 25, 50 ve 100 mg kg⁻¹, i.p. (n = 10 her grup için) veya Tween 20 (kontrol grubu için) (n=10) formalin enjeksiyonundan 30 dakika önce farelere uygulanmıştır (Handy et al., 1995) (Şekil 3.17).



Şekil 3.17 Formalin testi

3-Ağrıyı kontrol etmek için pençesini yalar 2-Bir süre sonra pençesini havada tutar 1-Yavaş yavaş yürümeye başlar 0-Normal olarak yürür (Melzack, 1990).

Ekstrelerin akut toksisitesini belirlemek üzere öncelikle limit test yapılarak farelere 2000 mg/kg olan limit doz i.p. olarak uygulanmıştır. Bu dozun altında ölüm görüldüğünde ise LD₁₀, LD₅₀ ve LD₉₀ değerlerinin belirlenmesi için denemeye 10 fareden oluşan yeni gruplarla çeşitli doz aralıklarında devam edilmiştir. Kontrol gruba yalnızca Tween 20, diğer gruplara 500, 750 ve 1000 mg kg⁻¹ ekstre i.p. yoldan uygulanmıştır. Bu gruplar 48 saat boyunca gözlenmiş ve bu süre sonundaki ölümler kaydedilmiştir (Carvalho et al., 1999; Okpo et al., 2001). Tüm gruptaki farelerin yaşadığı ve tüm gruptaki farelerin öldüğü doz belirlendikten sonra ekstre uygulanmasını takiben 24 ve 48. saatler içerisinde ölen hayvanların ölüm yüzdesine göre LD₁₀, LD₅₀ ve LD₉₀ değerleri SPSS for

Windows, 11,0 istatistik programında probit testi ile belirlenmiştir. 2000 mg ve üzerindeki LD₅₀ dozları EPA ve Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre toksik değil olarak sınıflandırılmaktadır. Deneyde kullanılmış yaşayan farelere denemelerin sonunda ötenazi uygulanmıştır.

3.5 Denemelerde kullanılan araçlar ve ekipmanlar

Adı	Modeli
Analitik terazi	Precisa XB 220 A
Buz dolabı	Regal-No Frost
Derin dondurucu (-20 °C)	Bosch
Desikatör	Glasverk Werthem GL 32
Etüv	Sanyo Incubator
Floresan lambalar	Osram L(18W/10) day light, Philips (18W/54) cool white
GK/KS cihazı	HP 6890
Hemositometre-Neubauer	Marienfield (0,0025 m ²)
Isıtıcı	Barnstead Electrothermal
Kültür dolabı	Uğur (Tek/çift kapılı soğutuculu)
Lüks metre	Lutron LX-105
Liyofilizatör	Edwards
Manyetik karıştırıcı	Chiltern
Membran filtre ünitesi	Sartorius SM 16309
Mikroskop ve fotoğraf çekim aparatı	Leica DM4000B ve Olympus DP71
Mikrodalga fırın	Vestel
Otoklav	Hirayama

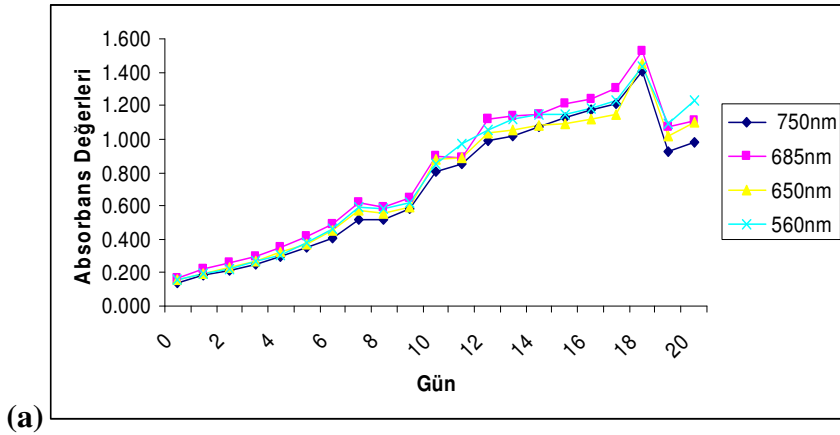
Adı	Modeli
pH-metre	Inolab
Pastör fırını	Philip Haris Ltd.
Rotometre	Özgül-air (0-15 L/dk)
Rotary Evaporatör	Bibby
Santrifüj	Hettich Universal 32 R
Sokslet cihazı	Isolab
Spektrofotometre	Varian Carry 300 UV/Vis
Su banyosu	Kötterman-Labortechnik
Vorteks	VWR International

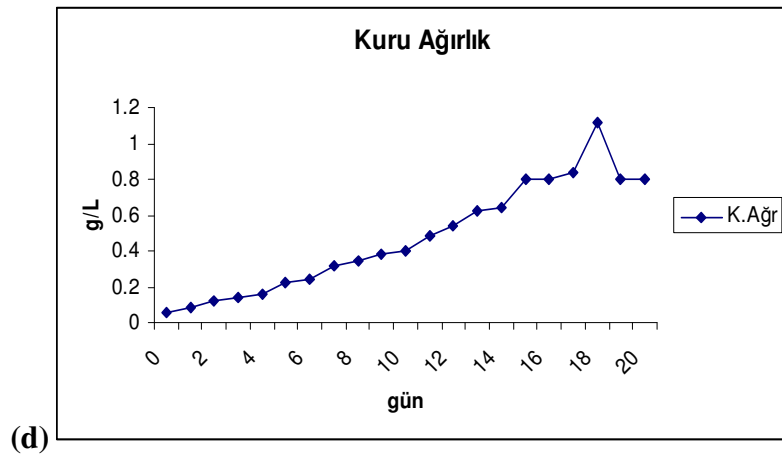
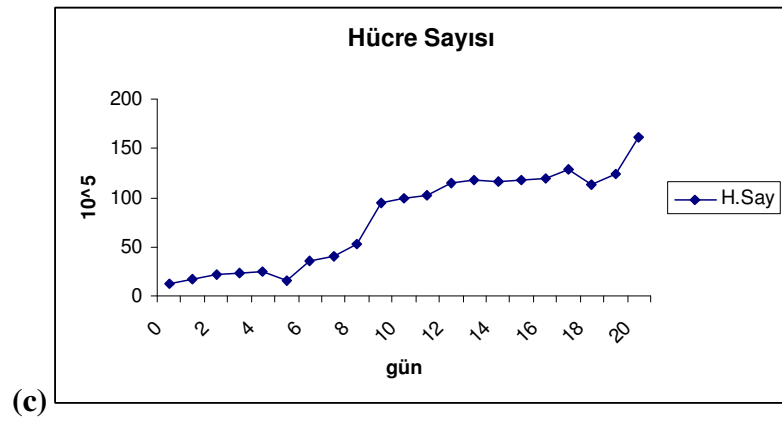
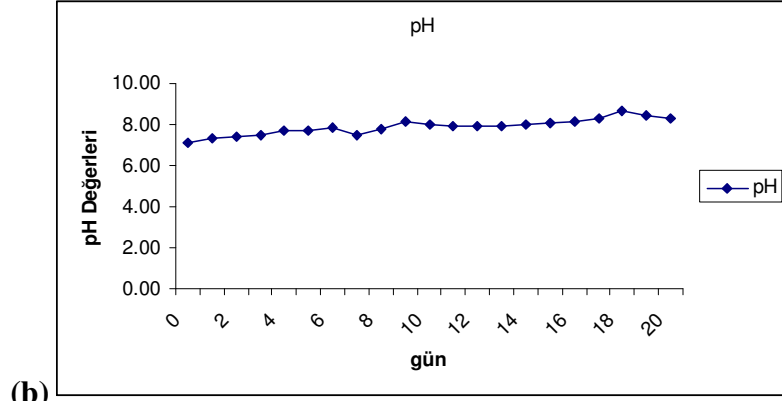
4 BULGULAR

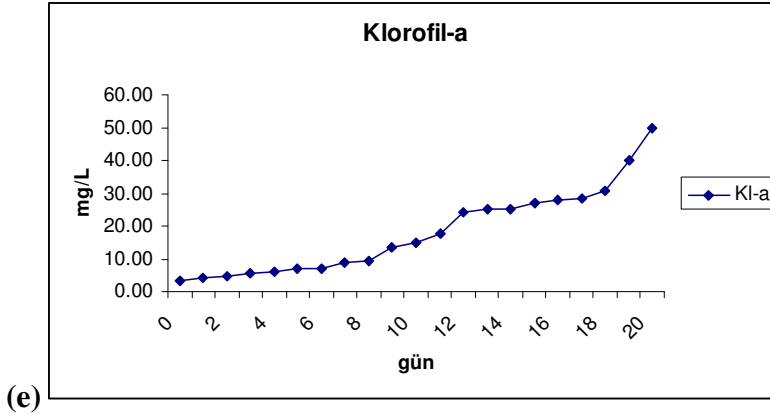
4.1 Büyüme eğrileri

4.1.1 *Chlorella* sp. büyüme eğrileri

Hazırlanan kültürlerin 20 gün boyunca izlenmesi sonucu oluşturulan aşağıdaki büyüme eğrilerine göre durağan fazın 12-13. günlerde başladığı ve 15-16. günlerde sona erdiği saptanmıştır. Ölçümlerden kaynaklanabilecek hataların değerlendirmelerimizi etkileyebileceği düşünülerek büyümenin izlenmesinde beş yöntemden de yararlanılmıştır.





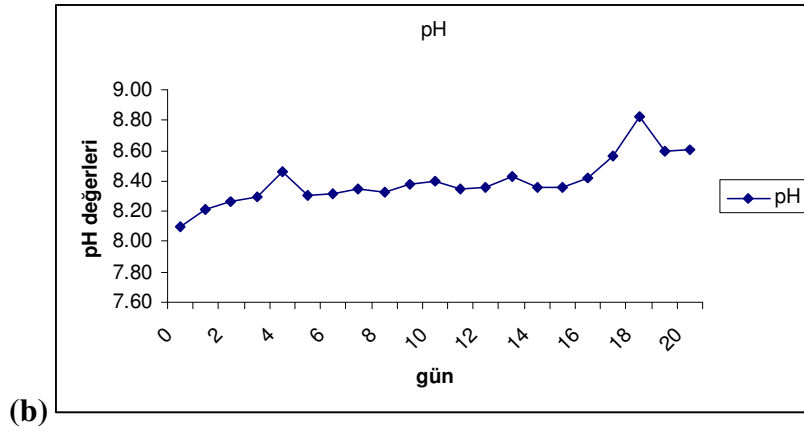
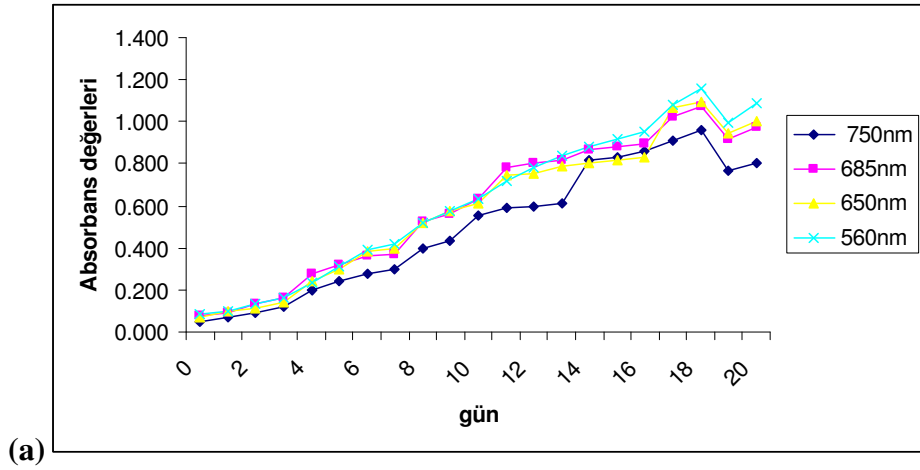


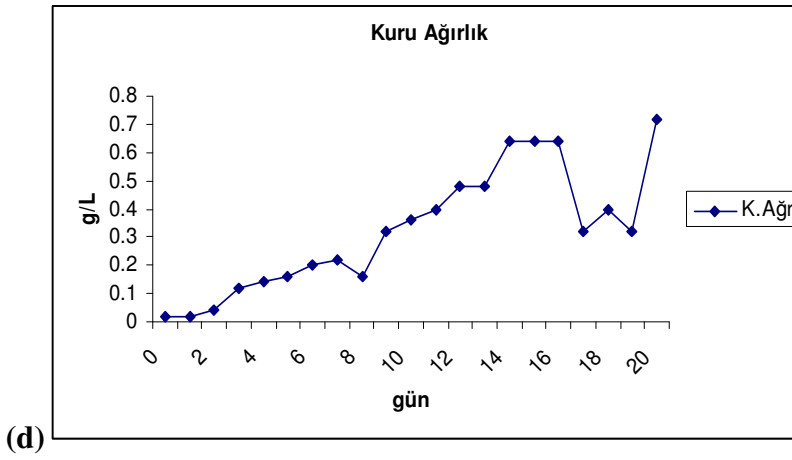
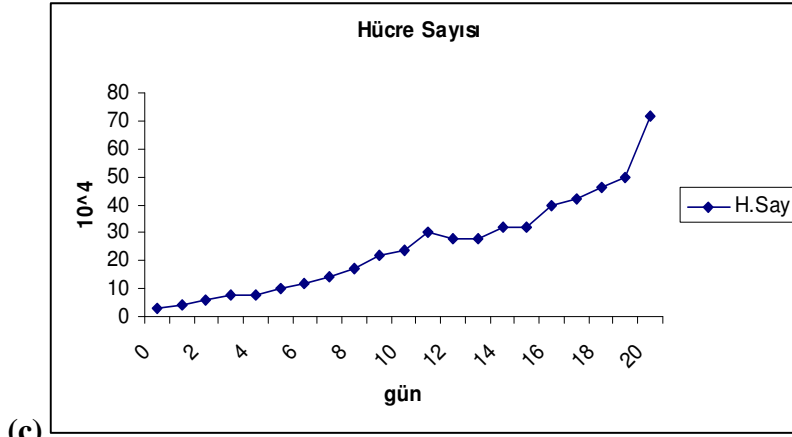
Şekil 4.1 *Chlorella* sp. büyüme eğrileri

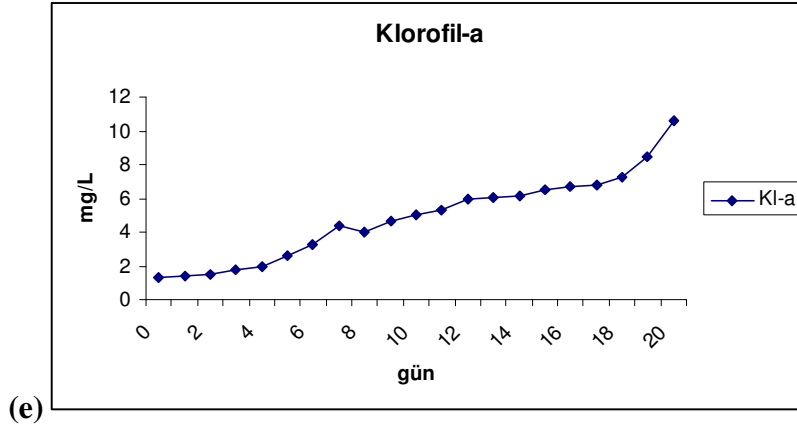
a) Türbidite, b) pH, c) Hücre sayısı, d) Kuru ağırlık, e) Klorofil-a

4.1.2 *O. amphibia* büyüme eğrileri

Hazırlanan kültürlerin 20 gün boyunca izlenmesi sonucu oluşturulan aşağıdaki büyüme eğrilerine göre durağan fazın 11-12. günlerde başladığı ve 15-16. günlerde sona erdiği saptanmıştır. Ölçümlerden kaynaklanabilecek hataların değerlendirmelerimizi etkileyebileceği düşünülerek büyümenin izlenmesinde beş yöntemden de yararlanılmıştır (Şekil 4.2).







Şekil 4.2 *O. amphibia* büyüme eğrileri

a) Türbidite, b) pH, c) Hücre sayısı, d) Kuru ağırlık, e) Klorofil-a

4.1.3 Kültürlerin spesifik büyüme hızı (μ) ve ikilenme zamanı (DT)

Elde edilecek biyokütlenin ve büyümenin belirlenmesinde en güvenilir sonucu alabilmek için pek çok izleme metodunun aynı anda kullanılması tavsiye edilmektedir (Becker, 1995). *Chlorella* sp. ve *O. amphibia* kültürlerinin her ikisinde de absorbans değişimine göre büyüme hızı $0,0070 \text{ saat}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Hücre sayısına göre ölü ve canlı hücreler beraber sayıldıklarından değerler kısmen daha yüksek olarak görülmektedir. İkilenme süresi de buna bağlı olarak daha kısa görülmektedir. Kuru ağırlık ölçümlerinde ortamdan gelen tuzlar yeterince uzaklaştırılmadığı için *Chlorella* sp.'nin büyüme hızı daha yüksek görülmektedir. *O. amphibia*'da ise yıkama sırasında hücre parçalanması veya porların açılması nedeniyle fikosiyanin vb. gibi proteinlerin dışarı çıkarak kaybedilmesi nedeniyle bir kütle kaybı meydana gelmektedir. Buna bağlı olarak da μ küçük, DT yüksek görülmektedir. *Chlorella*'da

klorofil-a ile beraber b ve c de bulunmaktadır. Dolayısıyla sadece klorofil-a ölçümü büyümenin değerlendirilmesinde yeterli olmayabilir. Ancak diğer ölçüm değerlerine yakın μ ve DT değerleri vermiştir. *O. amphibia*' da sadece klorofil-a bulunmaktadır. Ancak bunun yanı sıra diğer fotosentetik pigmentleri de içermektedir. Aynı şekilde sadece klorofil-a ölçümü büyümenin değerlendirilmesinde yeterli olmayabilir, tüm değerler beraber değerlendirmeye alınmalıdır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Büyüme eğrilerine göre spesifik büyüme hızı (μ) ve ikilenme zamanı (doubling time-DT).

Büyüme eğrileri	<i>Chlorella sp.</i>		<i>O. amphibia</i>	
	μ (saat ⁻¹)	DT (saat)	μ (saat ⁻¹)	DT (saat)
Absorbans değerleri	0,0070	99	0,0070	99
Hücre sayısı	0,0078	89	0,0071	97
Kuru ağırlık	0,0080	86	0,0060	115
Klorofil-a	0,0077	90	0,0065	107

4.2 Elde edilen ekstrelerin verimi

Çözgen ekstrelerinin verimi, belli miktarda tartılmış kuru materyalden elde edilen ekstre miktarı tartıldıktan sonra g/100g olacak şekilde hesaplanarak ifade edilmiştir. Uçucu yağ verimi, belli miktarda tartılmış kuru materyalden elde edilen uçucu yağ hacmi klevenger cihazındaki dereceli kısımda ölçüldükten sonra $\mu\text{L}/100\text{g}$ olacak şekilde hesaplanarak ifade edilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 *Chlorella* sp. ve *O. amphibia* ekstralarının verimleri

Organik çözen ekstreleri (g/100g)	% Verim	
	<i>Chlorella</i> sp.	<i>O. amphibia</i>
Aseton	7,39	0,95
Diklorometan	9,73	0,72
Etanol	21,22	0,91
Hekzan	5,25	0,10
Kloroform	11,92	0,60
Metanol	24,95	34,20
Uçucu yağ (µL/100g)	50	10

4.3 GK/KS analiz sonuçları

Uçucu yağ örnekleri 3'er kez analiz edilmiş, bileşiklerin relatif miktarlarının ortalamaları alınmıştır. Uçucu yağ bileşiklerinin tanımlanabilmesi için; GK/KS analizi yapılan uçucu yağların bileşenlerinin kütle spektrumları, Wiley 275 L. kütüphanesindeki ve standart uçucu yağ bileşikleriyle oluşturulmuş ARGEFAR uçucu yağ kütüphanesindeki verilerle bilgisayar taraması yapılarak karşılaştırılmıştır. Alifatik hidrokarbon karışımının ve uçucu yağların GC analizleri yapılarak tutulma indeksleri (RI) hesaplanmıştır (Çizelge 4.3, Çizelge 4.4)

Çizelge 4.3. *Chlorella* sp. uçucu yağ bileşenleri

RI (dak)	Bileşik	Alan (%)
6,35	Nitrik asit, 2-metilpropil ester	51,11
15,92	Palmitik asit	1,24
16,62	n-Heptadecan	6,49
17,47	2-Tridekanol	1,01
18,45	o-Nitrotoluen	1,93
19,61	Sikloheksilheptadecan	0,59
24,36	Fitol	29,84
TOTAL		92,21

Çizelge 4.4 *O. amphibia* uçucu yağ bileşenleri

RI (dak)	Bileşik	Alan (%)
5,97	Nitrik asit, 2-metilpropil ester	22,62
7,18	β - terpinen	2,51
10,93	Solanon	5,55
12,39	Pentadecan	6,99
13,34	β -pinen	8,51
13,78	Sitronellil asetat	4,15
17,49	Tridekanol	3,94
19,61	Sikloheksilheptadecan	12,87
24,36	Fitol	2,86
TOTAL		70,0

4.4 Antioksidan aktivite sonuçları

Bu çalışmada da *Chlorella* sp. ve *O. amphibia*' dan farklı çözümlerle elde edilen ekstralarının DPPH radikalini süpürme, ABTS katyonu renk giderimi ve β -karoten metoduna göre % antioksidan etkileri belirlenmiştir. % 100'ün üzerinde gibi görünen aktivite sonuçları aynı şartlar içerisinde değerlendirilebilmeleri ve ekstraların aynı konsantrasyon aralığında birbiriyle karşılaştırılabilmeleri için % 99,9 $\pm$ 0,0 olarak belirtilmiştir. Araştırma yöntemine göre girişim etkisine neden olan veya % 100' ün üzerinde gibi görünen sonuçlara neden olan konsantrasyon aralığı değiştirilebilmektedir.

DPPH metoduna göre *Chlorella* sp. ekstralarının antioksidan aktivitesi doza bağlı olarak artış göstermektedir. 1mg/mL'deki aktiviteye göre ekstralar kendi aralarında, Etanol > Aseton > Diklorometan > Kloroform > Metanol > Hekzan şeklinde sıralanmaktadır. E vitamini ve BHT'ye göre ise istatistiksel olarak önemli fark görülmektedir (Çizelge 4.5).

ABTS metoduna göre de *Chlorella* sp. ekstraları doza bağlı olarak artan bir aktivite göstermektedir. 1mg/mL konsantrasyondaki ekstralar kendi aralarında, Metanol > Etanol > Diklorometan > Aseton > Kloroform > Hekzan şeklinde sıralanmaktadır. 0,5 ve 1mg/mL konsantrasyondaki metanol ekstresi ile 1mg/mL konsantrasyondaki etanol ekstresi dışındakiler E vitamini ve BHT' ye göre istatistiksel olarak önemli oranda farklı bulunmuştur (Çizelge 4.6).

β -karoten metoduna göre *Chlorella* sp. ekstralarının antioksidan aktiviteleri incelendiğinde, bazılarında konsantrasyon artışıyla beraber girişim etkisi nedeniyle aktivitenin doğrusal bir şekilde artmadığı görülmüştür. Sonuç olarak tüm ekstralarda göre aktivitenin en yüksek olduğu 0,5 mg/mL konsantrasyondaki aktiviteler değerlendirmeye alınmıştır. Buna göre sıralama Metanol > Aseton > Hekzan > Diklorometan > Kloroform > Etanol şeklindedir. 0,5 ve 1mg/mL konsantrasyondaki metanol ekstresi dışındakiler E vitamini ve BHT'ye göre istatistiksel olarak önemli oranda fark göstermektedir (Çizelge 4.7).

Chlorella sp. ekstralarının total fenolik bileşiklerinin miktarı mg GAE/100 g olarak ifade edilmektedir. İçerdikleri fenolik madde miktarı bakımından ekstralar Metanol > Etanol > Aseton > Diklorometan > Hekzan > Kloroform şeklinde sıralanmaktadır. Bu sıralama ile ABTS metodundaki sonuçların sıralaması benzemektedir (Çizelge 4.8).

DPPH metoduna göre *O. amphibia* ekstralarının bazılarının antioksidan aktivitesi ölçümlerdeki kimyasalların girişim etkisi nedeniyle doza bağlı olarak artış göstermemektedir. Bu durumda tüm grup için aseton ekstrenin göstermiş olduğu en yüksek aktivitenin dozu 0,5 mg/mL değerlendirmeye alınmıştır. Ekstreler kendi aralarında, Hekzan > Metanol > Diklorometan > Etanol > Kloroform > Aseton şeklinde sıralanmaktadır. E vitamini ve BHT'ye göre ise istatistiksel olarak önemli fark görülmektedir (Çizelge 4.5).

ABTS metoduna göre *O. amphibia* ekstraları doza bağlı olarak düzenli bir şekilde artan aktivite göstermektedir. 1mg/mL

konsantrasyondaki ekstreler kendi aralarında, Kloroform > Aseton > Hekzan > Diklorometan > Metanol > Etanol şeklinde sıralanmaktadır. 1mg/mL konsantrasyondaki aseton ve kloroform ekstresi BHT' ye göre istatistiksel olarak önemli oranda fark göstermektedir. Diğer ekstreler BHT ve E vitaminine göre önemli oranda farklı bulunmuştur (Çizelge 4.6).

β -karoten metoduna göre ekstrelerinin bazılarında konsantrasyon artışıyla beraber girişim etkisi nedeniyle aktivitenin doğrusal bir şekilde artmadığı görülmüştür. Bu nedenle tüm ekstreler için aseton ve etanol ekstrelerinde aktivitenin en yüksek olduğu 0,5 mg/mL konsantrasyon değerlendirmeye alınmıştır. Buna göre sıralama Kloroform > Metanol > Diklorometan > Hekzan > Aseton > Etanol şeklindedir (Çizelge 4.7).

O. amphibia ekstrelerinin total fenolik bileşiklerinin miktarına bağlı olarak ekstreler; Kloroform > Aseton > Diklorometan > Hekzan > Etanol > Metanol şeklinde sıralanmaktadır. Bu sıralama ABTS metodundaki sıralamaya benzemektedir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.5 DPPH metoduna göre antioksidan aktivite

<i>Chlorella</i> sp.	% Antioksidan Aktivite (mg/mL ekstre)			
	1	0,5	0,25	0,125
Aseton	24,9±1,3*	10,4±1,5*	5,5±0,5*	2,6±1,3*
Kloroform	5,1±0,0*	2,7±0,1*	2,5±0,4*	2,2±0,1*
Etanol	29,1±3,3*	20,0±0,5*	11,3±0,2*	7,3±0,1*
Diklorometan	16,3±0,8*	6,9±0,0*	3,6±0,2*	2,9±0,4*
Hekzan	0,3±0,1*	0,1±0,1*	0,0±0,0*	0,2±0,2*
Metanol	4,3±0,2*	4,1±0,0*	3,6±0,3*	1,9±1,1*
0,1 mg/mL				
E vitamini	89,6±4,7			
BHT	96,1±3,6			

<i>O. amphibia</i>				
Aseton	1,6±1,2*	3,6±0,7*	4,5±0,1*	2,2±1,3*
Kloroform	5,9±0,2*	10,0±0,3*	9,3±0,2*	7,9±0,1*
Etanol	7,1±0,9*	4,2±0,3*	3,4±0,9*	3,4±0,4*
Diklorometan	7,6±0,0*	7,6±0,1*	5,8±0,0*	4,5±0,2*
Hekzan	18,7±0,6*	11,9±0,0*	8,1±0,2*	5,2±0,3*
Metanol	7,7±0,2*	4,7±0,1*	3,2±0,1*	3,1±0,4*
0,1 mg/mL				
E vitamini	86,2±6,3			
BHT	94,8±4,8			

* E vitamini ve BHT'ye göre göre $p < 0,05$ seviyesinde önemli fark, ortalama değer±SH (Standart hata), n=3.

Çizelge 4.6 ABTS metoduna göre antioksidan aktivite

<i>Chlorella</i> sp.	% Antioksidan Aktivite (mg/mL ekstre)			
	1	0,5	0,25	0,125
Aseton	31,2±0,6 ^{*#}	19,3±2,2 ^{*#}	8,4±0,3 ^{*#}	4,5±1,1 ^{*#}
Kloroform	4,0±0,9 ^{*#}	2,8±1,4 ^{*#}	1,6±0,4 ^{*#}	2,4±1,0 ^{*#}
Etanol	72,1±0,9	37,1±1,3 ^{*#}	14,7±0,9 ^{*#}	3,7±1,8 ^{*#}
Diklorometan	44,1±0,4 ^{*#}	14,7±4,1 ^{*#}	11,6±0,3 ^{*#}	3,74±0,4 ^{*#}
Hekzan	0,0±0,0 ^{*#}	0,0±0,0 ^{*#}	0,0±0,0 ^{*#}	0,0±0,0 ^{*#}
Metanol	83,9±0,5	71,9±0,5	42,4±1,6 ^{*#}	26,2±1,3 [#]
0,1 mg/mL				
E vitamini	85,4±3,9			
BHT	94,5±2,9			

<i>O. amphibibia</i>				
Aseton	84,5±2,9 [#]	66,7±8,0 ^{*#}	37,6±3,3 ^{*#}	18,9±2,9 ^{*#}
Kloroform	86,1±1,7 [#]	80,7±1,2 ^{*#}	71,4±3,6 [#]	32,3±4,2 ^{*#}
Etanol	12,4±1,7 ^{*#}	11,8±1,5 ^{*#}	4,1±2,0 ^{*#}	1,5±1,1 ^{*#}
Diklorometan	50,9±9,8 ^{*#}	36,5±3,5 ^{*#}	29,1±2,7 ^{*#}	10,6±1,9 [#]
Hekzan	75,8±7,7 ^{*#}	48,2±2,7 ^{*#}	19,9±4,1 ^{*#}	10,8±3,5 [#]
Metanol	17,8±0,1 ^{*#}	14,2±1,7 ^{*#}	6,7±2,5 ^{*#}	4,0±2,2 ^{*#}
0,1 mg/mL				
E vitamini	86,2±3,6			
BHT	94,8±2,8			

* E vitaminine göre, [#] BHT'ye göre p<0,05 seviyesinde önemli fark, ortalama değer±SH (Standart hata), n=3.

Çizelge 4.7 β -karoten metoduna göre antioksidan aktivite

<i>Chlorella</i> sp.	% Antioksidan Aktivite (mg/mL ekstre)			
	1	0,5	0,25	0,125
Aseton	41,3±6,8 ^{*#}	49,0±10,6 ^{*#}	13,2±3,5 ^{*#}	6,7±6,4 ^{*#}
Kloroform	25,5±2,1 ^{*#}	10,7±4,0 ^{*#}	2,9±1,5 ^{*#}	7,2±3,8 ^{*#}
Etanol	30,3±13,8 ^{*#}	0,1±0,0 ^{*#}	0,1±0,0 ^{*#}	0,1±0,0 ^{*#}
Diklorometan	24,1±12,0 ^{*#}	12,9±12,9 ^{*#}	9,3±16,1 ^{*#}	0,1±0,0 ^{*#}
Hekzan	47,7±4,4 ^{*#}	21,7±1,8 ^{*#}	6,5±3,3 ^{*#}	3,28±2,4 ^{*#}
Metanol	99,0±0,0	64,1±23,6	42,9±5,8 ^{*#}	30,5±2,3 ^{*#}
0,1 mg/mL				
E vitamini	77,6±14,5			
BHT	88,5±6,3			

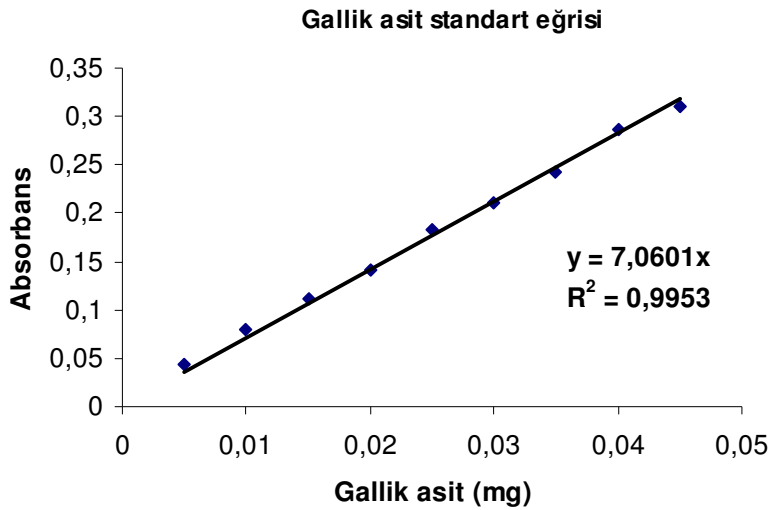
<i>O. amphibia</i>				
Aseton	28,4±2,3 ^{*#}	43,4±1,7 ^{*#}	28,4±2,3 ^{*#}	15,5±2,4 ^{*#}
Kloroform	99,0±0,0 [*]	87,9±2,8 [#]	57,4±0,1 ^{*#}	34,6±4,8 ^{*#}
Etanol	34,7±1,7 ^{*#}	35,1±1,5 ^{*#}	39,5±0,8 ^{*#}	51,6±3,0 ^{*#}
Diklorometan	90,00±1,7 [#]	62,8±2,0 ^{*#}	42,2±1,8 ^{*#}	27,8±1,3 ^{*#}
Hekzan	85,3±3,8 [*]	53,5±1,5 ^{*#}	30,3±1,2 ^{*#}	16,6±1,8 ^{*#}
Metanol	70,9±0,2 ^{*#}	64,6±1,1 ^{*#}	41,3±1,0 ^{*#}	27,5±1,1 ^{*#}
0,1 mg/mL				
E vitamini	90,4±6,2			
BHT	95,1±2,7			

* E vitaminine göre, [#] BHT'ye göre <0,05 seviyesinde önemli fark, ortalama değer±SH (Standart hata), n=3.

Çizelge 4.8 Total fenolik bileşik miktarı

	mg Gallik Asit Eşdeğer/100g	
	<i>Chlorella sp.</i>	<i>O. amphibia</i>
Aseton	2165,7±66,0	3752,6±74,6
Kloroform	701,1±31,5	6681,8±115,0
Etanol	3167,99±77,6	326,1±9,3
Diklorometan	1724,1±31,6	2772,2±122,3
Hekzan	888,4±31,0	2339,8±99,9
Metanol	4027,2±477,2	275,1±7,3

Ortalama değer±SH (Standart hata), n=3

**Şekil 4.3** Total fenolik bileşik miktarını belirlemek için kullanılan standart eğri

4.5 Antimikrobiyal aktivite sonuçları

Chlorella sp. ekstraları disk difüzyon testine göre Gram pozitif bakterilere oldukça iyi antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Tüm ekstralar *B. cereus*, *B. subtilis* ve *S. aureus*' a karşı antibakteriyal etki göstermektedir. En yüksek aktiviteyi 2 mg/disk konsantrasyonda 11,0 mm zon çapı ile *B. subtilis*' e karşı etanol ekstresi ve *S. aureus*' a karşı hekzan ekstresi göstermiştir. Yalnızca aseton ve hekzan ekstraları Metisilin-oksasilin dirençli *S. aureus*' a etkili bulunurken, ekstraların hiçbirisi hemorajik, *E. coli* O157:H7' ye karşı aktivite göstermemiştir. Hekzan, diklorometan ve metanol ekstraları Gram negatif bakterilerden yalnızca *P. aeruginosa*' ya etkili bulunmuştur (Çizelge 4.9, Çizelge 4.10).

Mikrodilüsyon yöntemi sonuçlarına göre metanol, diklorometan, aseton ve etanol ekstralarının MİK aralığı 250- ≥ 2000 $\mu\text{g/mL}$, MBK (MFK) aralığı 500- ≥ 2000 $\mu\text{g/mL}$ olarak, kloroform ve hekzan ekstralarının MİK aralığı 500- ≥ 2000 $\mu\text{g/mL}$, MBK (MFK) ≥ 2000 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlendi. Disk difüzyon yönteminden farklı olarak hem Gram pozitif hem de Gram negatif mikroorganizmalara etki gözlenmiştir. Etanol, diklorometan ve metanol ekstraları *C. albicans*' a karşı etkili bulunmuş ve MİK(MFK) değerlerinin 2000(2000) $\mu\text{g/mL}$ olduğu görülmüştür (Çizelge 4.13, Çizelge 4.14).

O. amphibia' nın yalnızca hekzan ekstresi disk difüzyon metoduna göre hem Gram pozitif, hem de Gram negatif etkinlik göstermektedir. Hekzan ekstresi en yüksek aktiviteyi 2 mg/disk konsantrasyonda 21,0

mm zon çapı ile Metisilin-oksasilin dirençli *S. aureus*' a göstermektedir. Ayrıca hemorajik *E. coli* O157:H7' ye karşı da 2 mg/disk konsantrasyonda 12,0 mm zon çapı ile oldukça iyi antimikrobiyal aktivite göstermektedir. *E. cloaceae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *C. albicans*' a karşı etki bulunamamıştır (izelge 4.11, izelge 4.12).

Mikrodilüsyon metoduna göre tüm ekstrelerin uygulanan doz aralığında antibakteriyal aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Yalnızca aseton ve etanol ekstreleri *C. albicans*' a karşı aktivite göstermemiştir. Aseton ekstresinin MİK aralığı 250-≥2000 µg/mL, MBK(MFK) aralığı 500-≥2000 µg/mL; diklorometan ekstresinin MİK aralığı 500-≥2000 µg/mL, MBK(MFK) ≥2000 µg/mL, kloroform ve hekzan ekstrelerinin MİK aralığı 1000-≥2000 µg/mL, MBK(MFK) ≥2000 µg/mL, etanol ekstresinin MİK aralığı 1000->2000 µg/mL, MBK(MFK) >2000 µg/mL, metanol ekstresinin MİK≥2000 µg/mL ve MBK(MFK) ≥2000 µg/mL olarak tespit edilmiştir (izelge 4.15, izelge 4.16).

Çizelge 4.9 *Chlorella* sp. aseton, etanol, hekzan ekstralarının disk difüzyon testi sonuçları

Test Organizmalar	İnhibisyon zon çapları (mm)										
	Standart Antibiyotikler		Aseton (mg/disk)			Etanol (mg/disk)			Hekzan (mg/disk)		
	T	N	0,5	1,0	2,0	0,5	1,0	2,0	0,5	1,0	2,0
<i>B. cereus</i>	18	D	—	6,5	7,0	6,5	7,0	7,5	6,5	7,0	7,5
<i>B. subtilis</i>	24	D	6,5	7,5	8,5	7,0	8,5	11,0	7,0	8,0	9,0
<i>S. aureus</i>	16	D	7,0	8,0	9,0	7,0	8,0	9,0	7,0	9,0	11,0
<i>S. aureus*</i>	7	D	7,0	8,0	9,0	—	—	—	7,0	8,0	9,0
<i>E. aerogenes</i>	19	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. cloaceae</i>	13	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E.coli</i>	10	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. coli**</i>	25	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. aeruginosa</i>	12	D	—	—	—	—	—	—	—	6,5	7,0
<i>P. vulgaris</i>	13	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. typhimurium</i>	10	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>C. albicans</i>	D	18	—	—	—	—	—	—	—	—	—

*Metisilin-oksasilin dirençli; **Hemorajik, O157:H7; T-Tobramisin 10 µg/disk; N-Nistatin 30µg/disk; D-Denenemedi.

Çizelge 4.10 *Chlorella* sp. kloroform, metanol, diklorometan ekstrelerinin disk difüzyon testi sonuçları

Test Organizmalar	İnhibisyon zon çapları (mm)										
	Standart Antibiyotikler		Kloroform (mg/disk)			Metanol (mg/disk)			Diklorometan (mg/disk)		
	T	N	0,5	1,0	2,0	0,5	1,0	2,0	0,5	1,0	2,0
<i>B. cereus</i>	18	D	—	—	6,5	—	—	6,5	—	6,5	7,0
<i>B. subtilis</i>	24	D	6,5	7,0	7,5	—	—	6,5	6,5	7,5	8,5
<i>S. aureus</i>	16	D	6,5	7,0	7,5	—	—	6,5	6,5	7,5	8,5
<i>S. aureus*</i>	7	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. aerogenes</i>	19	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. cloaceae</i>	13	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E.coli</i>	10	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. coli**</i>	25	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. aeruginosa</i>	12	D	—	—	—	—	—	6,5	—	6,5	7,0
<i>P. vulgaris</i>	13	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. typhimurium</i>	10	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>C. albicans</i>	D	18	—	—	—	—	—	—	—	—	—

*Metisilin-oksasilin dirençli; **Hemorajik, O157:H7; **T**-Tobramisin 10 µg/disk; **N**-Nistatin 30µg/disk; **D**-Denenemedi.

Çizelge 4.11 *O. amphibia* aseton, etanol, hekzan ekstralarının disk difüzyon testi sonuçları

Test Organizmalar	İnhibisyon zon çapları (mm)										
	Standart Antibiyotikler		Aseton (mg/disk)			Etanol (mg/disk)			Hekzan (mg/disk)		
	T	N	0,5	1,0	2,0	0,5	1,0	2,0	0,5	1,0	2,0
<i>B. cereus</i>	18	D	—	—	—	—	—	—	—	7,0	8,0
<i>B. subtilis</i>	24	D	—	—	—	—	—	—	7,0	9,0	11,0
<i>S. aureus</i>	16	D	—	—	—	—	—	—	12,0	15,0	18,0
<i>S. aureus*</i>	7	D	—	—	—	—	—	—	14,0	17,0	21,0
<i>E. aerogenes</i>	19	D	—	—	—	—	—	—	—	8,0	10,0
<i>E. cloaceae</i>	13	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E.coli</i>	10	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. coli**</i>	25	D	—	—	—	—	—	—	—	9,0	12,0
<i>P. aeruginosa</i>	12	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. vulgaris</i>	13	D	—	—	—	—	—	—	14,0	17,0	20,0
<i>S. typhimurium</i>	10	D	—	—	—	—	—	—	—	8,0	12,0
<i>C. albicans</i>	D	18	—	—	—	—	—	—	—	—	—

*Metisilin-oksasilin dirençli; ** Hemorajik, O157:H7; T-Tobramisin 10 µg/disk; N-Nistatin 30µg/disk; D-Denenemedi.

Çizelge 4.12 *O. amphibia* kloroform, metanol, diklorometan ekstrlerinin disk difüzyon testi sonuçları

Test Organizmalar	İnhibisyon zon çapları (mm)										
	Standart Antibiyotikler		Kloroform (mg/disk)			Metanol (mg/disk)			Diklorometan (mg/disk)		
	T	N	0,5	1,0	2,0	0,5	1,0	2,0	0,5	1,0	2,0
<i>B. cereus</i>	18	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. subtilis</i>	24	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. aureus</i>	16	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. aureus*</i>	7	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. aerogenes</i>	19	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. cloaceae</i>	13	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. coli</i>	10	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. coli**</i>	25	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. aeruginosa</i>	12	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. vulgaris</i>	13	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. typhimurium</i>	10	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>C. albicans</i>	D	18	—	—	—	—	—	—	—	—	—

*Metisilin-oksasilin dirençli; **Hemorajik, O157:H7; **T**-Tobramisin 10 µg/disk; **N**-Nistatin 30µg/disk; **D**-Denenemedi.

Çizelge 4.13 *Chlorella* sp. aseton, etanol, hekzan ekstralarının mikrodilüsyon testi sonuçları

Test Organizmalar	MİK (MBK / MFK) µg/mL					
	Aseton	Etanol	Hekzan	S	A	N
<i>B. cereus</i>	—	2000 (2000)	—	4,0 (4,0)	8,0 (8,0)	D
<i>B. subtilis</i>	250 (500)	2000 (2000)	2000 (2000)	0,5 (0,5)	0,5 (2,0)	D
<i>S. aureus</i>	500 (2000)	250 (500)	500 (—)	2,0 (4,0)	<0,25 (<0,25)	D
<i>S. aureus*</i>	2000 (2000)	2000 (—)	500 (—)	4,0 (4,0)	32 (>128)	D
<i>E. aerogenes</i>	2000 (2000)	2000 (—)	—	4,0 (8,0)	—	D
<i>E. cloaceae</i>	250 (500)	500 (500)	1000 (—)	—	2,0 (2,0)	D
<i>E.coli</i>	2000 (—)	1000 (—)	—	4,0 (4,0)	64 (128)	D
<i>E. coli**</i>	2000 (—)	—	—	4,0 (4,0)	4,0 (4,0)	D
<i>P. aeruginosa</i>	—	—	—	1,0 (1,0)	16 (32)	D
<i>P. vulgaris</i>	2000 (—)	1000 (—)	—	8,0 (8,0)	0,5 (0,5)	D
<i>S. typhimurium</i>	2000 (—)	—	—	16 (32)	1,0 (4,0)	D
<i>C. albicans</i>	—	2000 (2000)	—	D	D	8,0 (16)

*Metisilin-oksasilin dirençli; ** Hemorajik, O157:H7 ; —, aktivite bulunamadı; **MİK**, minimum inhibitör konsantrasyonu; **MBK**, minimum bakterisidal konsantrasyonu, **MFK**, minimum fungisidal konsantrasyonu, **S**, Streptomisin, **A**, Ampisilin, **N**, Nistatin; **D**, denenmedi.

Çizelge 4.14 *Chlorella* sp. kloroform, metanol, diklorometan ekstralarının mikrodilüsyon testi sonuçları

Test Organizmalar	MİK (MBK / MFK) µg/mL					
	Kloroform	Metanol	Diklorometan	S	A	N
<i>B. cereus</i>	2000 (2000)	500 (500)	2000 (2000)	4,0 (4,0)	8,0 (8,0)	D
<i>B. subtilis</i>	—	2000 (2000)	1000 (1000)	0,5 (0,5)	0,5 (2,0)	D
<i>S. aureus</i>	500 (—)	1000 (—)	250 (500)	2,0 (4,0)	<0,25 (<0,25)	D
<i>S. aureus*</i>	—	1000 (—)	1000 (1000)	4,0 (4,0)	32 (>128)	D
<i>E. aerogenes</i>	—	2000 (—)	—	4,0 (8,0)	—	D
<i>E. cloacae</i>	500 (—)	250 (1000)	500 (500)	—	2,0 (2,0)	D
<i>E.coli</i>	—	2000 (—)	500 (—)	4,0 (4,0)	64 (128)	D
<i>E. coli**</i>	1000 (—)	1000 (—)	1000 (—)	4,0 (4,0)	4,0 (4,0)	D
<i>P. aeruginosa</i>	—	—	—	1,0 (1,0)	16 (32)	D
<i>P. vulgaris</i>	1000 (—)	1000 (—)	—	8,0 (8,0)	0,5 (0,5)	D
<i>S. typhimurium</i>	1000 (—)	—	1000 (—)	16 (32)	1,0 (4,0)	D
<i>C. albicans</i>	2000 (2000)	—	2000 (2000)	D	D	8,0 (16)

*Metisilin-oksasilin dirençli; **Hemorajik, O157:H7 ; —, aktivite bulunamadı; **MİK**, minimum inhibitör konsantrasyonu; **MBK**, minimum bakterisidal konsantrasyonu, **MFK**, minimum fungisidal konsantrasyonu, **S**, Streptomisin, **A**, Ampisilin, **N**, Nistatin; **D**, denenmedi.

Çizelge 4.15 *O. amphibia* aseton, etanol, hekzan ekstralarının mikrodilüsyon testi sonuçları

Test Organizmalar	MİK (MBK / MFK) µg/mL					
	Aseton	Etanol	Hekzan	S	A	N
<i>B. cereus</i>	—	—	—	4,0 (4,0)	8,0 (8,0)	D
<i>B. subtilis</i>	250 (500)	—	—	0,5 (0,5)	0,5 (2,0)	D
<i>S. aureus</i>	500 (2000)	—	1000 (—)	2,0 (4,0)	<0,25 (<0,25)	D
<i>S. aureus*</i>	2000 (2000)	—	—	4,0 (4,0)	32 (>128)	D
<i>E. aerogenes</i>	2000 (2000)	—	2000 (—)	4,0 (8,0)	—	D
<i>E. cloaceae</i>	250 (500)	1000 (—)	1000 (—)	—	2,0 (2,0)	D
<i>E. coli</i>	2000 (—)	1000 (—)	2000 (—)	4,0 (4,0)	64 (128)	D
<i>E. coli**</i>	2000 (—)	—	—	4,0 (4,0)	4,0 (4,0)	D
<i>P. aeruginosa</i>	—	—	—	1,0 (1,0)	16 (32)	D
<i>P. vulgaris</i>	2000 (—)	—	2000 (—)	8,0 (8,0)	0,5 (0,5)	D
<i>S. typhimurium</i>	2000 (—)	—	—	16 (32)	1,0 (4,0)	D
<i>C. albicans</i>	—	—	2000 (2000)	D	D	8,0 (16)

*Metisilin-oksasilin dirençli; **Hemorajik, O157:H7 ; —, aktivite bulunamadı; **MİK**, minimum inhibitör konsantrasyonu; **MBK**, minimum bakterisidal konsantrasyonu, **MFK**, minimum fungisidal konsantrasyonu, **S**, Streptomisin, **A**, Ampisilin, **N**, Nistatin; **D**, denenmedi.

Çizelge 4.16 *O. amphibia* kloroform, metanol, diklorometan ekstralarının mikrodilüsyon testi sonuçları

Test Organizmalar	MİK (MBK / MFK) µg/mL					
	Kloroform	Metanol	Diklorometan	S	A	N
<i>B. cereus</i>	2000 (2000)	—	1000 (2000)	4,0 (4,0)	8,0 (8,0)	D
<i>B. subtilis</i>	—	2000 (2000)	—	0,5 (0,5)	0,5 (2,0)	D
<i>S. aureus</i>	—	—	2000 (—)	2,0 (4,0)	<0,25 (<0,25)	D
<i>S. aureus*</i>	—	—	—	4,0 (4,0)	32 (>128)	D
<i>E. aerogenes</i>	—	—	—	4,0 (8,0)	—	D
<i>E. cloaceae</i>	1000 (—)	—	500 (—)	—	2,0 (2,0)	D
<i>E. coli</i>	2000 (—)	2000 (—)	2000 (—)	4,0 (4,0)	64 (128)	D
<i>E. coli**</i>	—	—	—	4,0 (4,0)	4,0 (4,0)	D
<i>P. aeruginosa</i>	—	—	—	1,0 (1,0)	16 (32)	D
<i>P. vulgaris</i>	1000 (—)	2000 (2000)	2000 (—)	8,0 (8,0)	0,5 (0,5)	D
<i>S. typhimurium</i>	—	—	—	16 (32)	1,0 (4,0)	D
<i>C. albicans</i>	2000 (—)	2000 (2000)	2000 (—)	D	D	8,0 (16)

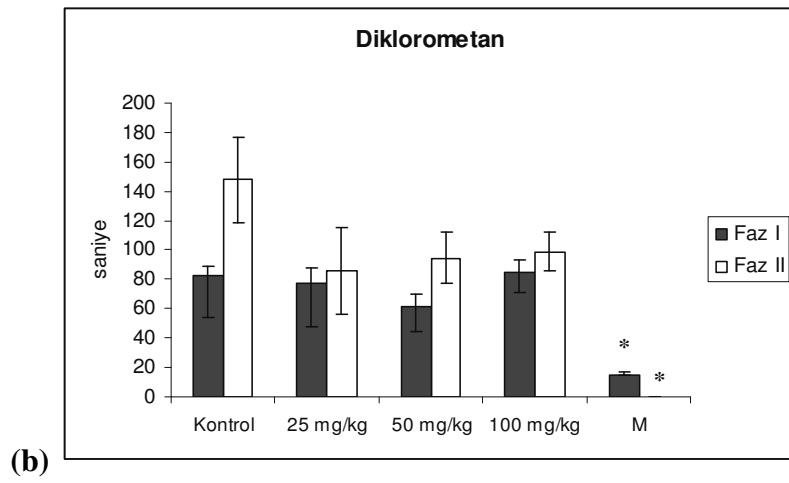
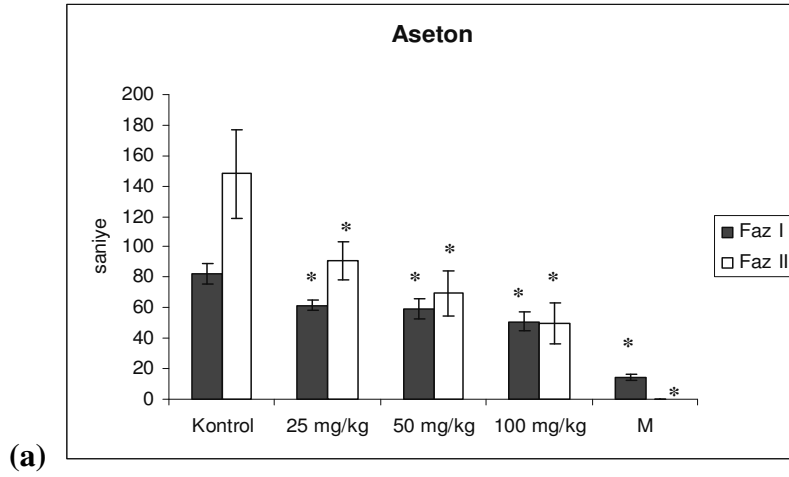
*Metisilin-okasilin dirençli; ** Hemorajik, O157:H7 ; —, aktivite bulunamadı; **MİK**, minimum inhibitör konsantrasyonu; **MBK**, minimum bakterisidal konsantrasyonu, **MFK**, minimum fungisidal konsantrasyonu, **S**, Streptomisin, **A**, Ampisilin, **N**, Nistatin; **D**, denenmedi

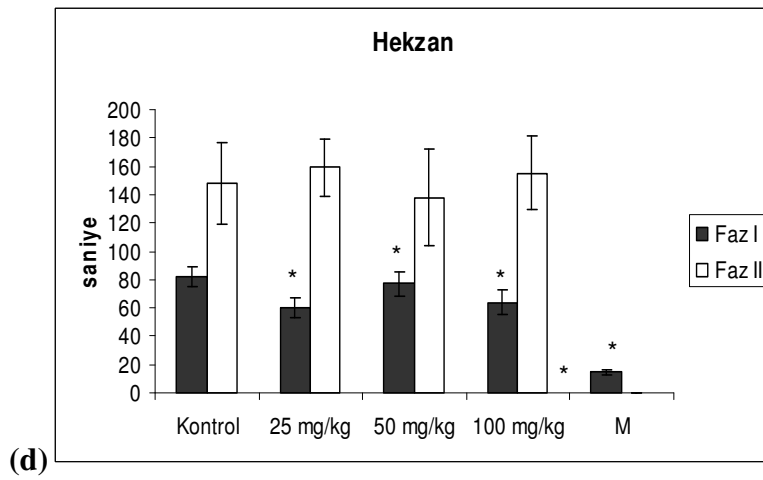
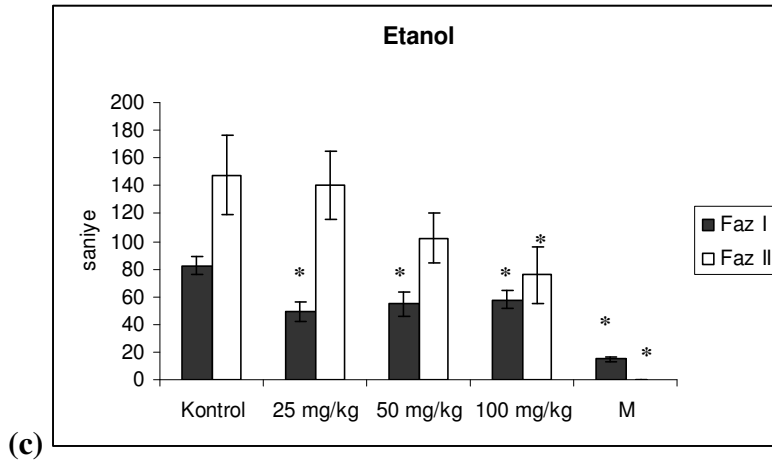
4.6 Formalin testi sonuçları

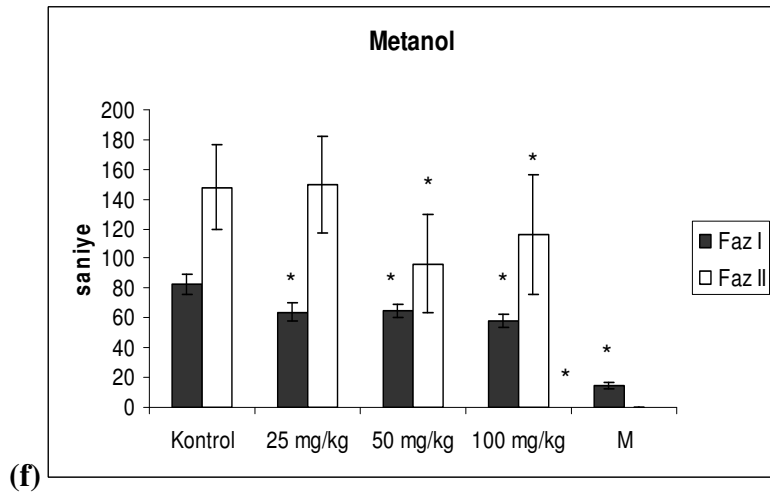
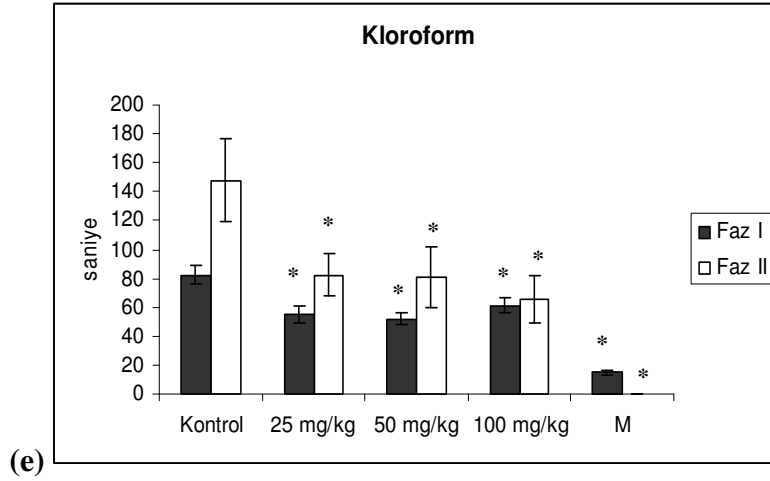
Formalin testi laboratuvar hayvanlarında kalıcı ağrının modellenmesi için sıkça kullanılan bir nosiseptif testtir. Formaline karşı nosiseptif ve inflamatuvar yanıt arasındaki ilişki anlaşılamamaktadır, ancak bu konuda yapılan diğer çalışmalardaki bulgular formaline erken yanıtın (akut faz-Faz I) nosiseptörlerin doğrudan uyarılmasına bağlı olduğu ve geç fazın doğrudan bunu izleyen inflamatuvar yanıtla (geç faz-Faz II) ilişkili olduğunu ifade etmektedir (Yashpal and Coderre, 1998).

Chlorella sp. ve *O. amphibia* ekstrelerinin formalin testi sonuçları istatistiksel olarak değerlendirilerek grafiklerle ifade edilmiştir. Bu sonuçlara göre *Chlorella* sp.'nin (Şekil 4.4) aseton ve kloroform ekstresi 25-50-100 mg/kg dozda hem akut fazda hem de geç fazda etkili bulunmuştur. Dikloromatan ekstresinin uygulanan dozlarda etkisi bulunamamıştır. Hekzan ekstresi sadece akut fazda etkili olmuş ancak inflamatuvar faza etki etmemiştir. Metanol ekstresi 25-50-100 mg/kg dozda sadece inflamatuvar fazı inhibe ederken, sadece 50 ve 100 mg/kg dozda akut faza etki etmiştir. Etanol ekstresi yalnızca 100 mg/kg dozda geç fazı etkilerken, her üç dozda akut faza etkili bulunmuştur.

O. amphibia'nın (Şekil 4.5) metanol ekstresi hariç tüm ekstreleri formalin testinin ikinci fazında her üç dozda da etkili bulunmuştur. Metanol ekstresi birinci fazda her üç dozda da etki göstermezken, 100 mg/kg dozda ikinci faza etkili bulunmuştur. Yalnızca diklorometan ekstresi her üç dozda da her iki faza da etki etmektedir.



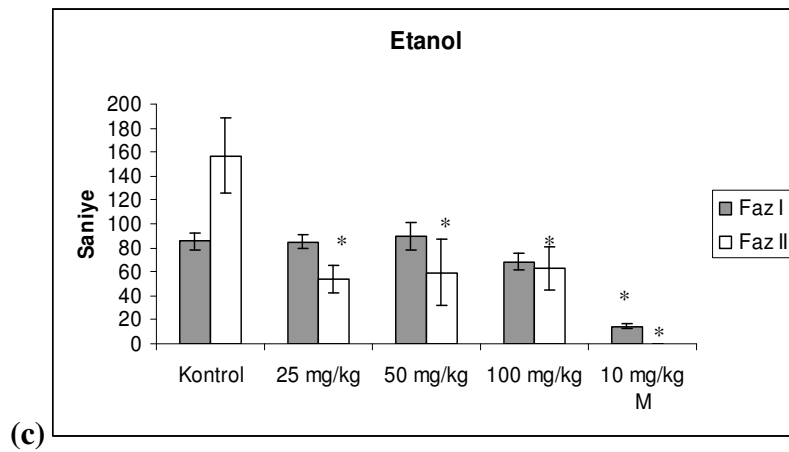
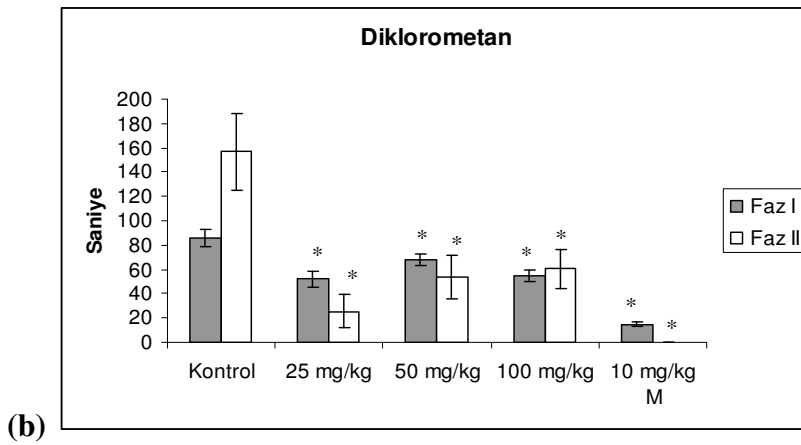
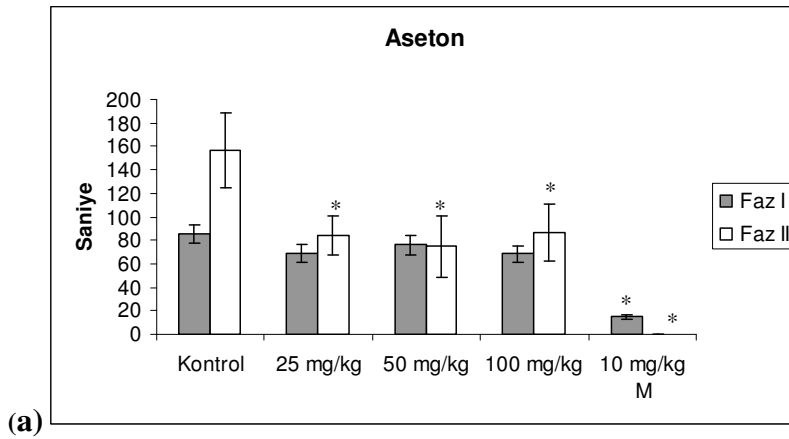


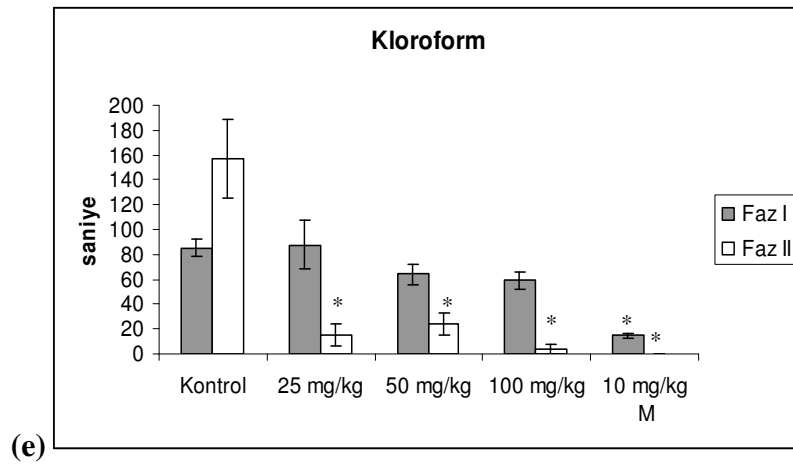
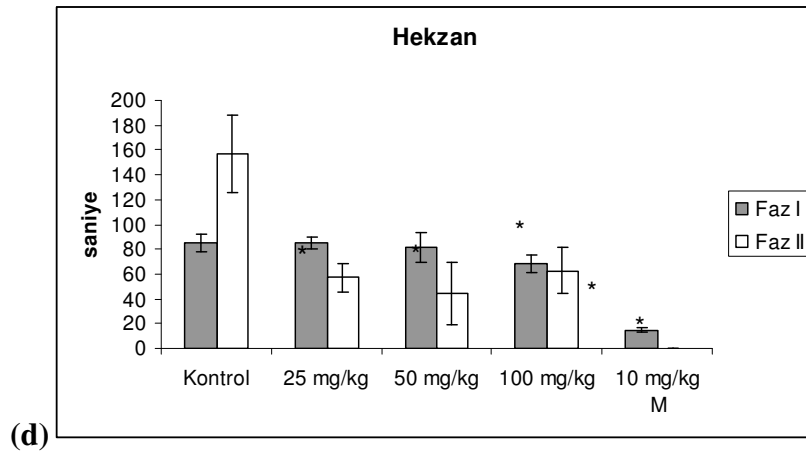


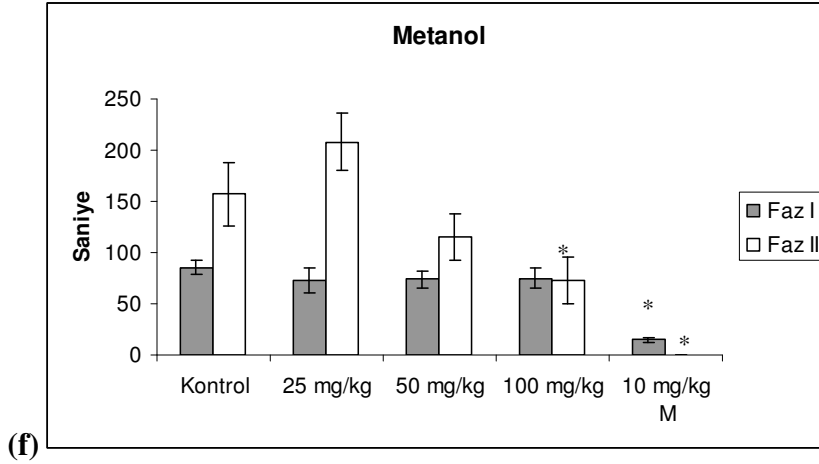
Şekil 4.4 *Chlorella* sp. formalin testi sonuçları

a) Aseton ekstresi, b) Diklorometan ekstresi, c) Etanol ekstresi, d) Hekzan ekstresi, e) Kloroform ekstresi, f) Metanol ekstresi, * $p < 0,05$ seviyesinde kontrole göre önemli fark.

M: 10 mg/kg morfin.







Şekil 4.5 *O. amphibia* formalin testi sonuçları

a) Aseton ekstresi, b) Diklorometan ekstresi, c) Etanol ekstresi, d) Hekzan ekstresi, e) Kloroform ekstresi, f) Metanol ekstresi, * $p < 0,05$ seviyesinde kontrole göre önemli fark.

M: 10 mg/kg morfin.

4.7 Akut toksisite sonuçları

Chlorella sp. ekstreleri 2000 mg/kg dozda i.p. uygulamada toksik bulunmamıştır. *O. amphibia* etanol ekstresi aynı uygulamada toksik etki göstermiş ve $LD_{10} = 561$ mg/kg, $LD_{50} = 840$ mg/kg ve $LD_{90} = 1120$ mg/kg olarak belirlenmiştir.

5 SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Alglerin farmakolojik etkileriyle ilgili çalışmaların çoğu antimikrobiyal, antitümöral ve immunmodülatör etkileri üzerinedir (Guzmán et al., 2001;). Ticari olarak değerli bazı metabolitleri bünyelerinde toplayan mikroalgelere ve mikroalgal biyoteknolojiye olan ilgi ülkemizde giderek artmaktadır. Bir siyanobakteri türü olan *Spirulina platensis* üretimi için gerçekleştirilen ticari girişimler bunun en güzel göstergelerinden biridir. Günümüzde, mikroalgal biyoteknolojide karşılaşılan en önemli sorunlardan biri üretimi yapılabilen ticari tür sayısının sınırlı sayıda olmasıdır (Göksan ve Gökpinar, 2005). Tez çalışmamızda, “İçsullarda bulunan bazı mikroalgelerin kültür koleksiyonu (YDABAG101Y05)” isimli TÜBİTAK projesi kapsamında, ülkemizin çeşitli göllerinden izole edilmiş türlerle oluşturulan Ege Üniversitesi Mikroalg Kültür Koleksiyonu (Ege-MACC)’ ndan seçilen bir mikroalg *Chlorella* sp. (Salda Gölü; CC-1) ve bir siyanobakteri *Oscillatoria amphibia*’ (Acı Göl CC-14) nın farmakolojik açıdan incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın sonucunda elde edilen verilere göre oldukça iyi antimikrobiyal, antioksidan, analjezik ve antiinflamatuvar etkilerinin potansiyel varlığı gözlenmiş ve biyolojik olarak aktif bileşiklerinin olduğu belirlenmiş, üretimleri laboratuvar koşullarında kolayca yapılabilen bu türler, mikroalgal biyoteknolojiye kazandırılmıştır.

Mikroalgelerde yağ asidi içeriği taksonomik gruplara ve büyüme şartlarına göre değişmektedir. Sıcaklık, ışık yoğunluğu, pH, havalandırma ve karıştırma gibi çevresel faktörler ile besin ortamın

seçimi hücre verimini, hücre kompozisyonunu ve elde edilecek spesifik ürünü etkilemektedir (Imamoglu et al, 2007; Pratoomyot et al., 2005). Tayland’da yapılan bir çalışmada 10 mikroalg türünün büyümenin logaritmik ve durağan fazlarındaki yağ asidi kompozisyonları belirlenmiştir. Bunların çoğunda benzer yağ asidi profillerinin olduğu gözlenmiştir. Ancak yağ asidi oranlarının durağan fazda daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Durağan fazda besin yetersizliği nedeniyle hücre bölünmesi giderek azalmakta ve hücreler ürünlerini depolamaya başlamaktadır (Pratoomyot et al., 2005).

Çalışmamızda *Chlorella* sp. ve *O. amphibia* kültürlerinde öncelikle durağan faz belirlenerek bu dönemin sonunda, yağ asitleri ve değerli diğer bileşiklerce zengin içerikli hücreler elde edilmeye çalışılmıştır. Kültürlerin büyümeleri, türbidite, pH, hücre sayısı, kuru ağırlık ve klorofil-a değerlerinin değişimi 20 gün boyunca izlenmiştir. *Chlorella* sp. ve *O. amphibia* örneklerinde durağan fazın 15-16. günlerde sona erdiği görülmüştür. Bu dönemde ortamdan ayrılan hücrelerden hazırlanan ekstreler farmakolojik aktivite denemelerimizde oldukça iyi antimikrobiyal, antioksidan, analjezik ve antiinflamatuvar etki göstermiştir.

Uçucu yağlar ve GK/KS analizleri

Uçucu yağlar, parfüm, kozmetik, aromaterapi, fitoterapi, baharat ve gıda gibi alanlarda ham madde olarak kullanılan değerli doğal ürünlerdir. Uçucu yağların biyolojik aktiviteleri konusunda pek çok yayın bulunmaktadır (Arrigoni-Blank et al., 2008; Del-Vechio-Vieira et al., 2009; Wei and Shibamoto, 2007; Zhao et al., 2009). Esansiyel yağlar pek

çok bileşiğin kompleks bir karışımı şeklindedir. Bu bileşiklerin her birine ait ayrı ayrı yararlı veya toksik etkiler bulunmaktadır. Genellikle hidrodistilasyonla elde edilmektedir ve kimyasal analizleri Gaz Kromatografi (kantitatif analiz) ve Gaz Kromatografi/Kütle Spektroskopisi (kalitatif analiz) kullanılarak yapılmaktadır. Temel bileşiklerin tanımlanması hem GK gecikme zamanları (retention time) hem de KS verilerinin daha önce rapor edilmiş referans standartlarla karşılaştırılması ile gerçekleştirilir. GK ile kolayca ayrılamayan bileşikler ^{13}C NMR (nükleer manyetik rezonans) ile analiz edilirler (Lahlou, 2004).

Çalışmamızda *Chlorella* sp. uçucu yağı % 92,21 oranında tanımlanmış (7 bileşik); içeriğinde nitrik asit, 2 metil-propil ester % 51,11; fitol % 29,84; palmitik asit (% 1,24) ve çeşitli hidrokarbonlar bulunduğu saptanmıştır. *O. amphibia* uçucu yağı ise % 70 oranında tanımlanmış (9 bileşik); nitrik asit, 2 metil-propil ester % 22,62; fitol % 2,86; beta-pinen % 8,51; solanon % 5,55; beta-terpinen % 2,51 bileşiklerinin yanı sıra çeşitli hidrokarbonlar içermektedir.

İzobutil nitrit olarak da isimlendirilen nitrik asit, 2 metil-propil ester, çeşitli hücreler için nonspesifik olarak sitotoksik ve dokulara uygulandığında immunsupresif etkiler göstermektedir (Hersch et al., 1983). İzobutil nitrit, “poppers” adıyla bilinen ve inhalasyonla alınan bir grup bileşikten biridir. Nitrit inhalanlar sıkça erkek homoseksüeller tarafından suistimal edilmektedir. Nitrit inhalanların suistimali HIV (human immunodeficiency virus) seropozitifliğiyle ilişkili bir dizi epidemiyolojik çalışma ile de ilişkilidir (Soderberg and Barnett, 1995).

Klorofil yapısının önemli bir parçası olan ve pek çok yeşil algin uçucu yağında önemli oranda bulunan fitol dört izopren halkasından oluşmaktadır. A vitamini, β -karoten, E vitamini sentezi için prekürsördür. Hücre içerisinde başka fonksiyonlarının da olabileceği düşünülmektedir (Borowitzka, 1992a; Kamburova et al., 2003).

Hidrodistilasyonda suyun kaynatılması esnasında uygulanan yüksek sıcaklık, bazı termal reaksiyonlara neden olmaktadır. Bunun sonucu olarak artifakt oluşumu, hidroliz ve izomerizasyon olayları meydana gelmektedir. *cis*-Sabinanhidrasetatın hidrodistilasyon sırasında ısı ile degradasyonu sonucu Terpinen-4-ol, α -Terpinen, γ -Terpinen, Terpinolen gibi bileşiklerin oluşması örnek olarak verilebilir (Kılıç, 2008). Beta-pinen antifungal (Matasyoh et al., 2007) ve antiinflamatuvar aktiviteli bir bileşiktir (Sayyah et al., 2002). Solanon tütün bitkisinden elde edilen ve sigara yapımında kullanılan aromatik bir bileşiktir (Leffingwell and Alford, 2005).

Yeşil mikroalg, *Scenedesmus*' un taze biyokütlesinin kokusu izoprenil asetat, caren, cedrol ve aromatik bileşikler nedeniyle oluşmaktadır (Kamburova et al., 2003). Siyanobakteri, *S. platensis* uçucu yağı GK/KS analizleriyle % 96,45 tanımlanmış ve içerisinde heptadekan (39.70%) ve tetradekan (34.61%) gibi hidrokarbonlar gibi major bileşenlerle beraber 15 bileşik tespit edilmiştir (Ozdemir et al., 2004).

Antimikrobiyal aktivite

Pek çok antibiyotiğe karşı kazanılan direnç nedeniyle yeni antimikrobiyal etkili bileşiklerin keşfi giderek önem kazanmaktadır

(Kreitlow et al., 1999). Çoğunlukla yüksek bitkilerle (Gamboe et al., 2008, Adegoke and Adebayo-tayo, 2009), makroalglerle yapılan çalışmalarda (Karabay-Yavasoglu et al., 2007b; Patra et al., 2008; Tüney et al., 2006) ve daha az olarak da mikroalg ve siyanobakteri örneklerinde yapılan araştırmalarda antimikrobiyal aktivite varlığına rastlanmaktadır (Demirel, 2006; Katircioglu et al., 2006; Ozdemir et al., 2004).

Almanya’ da yapılan bir çalışmada *Oscillatoria redekei* HUB 051’in hekzan ekstresinden izole edilen yağ asitleri; α -dimorfe kolikasit, koriolik asit ve α -linoleik asit, Gram pozitif test organizmaları (*B. subtilis*, *Micrococcus flavus*, *S. aureus*) inhibe etmiştir (Mundt et al., 2003). Norveç’ te, beş siyanobakteri türünün metanol ve su ekstrelerinin antibakteriyal aktiviteleri araştırılmış ve metanol ekstrelerinin aktivitelerinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca Gram pozitif bakterilere karşı daha yüksek aktivite gözlenmiştir. Antibakteriyal bileşiklerin çözünürlükleri ekstraksiyonda kullanılan zgene göre değişmektedir. Denemenin yapıldığı besiyerlerinin pH’ sı da ekstraktların oluşturduğu inhibisyon zon çaplarını etkilemektedir (Ostensvik et al., 1998).

İran’ ın genellikle kuzey kesimlerindeki topraklardan izole edilen 76 siyanobakteri suşu laboratuvar koşullarında kültüre alınmış, petrol eteri, metanol ve sulu ekstrelerinde antimikrobiyal etki araştırılmış ve 17 suşta aktivite gözlenmiştir. Aktif maddelerin farklı polaritede olması nedeniyle tüm ekstre türlerinde aktivite gözlenmiştir, fakat metanol ekstrelerinin daha yüksek aktiviteye sahip olduğu grlmştir. Ekstreler, ayrıca Gram-pozitif bakterilere (*S. epidermidis* PTCC 1114, *B. subtilis*

PTCC 1204) Gram-negatif olanlara (*E. coli* PTCC 1047, *S. typhii* PTCC 1108) göre daha etkili bulunmuştur (Soltani et al., 2005). Benzer bir çalışmada Gram-pozitif bakterilerin (*S. epidermidis* PTCC 1114, *S. aureus* Rosenbach PTCC 1112, *S. haemolyticus* Schleifer & Kloos ATCC 29970) Gram-negatif olanlara (*Shigella sonnei* (Levine) Weldin PTCC 1325, *E. coli* PTCC 1047, *P. vulgaris* Hauser PTCC 1312) göre daha duyarlı olduğu belirtilmektedir (Ghasemi et al., 2003).

Almanya’da yapılan bir çalışmada, 12 siyanobakteri izolatının hekzan, diklorometan, metanol ve su ekstralarının antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Tüm örneklerin ekstraları en az bir Gram pozitif test organizmanın (*Micrococcus flavus*, *S. aureus*, *B. Subtilis*) üremesini inhibe etmiştir. Özellikle hekzan ve diklorometan ekstraları antimikrobiyal etki göstermiş, sadece bir su ekstresi *S. aureus*’a aktif bulunmuştur (Kreitlow et al., 1999). Benzer olarak yapılan bir diğer çalışmada 35 siyanobakteri izolatının antibakteriyal etkisi su, metanol ve hekzan ekstralarında araştırılmış ve özellikle lipofilik ekstralar tarafından Gram pozitif bakterilerin inhibe edildiği gözlenmiş, su ekstralarının ise etkisiz olduğu görülmüştür (Mundt et al., 2001).

Mısır’ da, büyümelerinin durağan fazında ortamdan alınan *Oscillatoria angustissima* ve *Calothrix parietina*’nın etil asetat ekstralarından elde edilen antibiyotik etkili bileşikler Gram pozitif *B. cereus* ve *S. aureus* bakterilerini, Gram negatif olanlara göre daha fazla oranda inhibe ettiği gözlenmiştir, ayrıca bu bileşiklerin antifungal etkileri de görülmüştür (Issa, 1999).

Türkiye’ de yapılan bir çalışmada Mogan ve Burdur Gölleri, Kurtboğazı Barajı ve şeker rafinerisinin atık sularından izole edilen Mikroalgler, BG11 ortamında, 3000 lux’dan az ışık yoğunluğunda, 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlıkta inkübe edilmiş ve yaklaşık 15 günlük üretim periyodunun sonunda hasat edilmiştir. Aseton ve eter ekstreleri Gram-negatif, metanol ekstreleri Gram-pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Etanol ekstreleri ise hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Kloroform ekstresi antimikrobiyal aktivite göstermemiştir. *Oscillatoria* sp. ve *Chroococcus* sp. mayalara karşı antifungal aktivite göstermiştir. *Oscillatoria* sp. (Mogan) metanol ekstresi, *S. cerevisiae* and *S. cerevisiae* 2SI TP (3-2)’ ye karşı antifungal etkili bulunmuştur (Katircioglu et al., 2006).

Ozdemir ve arkadaşları (2004), *Spirulina platensis*’ in metanol, diklorometan, petrol eteri, etil asetat ekstreleri ve uçucu bileşenlerin *in vitro* antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmış ve metanol ekstrelerinin daha iyi antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu gözlemlemiştir. Ördög ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2004), *Desmococcus*, *Chlorella* ve *Scenedesmus* türlerinin su ve metanol ekstrelerinin Gram pozitif bakterilerden *S. aureus* ve *E. faecalis* ile Gram negatif bakterilerden *E. coli* ve *P. aeruginosa* üzerine güçlü antimikrobiyal etkilerinin olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada gözlenen Gram negatif etkinin tersine genellikle antibiyotiklerin Gram negatif bakterilere karmaşık çeper yapıları veya üzerilerindeki polisakkarit kapsül nedeniyle penetre olamaması nedeniyle etki etmediği üzerinde durulmaktadır. Ancak bizim çalışmamızda da *Chlorella* sp. ve *O. amphibia* çözgen ekstrelerinin hem

Gram pozitif hem de Gram negatif test organizmalarına etki ettiği görülmektedir.

Bu çalışmada *Chlorella* sp. ile yapılan disk difüzyon testinde tüm ekstrelerin özellikle Gram pozitif mikroorganizmalara olan etkisi gözlenmiştir ve en büyük zon çapı *S. aureus* ATCC 6538-p için 2mg/disk konsantrasyonda 11 mm' dir. Mikrodilüsyon testlerinde hem Gram negatif hem de Gram pozitif organizmalara olan etkilerinden (tüm ekstreler beraber değerlendirildiğinde MİK aralığı 250-2000 µg/mL) söz etmek mümkündür. *O. amphibia*' nın çözgen ekstrelerinin disk difüzyon testinde sadece hekzan ekstresi hem Gram negatif (*P. vulgaris* ATCC, 2mg/disk, 20 mm), hem de Gram pozitif organizmalara (Metisilin oksasilin dirençli *S. aureus* ATCC 43300, 2mg/disk, 21 mm) etkili bulunmuştur. Mikrodilüsyon testlerinde hem Gram negatif hem de Gram pozitif organizmalara tüm ekstrelerin farklı oranlarda etki ettiği görülmüştür(tüm ekstreler beraber değerlendirildiğinde MİK aralığı 250-2000 µg/mL).

Antioksidan aktivite

Günümüzde, lipid oksidasyonu inhibe eden maddeler, bitkisel materyallerden, gıda artıklarından, mikroorganizmalardan ve hayvan hücrelerinden elde edilebilmektedirler (Gülçin et al., 2004). Bazı algler doğal antioksidan etkili bileşiklerin zengin kaynakları olarak değerlendirilmektedir. Bu konuda makroalgelere yoğun bir ilgi olduğu halde (Patra et al., 2008; Yılmaz Koz et al., 2009), mikroalglerin antioksidan aktiviteleriyle ilgili sınırlı sayıda bilgi bulunmaktadır (Li et al., 2007).

Oksidatif stres kanserden kardiyovasküler ve dejeneratif hastalığa kadar pek çok hastalığın oluşumunda önemli bir faktördür. Vücudu oksidatif stresin zararlarından korumak için antioksidan besinlerden yararlanmak etkili bir yaklaşımdır (Benedetti et al.,2004; Li et al., 2007). Son yapılan çalışmalarda çok sayıda bitkinin flavanoid ve tanninler gibi polifenolik bileşikler sentezlediği gösterilmiştir. Bu doğal antioksidanlar genellikle moleküler yapılarında fenolik bir halka içerirler. Fenolik antioksidanlar, potansiyel serbest radikal sonlandırıcılarıdır ve lipid oksidasyonunu ilk basamakta inhibe ederler. Fenolik hidroksil grupların aktiviteden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Gülçin et al., 2004).

Farklı çözümlerle ekstrakte edilen bileşikler çözgen polaritesine bağlı olarak farklı antioksidan aktivite potansiyeli göstermektedirler (Ismail and Hong, 2002). Daha önceki yayınlarda da belirtilmiş olduğu gibi antioksidan aktivitenin araştırılmasında farklı metotların kullanılması gerekmektedir. Metotların kombinasyonu aktivitenin doğru değerlendirilmesi için önemlidir (Kulisic et al., 2004; Marxen et al, 2007; Rodriguez-Garcia and Guil-Guerrero, 2008). Karotenoidler ve yağ asitleri önemli pek çok mikroalgde bulunan antioksidan bileşiklerdir ve girişim yapmaları nedeniyle farklı antioksidan denemelerde farklı sonuçlara neden olabilmektedir (Marxen et al, 2007). β -karoten metodu lipofilik antioksidan bileşiklerin ve uçucu yağların antioksidan aktivitelerinin araştırılması için uygun bir metoddur. Ancak polar bileşikler içeren ekstreler sadece β -karoten metodu ile araştırılacak olursa zayıf antioksidan etkiliymiş gibi değerlendirilebilirler. DPPH metodu β -karoten metoduna göre daha hızlı bir yöntemdir. Duyarlı ve küçük oranda materyal gerektiren bir metoddur, lipofilik ve hidrofilik antioksidan

bileşiklere duyarlıdır (Kulisic et al., 2004; Yilmaz Koz et al., 2009). Antioksidan aktivite ile fenolik bileşik miktarının birbiriyle orantılı olduğu pek çok yayında ifade edilmektedir (Sreenivasan et al., 2007; Yilmaz Koz et al., 2009). Genellikle ABTS metodu ile total fenolik bileşiklerin oranı arasında ise bir korelasyon gözlenmektedir (Miliauskas et al., 2004) .

Fenolik bileşikler prensip olarak pek çok sebze, meyve ve tıbbi bitkilerde antioksidan etkili bileşikler olarak bilinmelerine rağmen (Adedapo, 2009; Ercisli et al., 2008; Li et al., 2007), bu ilişkinin mikroalglerde daha zayıf olduğu 21 mikroalgle yapılan bir çalışmada, ABTS metodu ile araştırılan antioksidan aktivite ile Folin reaktifıyla araştırılan fenolik bileşiklerin oranı arasında bir korelasyonun bulunmaması sonucuna bakılarak tespit edilmiştir (Li et al., 2007). Çalışmamızda ise hem *Chlorella* sp. hem de *O. amphibia* ekstrelerinde, ABTS metodu sonuçlarına bakılarak belirlenen antioksidan aktivite ile fenol miktarı arasında bir ilişki olduğu gözlenmiştir. Fenolik bileşiklerin miktarı ve ABTS metoduna göre ekstrelerin % aktivitesi benzer şekilde sıralanmaktadır.

Rodriguez-Garcia ve Guil-Guerrero (2008), *Porphyridium cruentum*, *Phaeodactylum tricornutum* ve *Chlorella vulgaris*' in etanolik ekstrelerinde β -karoten renk açılması deneyi ile antioksidan aktivite araştırmışlar ve ekstrelerin GK/KS analiz sonuçlarına göre, en yüksek aktivite yüksek oranda PUFA içerdiği için *Chlorella vulgaris* ekstresinde tespit edilmiştir.

Chlorella stigmatophora ve *Phaeodactylum tricornutum* sulu ekstrelerinin antioksidan aktiviteleri, 1 mg/mL dozda, deoksiriboz degradasyonunun inhibisyonu yöntemi ile değerlendirilmiş, sırasıyla % 78 ve %73 oranında etkili bulunmuştur (Guzman et al., 2001). *Porphyridium*'un suda çözünen polisakkarit çeper yapısındaki glikoproteinler nedeniyle antioksidan aktivite gösterdiği, gerektiğinde ortama yayılarak antioksidan etki sağladığı ve hücreleri oksidatif hasardan koruduğu düşünülmektedir (Tannin-Spitz et al., 2005).

Malezya'da yapılan bir çalışmada çeşitli alg örneklerinin (*Porphyra* sp., *Laminaria* sp., *Undaria* sp., *Hijikia* sp.) su ve etanol ekstrelerinde β -karoten renk açılması ve DPPH radikal süpürme aktiviteleri araştırılmıştır. Örneklerin antioksidan özellikleri ekstraksiyonda kullanılan çözünenin polaritesine ve test için uygulanan yöntemlere göre farklılıklar göstermektedir. Örneklerde su ile sürüklenen antioksidan bileşiklerin yoğun olması nedeniyle, su ekstrelerinde % antioksidan aktivite değerlerinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ayrıca ekstraksiyonda kullanılan çözünenin türü pH'yı da etkilediğinden farklı ekstrelerin farklı radikal süpürme aktiviteleri gözlenmektedir. Örneklerin antioksidan aktiviteleri ticari antioksidanlara kıyasla oldukça düşük bulunmuştur, ancak potansiyel yararları nedeniyle ileride değerlendirilebileceği öngörülmektedir (Ismail and Hong, 2002).

Çalışmamızda da benzer olarak *Chlorella* sp.'nin diğer çözünenlere göre daha polar olan metanol veya etanol çözünenleriyle elde edilmiş ekstrelerinin, üç antioksidan aktivite testinde de genellikle en yüksek aktiviteyi gösterdiği görülmüştür. Ayrıca metanol ve etanol ekstreleri

fenol bakımından da en zengin olanlardır. *O. amphibia*' da ise farklı olarak metanol ve etanol ekstraheleri düşük antioksidan aktiviteye ve fenol oranına sahip olan örneklerdir. Kloroform ekstresi ise hem fenol bakımından zengin, hem de testlerde genellikle en yüksek antioksidan aktivite gösteren ekstre örneğidir. Sadece *O. amphibia*' nın hekzan ekstresi DPPH metodunda en yüksek aktiviteyi göstermekte ve hemen ardından kloroform ekstresi ile sıralama devam etmektedir. Kloroform, metanol ve etanol çözümlerine göre daha apolardır. Apolar çözümler, polifenollerin sudan ekstrakte etmek için en uygun olanlardır (Ismail and Hong, 2002).

Çalışmalarda, geniş spektrumlu antioksidanların sinerjistik etkisinin tek başına bir antioksidanından daha iyi olduğu ve doğal kaynaklardan sağlananların daha yüksek biyoyararlanıma sahip olduğu, bu nedenle de sentetik olanlara göre daha yüksek koruyucu etkinliğinin olduğu ispatlanmıştır (Benedetti et al., 2004). Organik asitler, karotenoidler, protein hidrolizatları ve tanninler, fenolik bileşiklerle kullanıldığında antioksidan veya sinerjistik etkileri olan bileşiklerdir (Gülçin et al., 2004). Bizim örneklerimizden elde edilen ekstrahelerin aktivitesi ticari antioksidanlara oranla çok yüksek değildir. Ekstrelerin içeriğindeki antioksidan bileşiklerin oranına bağlı olarak ekstre miktarı artırıldığında antioksidan etki de artmaktadır. Bu bileşiklerin ancak saf olarak elde edildiğinde en az saf ticari antioksidanlar kadar etkili olabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak buradaki ekstrahelerin içeriğinde antioksidan bileşiklerle beraber bulunan ve bunların aktivitesini arttıran sinerjistik etkili bileşiklerden söz etmemiz mümkün değildir.

Analjezik ve antiinflamatuvar aktivite

Antinosiseptif etkinin araştırılmasında etkili bir yol olan formalin testinde bifazik yanıt oluşmaktadır. Erken fazın nosiseptif afferent liflerin doğrudan kimyasal aktivasyonu sonucu oluştuğu ve periferik inflamatuvar proseslerin de geç fazdan sorumlu olduğu düşünülmektedir (Oyadeyi et al., 2007; Oyemitan et al., 2008; Tjolsen et al., 1992). Çalışmamızda kullandığımız *Chlorella sp.* ve *O. amphibia* ekstreleri 25-50 ve 100 mg/kg dozlarda oldukça iyi analjezik aktiviteye sahiptir. Ayrıca formalin testinin 2. fazında da gösterdikleri inhibisyon nedeniyle potansiyel antiinflamatuvar etkilerinden söz edilebilir. Özellikle aseton ve kloroform ekstreleri hem akut fazda hem de inflamatuvar 2. fazda kontrole göre önemli miktarda inhibisyon sağlamıştır. *O. amphibia* ekstreleri ise daha çok 2. faza etki etmiştir ve sadece diklorometan ekstresinin her iki faza da etkili olduğu gözlenmiştir. Sonuçlar negatif kontrol grubu ve pozitif kontrol olan 10 mg/kg morfinle karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Brezilya kıyılarından toplanan kırmızı alg *Bryothamnion seaforthii*'den elde edilen lektin ve karbonhidrat fraksiyonlarında farelerde yapılan writhing, formalin ve hot-plate testleri ile analjezik aktivite araştırılmıştır. Hem i.p. hem oral uygulamada doza bağlı olarak potansiyel antinosiseptif aktivite gözlenmiştir. Ayrıca lektin ve karbonhidrat fraksiyonu formalin testinde 2. faz üzerine yani inflamatuvar ağrıya etki etmiştir (Vieira et al., 2004).

Guzman et al., (2001) *Chlorella stigmatophora* ve *Phaeodactylum tricornutum*'dan sokslet ekstraktöründe elde edilmiş diklorometan ve

metanol ekstrelerinde analjezik ve antiinflamatuvar etki ile radikal süpürme aktivitesini araştırmışlardır. Antiinflamatuvar aktivite ratlarda pençe ödemi testi ile, analjezik aktivite ise farelerde writhing testi ve hot-plate testleri ile araştırılmıştır. Her iki algin diklorometan ekstresi ratlarda karragen ile indüklenmiş inflamasyonu belirgin olarak azaltmıştır. *C. stigmatophora* 250 mg/kg dozda % 90, *P. Tricornutum* % 87 oranında etki görülmüştür. Bu değerler saf sentetik bir antiinflamatuvar ile karşılaştırıldığında kabul edilebilir düzeydedir. Metanol ekstreleri ise en yüksek konsantrasyonda bile antiinflamatuvar etki göstermemiştir. Ekstreler writhing testine göre düşük analjezik aktiviteli bulunmuş, hot-plate testine göre ise hiç analjezik aktiviteye sahip olmadığı görülmüştür.

Toksisite

Farklı bileşiklerin çok toksik, toksik, az toksik yada sadece açıkça toksik olarak sınıflandırılan farklı toksisite düzeyleri bulunmaktadır. İlaç olarak kullanılacak ekstrenin toksisite profilinin belirlenmesi güvenilirliğinin saptanması açısından önemlidir. Median letal doz (LD50) hayvan popülasyonunun % 50'sini öldüren dozdur ve güvenilirliği garanti edemez. Ancak, mutajenite ve karsinojenite testleri sub-kronik, kronik, reproduktif, gelişimsel ve genetik toksisite çalışmalarında, enzimlerin ilaç metabolizmasına etkileri ve toksikokinetik profilin belirlenmesi gibi konularda toksikolojik çalışmalar için doz aralığının seçimine yardımcı olmaktadır (Nwinyi et al., 2009).

Farmakolojik etkili bitki ekstreleri sıkça toksisite bakımından da değerlendirilmektedir (Danjuma, 2009; Nwinyi et al., 2009). Benzer yöntemlerle çalışmamızda *Chlorella* sp. ve *O. amphibia* çözgen ekstrelerinin toksisiteleri 2000 mg/kg dozda intraperitoneal enjeksiyonla farelere verilerek araştırılmıştır. Başlangıçta 2 fareye en yüksek doz uygulanarak limit test uygulanmış, 24 saat sonunda hayatta kalış ve ölüm oranına göre toksik olup olmadığına karar verilmiş ve toksik olanlar için farelerle alt dozların denendiği gruplar oluşturularak LD₉₀, LD₅₀ ve LD₁₀ değerleri belirlenmiştir. *Chlorella* sp. ekstrelerinde hiç toksik aktivite gözlenmezken, *O. amphibia*'nın etanol ekstresi toksik etkili bulunmuş ve LD₉₀ = 1120 µg/mL, LD₅₀ = 840 µg/mL ve LD₁₀ = 561 µg/mL olarak saptanmıştır. Bu değerler, farmakolojik aktivite gösteren dozların çok üstünde olduğundan, ilaç olarak kullanımı sırasında toksisite gözardı edilebilir, ancak izlenmesi gereklidir. Ayrıca ekstrede toksik etkili bileşiklerin izolasyonunun yapılması ve etkili olduğu organlar ile kimyasal ve farmakokinetik özellikleri bakımından incelenmesi de yararlı olacaktır.

Bilinen en önemli fikotoksinler; siklik peptidler, alkaloidler, polieterler ve glikolipidlerdir (Skulberg, 2000). Çok sayıda siyanobakteri metaboliti toksik veya farmakolojik olarak aktiftir. Çin'de Dianchi Gölü'nde ötrofikasyonda baskın hale geçen *Oscillatoria agardhii*'den tripsin inhibitörü bileşik 'oscillapeptin D' elde edilmiştir. Ayrıca nörotoksik biyoaktif siklik bileşikler ve siklik heptapeptid yapıda mikrosistin isimli hepatotoksin üretmektedir (Sano et al., 1998). Mısır'da *O. angustissima* ve *C. parietina* isimli siyanobakterilerden durağan fazda

izole edilen antibiyotik etkili bileşiklerin toksik olmadığı, farelere 5 mg dozda ip enjeksiyonla verilerek test edilmiştir (Issa, 1999).

Mikrosistinle kontamine olmuş suların tüketimi sonucunda buna bağlı olarak karaciğer hasarı ve ölümler görülmektedir. Brezilya’ da siyanobakteri patlaması sonrasında toplanan örneklerden elde edilen biyokütlenin *Swiss albino* farelerin karaciğerinde yaptığı histolojik değişimi izlemek üzere yapılan denemede akut toksisite testinin sonucuna göre LD₅₀=297,30 mg/kg (24h) olarak bulunmuştur. Oral kronik toksisite testinde ise siyanotoksinler 0,5 mg/kg; 1,0 mg/kg ve 2,0 mg/kg olmak üzere üç dozda ve 7 gün boyunca içme sularına karıştırılarak uygulanmıştır. Süre sonunda ölüm ve histolojik olarak herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Aynı dozlar aynı süre kullanıldığında böbrekler üzerinde de histolojik bir değişime neden olmamıştır Uygulanan dozlar yüksek olduğu halde deneme süresinin yeterli olmadığı ve ekstre içerisindeki mikrosistin düzeyinin hasar oluşturacak kadar yüksek olmadığı için denemenin böyle sonuçlandığının tahmin edildiği belirtilmektedir (Carvalho et al., 2007).

Hücre kültürleri kullanılarak ilaç çeşitli örneklerin toksik etkileri, vücutta nasıl metabolize oldukları, buna bağlı olarak aynı örneğe verilen bireysel yanıtların değişkenlik mekanizmaları araştırılabilir. Ancak *in vitro* testlerin yine de sistemik toksisiteyi araştırmakta yetersiz kalabileceği, bu nedenle *in vitro* testlerin ancak *in vivo* testler için bir ön tarama testi olarak kabul edilmesi gerektiği şeklinde tartışmalar sürmektedir (Saygı, 2003).

6 ÖNERİLER

Türkiye'nin, coğrafi konumu, jeolojik ve jeomorfolojik yapısıyla değişik anakara tiplerine sahip olması ve farklı iklim kuşaklarının etkisi altında bulunması nedeniyle flora ve fauna bakımından çeşitliliği, ülkemizin sahip olduğu yeraltı kaynakları yada tarihi eserler gibi önemli doğal zenginlikleri arasında yer almaktadır. Çeşitli türler doğada girift olarak birbirleriyle etkileşim halindedir ve bizim de içerisinde yer aldığımız ekolojik sistemin sağlıklı bir şekilde devamlılığını sağlarlar. Ayrıca doğada büyük öneme sahip olan ve sayıları onbinlerle ifade edilen mikroorganizmalar ile çeşitlilikleri bakımından dikkat çeken deniz organizmaları ise son 20-30 yılda yoğun bir şekilde araştırılan çok zengin doğal kaynaklar arasındadır. Biyolojik zenginliğin ekonomik açıdan da avantajlarından söz edilmektedir. Yerel çeşitler ve yabancı türler ekonomik değeri olan bitki ve hayvanların gen rezervi olarak değerlendirilebilmektedir.

Daha çok ülkemiz topraklarında geniş bir yayılım gösteren bitkisel kaynaklarla yürütülen farmakolojik aktivite çalışmalarına, doğadan izole edildikten sonra çeşitli biyoteknolojik yöntemlerin de katkısıyla laboratuvar koşullarında üretilebilen mikroalg ve siyanobakteri türlerinde yapılacak olan denemelerle yeni bir boyut kazandırılması düşünülmektedir. Uzak Doğu Ülkeleri, Amerika, Almanya, İsrail gibi ülkelerde uzun yıllardır yürütülen bu tip çalışmalara ülkemizde de gereken önemin verilmesiyle bilimsel alanda ileri düzeyde bir yer edinebilmemiz mümkün olacaktır. Ülkemizde hastaların yeni orijinal

ilaçlara ve tedavi yöntemlerine daha kolay erişebilmesine, ilaç araştırma ve geliştirme faaliyetlerinde alınan sonuçların, hızlı bir şekilde tedavi bekleyen hastalarımıza ulaştırılmasına, insan yaşamını uzatmaya ve yaşam kalitesini artırmaya katkı sağlamak mümkün olacaktır.

Tez çalışmamızda, “İçsulara bulunan bazı mikroalglerin kültür koleksiyonu (YDABAG101Y05)” başlıklı tamamlanmış TÜBİTAK projesi kapsamında ülkemizin göllerinden izole edilen yeşil mikroalg, *Chlorella* sp (Salda Göl’ ü; CC-1) ve siyanobakteri, *Oscillatoria amphibia* (Acı Göl CC-14)’ nın bazı farmakolojik aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır. Kaynak olarak kullanılan kültür koleksiyonu türlerin tanısının sadece morfolojik olarak yapılması ile oluşturulmuştur. Bu nedenle seçilen türlerin tanımlarının genetik olarak da doğrulanması çalışmanın güvenilirliğini arttıracığından oldukça önemlidir.

Chlorella sp. ve *O. amphibia*’ nın öncelikle belirtilen kültür koleksiyonu projesinde önerilmiş olan optimum koşullarda üretimi yapılmış ve büyümelerinin durağan fazının sonunda hasat edilen hücreler liyofilize edilip toz haline getirildikten sonra Sokslet ekstraktöründe aseton, kloroform, etanol, hekzan, diklorometan, metanol organik çözügen ekstreleri, Klevenger cihazında hidrodistilasyonla uçucu yağ ekstreleri hazırlanmıştır. Böyle çalışmalar için daha az zaman ve çözügenin kullanıldığı katı faz mikroekstraksiyon, süperkritik-sıvı ekstraksiyonu, basınçlı-sıvı ekstraksiyonu, mikrodalga eşliğinde ekstraksiyon, sürtaktan aracılı ekstraksiyon gibi yeni ekstraksiyon metodları denenmelidir.

Uçucu yağların bileşenlerinde sadece Gaz Kromatografi/Kütle Spektrometresi (GK/KS) analizleriyle araştırılmıştır. Elde edilen miktarın çok az olması nedeniyle daha çok biyokütleyle ihtiyaç vardır. Üretimin daha büyük çapta yapılması ve kullanılan teknolojinin geliştirilmesi istenen miktarda biyokütleyle ulaşmayı kolaylaştıracaktır. Oldukça iyi aktivite gösteren çözgen ekstrelerinde ise kimyasal içerik olarak bir tanımlama yapılamamıştır. Kimyasal bileşenlerin tanımlanması ve saflaştırılması için Gaz Kromatografi/Kütle Spektrometresi (GK/KS) analizleri ve diğer kromatografik analiz yöntemlerinin kullanılmasına ihtiyaç vardır.

Çözgen ekstrelerinin antioksidan özellikleri 2,2-difenil-2-pikrilhidrazil hidrat (DPPH) radikal süpürme, 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikal katyon dekolizasyon ve β karoten renk açılması metotları ile araştırılmıştır. Ayrıca total fenolik bileşiklerin miktarı Folin-Ciocalteu reaktifi ile gallik asit standart eğrisine göre belirlenmiştir. Bu yöntemler bazı antioksidanların tespit edilmesinde yetersiz kalmakta, bazıları ise oldukça uzun zaman gerektirmektedir. Süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimlerin de tespit edilmesine imkan sağlayan hazır kitler ve yeni ölçüm yöntemleri belirlenen aktivitenin güvenilirliğini sağlayabilecek ve daha çok örneği daha kısa sürede ve daha az madde kullanarak tespit etme imkanı sağlayabilecektir.

Antimikrobiyal etki çözgen ekstrelerinde disk diffüzyon ve mikrodilüsyon metotları ile standart antibiyotiklerle karşılaştırılarak araştırılmıştır. Bu denemelerde önceki yıllarda yazılmış olan yayınlar ve

kitaplarda yer alan kriterler kullanılmıştır. NCCLS kriterlerine dayalı olarak denemeler tekrarlanıp karşılaştırılabilir, yeni yöntemler denenebilir.

Çözgen ekstrelerinin analjezik ve antiinflamatuvar aktiviteleri ile akut toksisiteyi Swiss albino farelerde araştırılmıştır. Analjezik ve antiinflamatuvar etkinin araştırılmasında formalin testi oldukça iyi bir ön deneme gibi düşünülebilir. Analjezik aktivitenin tam olarak tespit edilmesi için yine farelerde “tail-flick, hot plate ve writhing testi” gibi uygulanan ilave testlere de ihtiyaç duyulabilmektedir. Ayrıca formalin testinin ikinci fazında belirlenen antiinflamatuvar aktivite sıçanlarda pençe ödem testi gibi yöntemlerle ya da hücre kültürü üzerinde yapılan denemelerle netleştirilebilir.

Toksisite testlerinde kullandığımız limit test metodu bir maddenin toksik olup olmadığı ile ilgili yapılan en pratik ve en az hayvan gerektiren bir methodur. Ancak güvenilirliğin artırılması için ilave testlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu konuda hücre kültürleri ve *Daphnia* gibi çeşitli canlılar üzerinde yapılan çalışmalar faydalı sonuçlar sağlamaktadır. Ancak kimyasalların organizmada metabolize olma yolları, etkilediği organlar ve etki metabolizmalarının da aydınlatılması gerekmektedir. Bunun için farklı hayvan türlerinde çeşitli toksisite denemeleri yapılmalı ve bu denemelerin de bireysel farklılıklar nedeniyle insanlar üzerindeki etkiyi tam olarak belirlemediği unutulmamalıdır.

İçeriğinde aktiviteyi olumlu etkileyen sinerjik etkili bileşiklerin varlığı veya ekstre dışında bileşiklerin stabilitesinin azalması ihtimali

nedeniyle ileri aşamalarda izole edilecek yeni bileşiklerin aktivitesinde kayıp görülebilir. Bu nedenle saf bileşikler elde edildiğinde burada yapılan veya benzeri denemeler yeni bileşikler üzerinde tekrarlanabilir.

Planlanan bu çalışmanın doğal kaynaklarımızın değerlendirilmesi, bu konuda çalışan araştırmacıların ve araştırmacı ilaç firmalarının teşvik edilmesi; aktif bileşik veya bileşiklerin bulunması halinde de ülke ekonomimize katkı sağlaması bakımından ayrı bir öneme sahip olduğu düşünülmektedir. Farmakolojik olarak aktif bulunan mikroalg ve siyanobakterilerin daha sonraki aşamalarda çeşitli teknolojilerle daha büyük çapta üretimleriyle ilaç halinde insanların kullanımına sunulması ile hem dünyaya hem ülkemize büyük katkılar sağlanması beklenmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adams, R.P.**, 1995, Identification of Essential Oil components by Gas Chromatography/ Mass Spectroscopy, Allured Publishing Corp. Carol Stream, Illinois USA. 469p.
- Adedapo, A. A., Jimoh, F. O., Afolayan, A. J., Masika, P. J.**, 2009, Antioxidant properties of the methanol extracts of the leaves and stems of *Celtis africana*, *Records of Natural Products*, 3(1):23-31.
- Adegoke, A. A., Adebayo-tayo, B. C.**, 2009, Antibacterial activity and phytochemical analysis of leaf extracts of *Lasienthera africanum*, *African Journal of Biotechnology*, 8(1):77-80.
- Akbaba, G.**, 2003, Biyoteknolojide mikroalgler, *Bilim ve Teknik Dergisi*, 8:28-30.
- Arrigoni-Blanka, M. F., Antoniollib, A.R., Caetanoc, L.C., Camposd D.A., Blankd, A.F., Alvese, P.B.**, 2008, Antinociceptive activity of the volatile oils of *Hyptis pectinata* L. Poit. (Lamiaceae) genotypes, *Phytomedicine*, 15:334-339.
- Aysel, V., Erduğan, H., Türker, E., Aysel, F., Gönüz, A.**, 2001, Laka Deresi'nin (Bornova, İzmir, Türkiye) makro ve mikro algleri, *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 18(3-4):307-317.
- Becker, E. W.**, 1995. Microalgae-Biotechnology and Microbiology. Cambridge Univ.Press, U.K., 293p.

KAYNAKLAR (devam)

- Benedetti, S., Benvenuti, F., Pagliarani, S., Francogli, S., Scoglio, S., Canestrari, F.,** 2004, Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*, *Life Sciences*, 75 (19):2353-2362.
- Bergé, J. P., Debiton, E., Dumay, J., Durand, P., Barthomeuf, C.,** 2002, In vitro anti-inflammatory and anti-proliferative activity of sulfolipids from the red alga *Porphyridium cruentum*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6227–6232.
- Bérdy, J.,** 2005, Bioactive microbial metabolites, a personal view, *The Journal of Antibiotics* , 58(1):1-26.
- Bloor, S., Englan, R. R.,** 1991, Elucidation and optimization of the medium constituents controlling antibiotic production by the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 13: 76-81.
- Borowitzka, M. A.** 1992a, Vitamins and Fine Chemicals from Microalgae, 153-196, Micro-algal Biotechnology, Borowitzka, M. A. and Borowitzka L. J. (Eds.), Cambridge University Pres, New York, U. S. A., 477p.
- Borowitzka, M. A.,** 1992b, Fats, oils and Hydrocarbons, 257-287, Micro-algal Biotechnology, Borowitzka, M. A. and Borowitzka L. J. (Eds.), Cambridge University Pres, New York, U. S. A., 477p.

KAYNAKLAR (devam)

- Borowitzka, M. A.** 1997, Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology*, 9:393-401.
- Borowitzka, M. A.** 1999, Pharmaceuticals and agrochemicals from microalgae, 313-352. *Chemicals From Microalgae*, Cohen, Z. (Eds.), Taylor & Francis Ltd., U. K., 419p.
- Boussiba, S., Vonshak, A., Torzillo, G.** 2004, Applied Course on Production and Monitoring of Algal Growth, Ebiltem Yayınlar, İzmir, 82p.
- Bradshaw, L. J.**, 1992, Laboratory Microbiology. Fourth edition, Emeritus California State University, Fullerton, Saunders College Publishing: New York, USA, 435p.
- Carvalho, E. G., Sotero-Santos, R. B., Martinez, C. B. R., Freitas, E. C., Fenerich-Verani, N., Dellamano-Oliveira, M. J., Rocha, O.**, 2007. Kidney Histology of Mice After Seven Days Oral Intake of Cyanobacterial Extract. *Journal of Brazillian Society Ecotoxicology*, 2(1):39-43.
- Carvalho, J. C., Sertie, J. A., Barbosa, M. V., Patricio, K. C., Caputo, L. R., Sarti, S. J., Ferreira, L. P., Bastos, J. K.**, 1999. Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. *Journal of Ethnopharmacol.* 64:127-133.
- Ceylan, A.**, 1996, Tıbbi bitkiler (Uçucu yağ bitkileri), Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayını, 2. baskı, İzmir, 306s.

KAYNAKLAR (devam)

- Cirik, S., ve Gökpınar, Ş.**, 1999, Plankton Bilgisi ve Kültürü, Ege Üniversitesi Yayınları, 2. baskı, İzmir, 274s.
- Collins, C. M., Lyne, P. M.**, 1987. Microbiological Methods. Butterworths and Co. Ltd. London, 316 p.
- Conk Dalay, M.**, 2002, *Arthrospira maxima* (= *Spirulina maxima* (Stiz.) Geitl., 1930) Acı Lake Strain, *E. Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 19:241-245.
- Çıngı, F.**, 2003, Fotosentezik Uygun Radyasyon, <http://www.akvaryum.com>.
- Danjuma, N. M.**, 2009, Central nervous system depressant effect of the hydroalcoholic extracts of leaves, stem and root barks of *Randia Nilotica* Stapf. (Rubiaceae), *European Journal of Scientific Research*, 25(3):353-361.
- Del-Vechio-Vieira, G., Sousa, O. V., Yamamoto, C. H., Kaplan, M. A. C.**, 2009, Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *ageratum fastigiatum* (Asteraceae), *Records of Natural Products*, 3:(1)52-57.
- Demirel, Z.**, 2006, Eğirdir Gölü' nden İzole Edilen Yeşil Mikroalg (Chlorophyta) *Scenedesmus protuberans* Fris.'in Antimikrobiyal ve Antioksidan Özelliğinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, E.Ü. Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, 145s (yayımlanmamış).

KAYNAKLAR (devam)

- Demo, M., Oliva, M. M., Lopez, M. L., Zunino, M. P., Zyggcollo, J. A.,** 2005, Antimicrobial Activity of Essential Oils Obtained from Aromatic Plants of Argentina. *Pharmaceutical Biology*, 43: 129-134.
- Djilani, A., Legseir, B., Soulimani, R., Dickob, A., Younos C.,** 2006, New extraction technique for alkaloids, *Journal of Brazillian Chemical Society*, 17(3):518-520.
- Dubuisson, D. and Dennis S. G.,** 1977, The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats, *Pain*, 4:161-174.
- Dökmeci, İ.,** 2000, Farmakoloji Temel Kavramlar, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 1136s.
- Edirne, S.,** 2007, Ağrı ve Analjezikler, Türk Eczacılar Birliği Yayınları, Fersa Matbaacılık, Ankara, 171s.
- Ercisli, S., Orhan, E., Ozdemir, O., Sengul, M., Gungor, N.,** 2008, Seasonal variation of total phenolic, antioxidant activity, plant nutritional elements, and fatty acids in tea leaves (Camellia sinensis var. sinensis clone Derpazari 7) Grown in Turkey, *Pharmaceutical Biology*, 46(10-11):683-687.
- European Pharmacopoeia,** 1975, Maissonneuve SA., Sainte-Ruffine, France.

KAYNAKLAR (devam)

- Everest, A., Moore, J., Cormaci, M., Aysel, V.,** 1997, Some of the macroscopic algae from İskenderun Bay in Turkish Mediterranean coast. *OT Sistematik Botanik Dergisi*, 4 : 97-104.
- Fabregas, J., García, D., Fernandez-Alonso, M., Rocha, A. I., Gómez-Puertas, P., Escribano, J. M., Otero, A., Coll, J. M.,** 1999, *In vitro* inhibition of the replication of *Haemorrhagic septicaemia* virus (VHSV) and *African swine fever* virus (ASFV) by extracts from marine microalgae, *Antiviral Research*, 44:67–73.
- Fisch, S. A., Codd, G. A.,** 1994, Bioactive Compound Production by Thermophilic and Thermotolerant Cyanobacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10: 338-341.
- Ghasemi, Y., Tabatabai Yazdi, M., Shokravi Sh., Soltani, N., Zarrini, G.,** 2003, Antifungal and antibacterial activity of paddy-fields cyanobacteria from the north of Iran, *Journal of Science I R Iran*, 14:203-209.
- Gamboe, R. W., Chavez, P., Baker, W. P.,** 2008, Antimicrobial activity of natural plant extracts against five bacterial species, *Journal of the Arizona-Nevada Academy of Science*, 40(2):165-167.
- Gökpınar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., Durmaz, Y.,** 2006, algal antioksidanlar, *E. Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 23: 85-89.

KAYNAKLAR (devam)

- Göksan, T. ve Gökpınar G.**, 2005, *Haematococcus pluvialis* flotow (Chlorophyceae)'un farklı ışık şiddetlerinde vejetatif büyüme özellikleri, *E. Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 22:21-24.
- Grima, E. M., Belarbi, E-H, Acien Fernandez, F. G., Medina, A. R., Chisti, Y.**, 2003, Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics, *Biotechnology Advances*, 20:491-515.
- Grima, E. M., Acien Fernandez, F. G., Medina, A. R.**, 2004, Downstream Processing of Cell-mass and Products, 215-251, Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology, Richmond A. (Eds.), Blackwell Publishing company, U. K.,566p.
- Guzmán, S., Gato, A., Calleja, J. M.**, 2001, Antiinflammatory, analgesic and free radical scavenging activities of the marine microalgae chlorella stigmatophora and *Phaedactylum tricornutum*, *Phytotherapy Research*, 15: 224-230.
- Gülçin, İ., Uğuz, M. T., Oktay, M., Beydemir, Ş., Küfrevioğlu, Ö. İ.**, 2004, Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of Clary Sage (*Salvia sclarea* L.), *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 28: 25-33.
- Gür, D.**, 1997, Antibiyotik duyarlılık testlerinin standardizasyonu. Simpozyum; Antibiyotik duyarlılık testleri; Yöntemler ve sorunlar. 3. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, 58-63.

KAYNAKLAR (devam)

- Han, S. S., Lo, S. C., Choi, Y., Kim, J. H., Baek, S. H.,** 2004, Antioxidant activity of crude extract and pure compounds of *Acer ginnala* Max., *Bulletin of the Korean Chemistry Society*, 25:389-391.
- Handy R. L. C., Wallace P., Gaffen Z. A., Whitehead K. J., Moore P. K.,** 1995, The antinociceptive effect of 1-(2-trifluoromethylphenyl) imidazole (TRIM), a potent inhibitor of neuronal nitric oxide synthase in vitro, in the Mouse, *Brazillian Journal of Pharmacology*, 116:349–2350.
- Henson, B. J., Hesselbrock, S. M., Watson L. E., Barnum, S. R.,** 2004, Molecular phylogeny of the heterocystous cyanobacteria (subsections IV and V) based on nifD, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 493-497.
- Hernández-Becerril, D. U., Alonso-Rodríguez, R., Álvarez-Góngora, C., Barón-Campis, S. A., Ceballos-Corona, G., Herrera-Silveira, J., Meave Del Castillo, M. E., Juárez-Ruíz, N., Merino-Virgilio, F., Morales-Blake, A., Ochoa, J. L., Orellana-Cepeda, E., Ramírez-Camarena, C., Rodríguez-Salvador, R.,** 2007, Toxic and harmful marine phytoplankton and microalgaem(HABs) in Mexican Coasts, *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 42:1349-1363.

KAYNAKLAR (devam)

- Hersch, E. M., Reuben, J. M., Bogerd, H., Rosenblum, M., Bielski, M., Mansell, P. W. A., Rios, A., Newell, G. R., Sonnenfeld, G.,** 1983, Effect of the recreational agent isobutyl nitrite on human peripheral blood leukocytes and on *in vitro* interferon production, *Cancer Research*, 43:1365-1371.
- Hirata T., Tanaka, M., Ooike, M., Tsunomura, T., Sakaguchi, M.,** 2000, Antioxidant activities of phycocyanobilin preperad from *Spirulina Platensis*. *Journal of Applied Phycology*, 12:435-439.
- Huie, C. W.,** 2002, A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373:23-30.
- Huleihel, M., Ishanu, V., Tal, J., Shoshana, (M.) A.,** 2001, Antiviral effect of red microalgal polysaccharides on *Herpes simplex* and *Varicella zoster* viruses, *Journal of Applied Phycology*, 13:127-134.
- Imamoglu, E., Vardar Sukan, F., Conk Dalay, M.,** 2007, Effect of different culture media and light intensities on growth of *Haematococcus pluvialis*, *International Journal of Natural and Engineering Sciences* 1(3):5-9.
- Ismail A., Hong, T.S.,** 2002, Antioxidant activity of selected commercial seaweeds, *Malesian Journal of Nutrition*, 8:167-177.

KAYNAKLAR (devam)

- Issa, A. A.**, 1999, Antibiotic production by the cyanobacteria *Oscillatoria angustissima* and *Calothrix parietina*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 8:33-37.
- İmamoğlu, E.**, 2004, *Haematococcus pluvialis* üretiminde vejetatif fazda ve kistik fazda optimum ortam, sıcaklık ve ışık koşullarının tespiti, yüksek lisans tezi, E.Ü. Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, 191s (yayımlanmış).
- Jaffrezo, M, Poisson, A, Akbulut, A.**, 1978, Beydağları tipi serilerin alt kretase algleri (Batı Toroslar, Türkiye). *Maden Tetkik ve Arama Dergisi*, 91:75-88.
- Kamburova, R., Bankova, V., Petkova, G.**, 2003, Volatile substances of the green alga *Scenedesmus incrassatulus*, *Verlag Z. Naturforsch.*, 58c:187-190.
- Karabay-Yavasoglu N. U., Karamenderes C., Baykan S., Apaydin, S.**, 2007a, Antinociceptive and anti-inflammatory activities and acute toxicity of *Achillea nobilis* subsp. *neilreichii* extract in mice and rats, *Pharmaceutical Biology*, 45(2):162–168.
- Karabay-Yavasoglu, N. U., Sukatar, A., Ozdemir, G., Horzum, Z.**, 2007b, Antimicrobial activity of volatile components and various extracts of the red alga *Jania rubens*, *Phytotherapy Research*, 21:153-156.
- Karaboz, İ., Ateş, M., Koçyiğit, A.**, 2002, Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri Teori ve Uygulamaları Kursu, 5-7 Şubat, 45 s.

KAYNAKLAR (devam)

- Kargın Yılmaz, H.**, 2006, Mikroalg üretimi için fotobiyoreaktör tasarımları. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 23(1/2):327-332.
- Katircioğlu, H., Akın, B. S., Atıcı, T.** 2004, Microalgal toxin(s): characteristics and importance, *African Journal of Biotechnology*, 3(12):667-674.
- Katircioglu, H., Beyatli, Y., Aslim, B., Yüksekdağ, Z., Atici, T.**, 2006, Screening for antimicrobial agent production of some microalgae in freshwater, *The Internet Journal of Microbiology*, (2)2.
- Kaufmann, B., Christen, P.**, 2002, Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction, *Phytochemical Analysis*, 13:105-113.
- Keefe, F. J., Fillingim, R. B., Williams, D. A.**, 1991, Behavioral assesment of pain: nonverbal measures in animals and humans. *ILAR Journal Online*, 33 (1-2).
- Kelle, İ.**, 2006, Ağrı tedavisinde alternatif ilaçlar, *Dicle Tıp Dergisi*, 33(3):192-200.
- Khan, N. H., Rahman, M., Kamal Nur-E.**, 1988, Antibacterial activity of *Euphorbia thymifolia* Linn. *Indian Journal of Medical Research*, 87:395-397.
- Kılıç, A.**, 2008, Uçucu yağ elde etme yöntemleri, *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 10(13):37-45.

KAYNAKLAR (devam)

- Koray, T.**, 2002, Denizel Fitoplankton, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova-İzmir, 228s.
- Kramer, S. N.**, 1999, Tarih Sümerde Başlar, Kabalcı Yayınları, 487s.
- Kreitlow, S., Mundt, S., Lindequist, U.**, 1999, Cyanobacteria-A potencial source of new biologically active substances. *Journal of Biotechnology*, 70:61-63.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Bono, A.**, 2007, Phytochemical antioxidants for health and medicine – A move towards nature, *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 1(4)97-104.
- Kulisc, T., Radonic, A., Katalinic, V., Miles, M.**, 2004, Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil, *Food Chemistry*, 85:633-640.
- Lahlou, M.**, 2004, Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils, *Phytptherapy Research*, 18:435-448.
- Langely, G.**, 2005, Acute toxicity testing without animals. -European coalition to end animal experiments- www.eceae.org/downloads/pdf/ECEAE-Acute-Toxicity.pdf.
- Leffingwell, J. C., Alford, E. D.**, 2005, Volatile constituents of perique tobacco, *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 4(2):1-16.

KAYNAKLAR (devam)

- Li, H-B., Cheng, K-W., Wong, C-C., Fan, K-W., Chen, F., Jiang, Y.,** 2007, Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae, *Food Chemistry*, 102(3):771-776.
- Marxen, K., Vanselow, K. H., Lippemeier, S., Hintze, R., Ruser, A., Hansen, U.-P.,** 2007, Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal species by linear regression analysis of spectrophotometric measurements, *Sensors*, 7:2080-2095.
- Masojidek, J., Koblizek, M., Torzillo, G.,** 2004, Photosynthesis in microalgae, 20-39, *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Richmond A. (Eds.), Blackwell Publishing company, U. K., 566p.
- Matasyoh, L. G., Matasyoh, J. C., Wachira F. N., Kinyua, M. G., Muigail, A. W. T., Mukiama, T. K.,** 2007, Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. growing in Eastern Kenya, *African Journal of Biotechnology*, 6(6):760-765.
- Matsukawa, R., Hotta, M., Masuda, Y., Chihara, M., Karube, I.,** 2000. Antioxidants from carbon dioxide fixing *Chlorella sorokiniana*. *Journal of Applied Phycology*, 12: 263-267.
- Melzack, R.,** 1990, The tragedy of Needless Pain, *Scientific American*, 262(2):27-33.

KAYNAKLAR (devam)

- Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., Beek, T. A.,** 2004, Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts, *Food Chemistry*, 85:231-237.
- Mohn, F. H.,** 1988, Harvesting of microalgal biomass. In:Micro-Algal Biotechnology (Borowitzka, M. A. and Borowitzka, L. J.,Eds.) pp.395-414, Cambridge University Press, Cambridge, 477 p.
- Morteza-Semnani K, Saeedi M, Hamidian M, Vafamehr H, Dehpour AR.,** 2002, Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Glaucium grandiflorum* extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 80:181-186.
- Mundt, S., Kreitlow, S., Nowotny, A. and Effmert, U.,** 2001, Biological and pharmacological investigation of selected cyanobacteria. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 203:327-334.
- Mundt, S., Kreitlow, S., Jansen, R.,** 2003, Fatty Acids With Antibacterial Activity From The Cyanobacterium *Oscillatoria redekei* HUB 051. *Journal of Applied Phycology*, 15:263-267.
- Naz, M., Gökçek, K.,** 2004, Fotobiyoreaktörler: fototropik mikroorganizmalar için alternatif üretim sistemleri, *Türk Sucul Yaşam Dergisi*, 2(2):545-551.
- Nwinyi, F. C., Kwanashie, H. O., Ahmad, A. A., Odama, L. E.,** 2009, Evaluation of toxicity profile of leaf base extract of *Sorghum bicolor* in rat, *African Journal of Biotechnology*, 8(2):334-342.

KAYNAKLAR (devam)

- Oh-Hama, T., Miyachi, S.,** 1992, *Chlorella*, 3-26, Micro-algal Biotechnology, Borowitzka, M. A. and Borowitzka L. J. (Eds.), Cambridge University Pres, New York, U.S.A., 477p.
- Okpo S. O., Fatokun F., Adeyemi, O. O.,** 2001, Analgesic and anti-inflammatory activity of *Crinum glaucum* aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 78:207-211.
- Orhun F,** 1968, Gaz kromatografisi, taşıyıcı gazın akış hızının tesirleri üzerinde tecrübi araştırmalar ve metodun türkiye'deki bazı tabîî gazların hidrokarbon analizlerine tatbiki, www.mta.gov.tr/mta.
- Ostensvik, O, Skulberg, O. M., Underdal, B., Hormazabal, V.,** 1998, Antibacterial properties of extracts from selected planctonic freshwater cyanobacteria-a comparative study of bacterial bioassays, *Journal of Applied Microbiology*, 84:1117-1124.
- Oyadeyi, A. S., Ajao, F. O., Afolabi, A. O., Udoh, U. S., Azeez, O. M.,** 2007, The formalin test in African Toad (*Bufo regularis*)- a novel pain model in Amphibians, *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, 2(1):24-28.
- Oyemitan, I. A., Iwalewa, E. O., Akanmu, M. A., Olugbade, T. A.,** 2008, Antinociceptive and antiinflammatory effects of essential oil of *Dennettia Tripetala* G.Baker (annonaceae) in rodents, *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 5(4):355-362.

KAYNAKLAR (devam)

- Ozdemir, G., Karabay, N. U., Conk Dalay, M., Pazarbaşı, B.,** 2004, Antibacterial activity of volatile component and various extracts of *Spirulina platensis*, *Phytotherapy Research* 18:754-757.
- Ozdemir, G., Horzum, Z., Sukatar, A., Karabay-Yavasoglu, N. U.,** 2006, Antimicrobial activities of volatile components and various extracts of Dictyopteris membranacea and Cystoseira barbata from the Coast of Izmir, Turkey, *Pharmaceutical Biology*, 44(3):183-188.
- Özbek, H., Öztürk, A.,** 2003, Antienflamatuvar etkinliğin ölçülmesinde kullanılan yöntemler, *Van Tıp Dergisi*, 10(1):23-28.
- Ördög, V., Stirk, W. A., Lenobel, R., Bancirova, M., Strnad, M., Staden, J., Szigeti, J., Nemeth, L.,** 2004, Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites, *Journal of Applied Phycology*, 16:309-314.
- Özcan, B.,** 2004, Türkiye'den halofilik arkebakterilerin izolasyonu ve karakterizasyonu, Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Ankara, 128s (yayınlanmış).
- Patra, J. K., Rath, S. K., Jena, K., Rathod, V. K., Thatoi, H.,** 2008, Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of seaweed (*Sargassum* sp.) extract: A study on inhibition of glutathione-S-transferase activity, *Turkish Journal of Biology*, 32:119-125.

KAYNAKLAR (devam)

- Pratoomyot, J., Srivilas, P., Noiraksar, T.,** 2005, Fatty acid composition of 10 microalgal species, *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 27(6):1179-1187.
- Provasoli, L,** 1971. Media and prospects for the cultivation of algae. In: Rosowski, J. R., and Parker, B. C., eds. Selected Papers in Phycology. Department of Botany, University of Nebraska, Lincoln, Nebraska, 876p.
- Pulz, O,** 2001, Photobioreactors: producton systems for phototrophic microorganisms, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57:287-293.
- Pulz, O., Gross, W.,** 2004, Valuable products from biotechnology of microalgae, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65:635-648.
- Richmond A.,** 2000, Microalgal Biotechnology at the turn of the millenium: A personel view, *Journal of Applied Phycology*, 12:441-451.
- Rodriguez-Garcia, I., Guil-Guerrero, J. L.,** 2008, Evaluation of the antioksidan activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods, *Food Chemistry*, 108:1023-1026.
- Rudic, V and Dudnicenco, T.,** 2000, Process for cultivation of green alga *Haeamatococcus pluvialis* (Flotow). MD Patent Nr. a 2000 0154.

KAYNAKLAR (devam)

- Sano, T., He, J., Liu, Y., Kaya, K.,** 1998, Isolation of bioactive compounds in cyanobacteria from Chinese fresh water. 1. Trypsin inhibitor, *Phycological Research*, 46:13-17.
- Saygi, Ş.,** 2003, Deneysel toksikolojide toksisite testleri ve test sonuçlarının önemi. *Gülhane Tıp Dergisi* 45(3):291-298.
- Sayyah, M., Peirovi1, A., Kamalinejad, M.,** 2002, Anti-nociceptive effect of the fruit essential oil of *Cuminum cyminum L.* in Rat, *Iranian Biomedical Journal*, 6(4):141-145.
- Semen, E., Hiziroğlu, S.,** 2005, Production, yield and derivatives of volatile oils from Eastern redcedar (*Juniperus Virginiana L.*), *American Journal of Environmental Sciences*, 1(2):133-138.
- Singh, S., Kate, Bhushan, N., Banerjee, U. C.,** 2005, Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview, *Critical Reviews in Biotechnology*, 25:(3)73-95.
- Skulberg, O.,** 2000, Microalgae as a source of bioactive molecules- experience from cyanophyte research, *Journal of Applied Phycology*, 12:341-348.
- Skulberg, O.,** 2004, Bioactive chemicals in microalgae, 485-508, *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Richmond A. (Eds.), Blackwell Publishing company, U. K., 566p.

KAYNAKLAR (devam)

- Soderberg L. S. F., Barnett J. B.**, 1995, Inhalation exposure to isobutyl nitrite inhibits macrophage tumoricidal activity and modulates inducible nitric oxide, *Journal of Leukocyte Biology*, 57:135-140.
- Soltani, N, Khavari-Nejad, R. A., Tabatabaei Yazdi, M., Shokravi, S. H., Fernandez-Valiente, E.**, 2005, Screening of soil cyanobacteria for antifungal and antibacterial activity, *Pharmaceutical Biology*, 43:455-459.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A.**, 2006, Commercial applications of microalgae, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2):87-96.
- Sreenivasan, S., Ibrahim, D., Mohd. Kassim, M. J. N.**, 2007, Free radical scavenging activity and total phenolic compounds of *Gracillaria changii*, *International Journal of Natural and Engineering Sciences*, 1(3):115-117.
- Sukatar, A.**, 2002, Alg Kùltür Yöntemleri, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 168s.
- Sun Y., Hayakawa S, Ogawa M, Izumori K**, 2007. Antioxidant properties of custard pudding dessert containing rare hexose, D-psicose, *Food Control*, 18:220–227.
- Sümerkan, B., Gökahmetoğlu, S.**, 1998, MIC, MBC testleri, rutindeki önemi ve uygulamaları, *Flora*, 3(2):91-95.

KAYNAKLAR(devam)

- Taşkın, E., Öztürk, M., Kurt, O., Aysel, V.**, 2001, Three new records for the marine algal flora of Turkey, *Turkish Journal of Botany*, 25:245-248.
- Tannin-Spitz, T., Bergman, M., Moppes D., Grossman S., Arad S.(M).**, 2005, Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp., *Journal of Applied Phycology*, 17:215–222.
- Tepe, B., Dönmez, E., Unlu, M.**, 2004, Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl), *Food Chemistry*, 84:519-525.
- Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K.**, 1992, The formalin test: an evaluation of the method, *Pain*, 51: 5-17.
- Tomaselli, L.**, 2004, The microalgal cell, 3-19, *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Richmond A. (Eds.), Blackwell Publishing company, U. K.,566p.
- Tredici, M. R.**, 2004, Mass Production of Microalgae: Photobioreactors, 178-214, *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Richmond A. (Eds.), Blackwell Publishing company, U. K., 566p.
- Tüney, İ, Çadırcı, B. H., Ünal, D., Sukatar, A.**, 2006, Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla (İzmir, Turkey), *Turk Journal of Biology*, 30:171-175.

KAYNAKLAR(devam)

- Türk Farmakopesi**, 1974, T. C. Sağlık ve Sosyal Yardım Bakanlığı, Milli Eğitim Basımevi, İstanbul, 947s.
- Ustaçelebi, Ş.**, 1999. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi, Ankara, 1339s.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D.**, 1998, Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46:4113-4117.
- Vieira, L. A. P., Freitas, A. L. P., Feitosa, J. P. A., Silva, D. C., Viana, G. S. B.**, 2004, The alga *Bryothamnion seaforthii* contains carbohydrates with antinociceptive activity, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37:1071-1079.
- Vlachos, V., Critchley, A. T., von Holy A.**, 1996, Establishmant of a Protocol for Testing Antimicrobial Activity in Southern African Macroalgae. *Microbios*, 88:115-123.
- Walker, T. L., Purton, S., Becker, D. K., Collet, C.**, 2005, Microalgae as bioreactors, *Plant Cell Reports*, 24(11):629-41.
- Wei, A., Shibamoto, T.**, 2007, Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 55:1737-1742.

KAYNAKLAR (devam)

- Weideman, M., Perera, F., Birnbaum, L., Rall, D.,** 1993, Toxicity tests in animals: historical perspectives and new opportunities, *Environmental Health Perspectives and New Opportunities-online*, 101(3).
- Woese, C.R., Kandler, O. And Wheelis, M. L.,** 1990, Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya, *Proceedings of the National Academy of Science USA.*, 87:4576-4579.
- Yashpal, K., Coderre, T. J.,** 1998, Influence of formalin concentration on the antinociceptive effects of anti-inflammatory drugs in the formalin test in rats: separate mechanisms underlying the nociceptive effects of low- and high-concentration formalin, *European Journal of Pain*, 2:63-68.
- Yilmaz Koz, F. F., Karabay Yavasoglu, N. U., Demirel, Z., Sukatar, A., Ozdemir, G.,** 2009, Antioxidant and antimicrobial activities of *Codium fragile* (Suringar) Hariot (Chlorophyta) essential oil and extracts, *Asian Journal of Chemistry*, 21(2):1197-1209.
- Yoldaş, M. A., Katırcıoğlu, H., Beyatlı, Y.,** 2003, Bazı mavi-yeşil alglerin (Cyanophyta-Cyanobacteria) poli- β -hidroksibütirat (PHB) Üretimi ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi. *E. Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 20:467-471.

KAYNAKLAR (devam)

Zgoda J.R. and Porter J.R., 2001, A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi, *Pharmaceutical Biology*, 39:221-225.

Zhao, W. J., Niu, F. L., Li, J., Dong, Q., Huang, Z. Y., 2009, Components of volatile oil from water-caltrop and their anti-tumor effect *in vitro*, *Chemical Research Chinese Universities*, 25(1):56-59.

www.activalg.fr/img

www.fao.org/docrep/0003/w3732e/w3732e06.jpg

www.igv-gmbh.de

www.kutz.de/werke/algen.htm

www.ntv.msnbc.com.news

www.physorg.com/newman/gfx/news/2006/Algalbloom

www.spirulina-program-org/4texcoco.htm

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Fethiye Ferda YILMAZ KÖZ

Doğum Yeri ve Tarihi : İskenderun, 12.04.1978

Uyruğu : T.C.

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu:

Doktora	Ege Üniv. Fen Bil. Enst. Biyoloji A. D.	2009
Y. Lisans	Ege Üniv. Sağ. Bil. Enst. F. Mikrobiyoloji A.D.	2003
Lisans	Ege Üniv. Eczacılık Fakültesi	2001
Lise	İskenderun Lisesi	1994

Stajlar:

Kılınç Eczanesi-İskenderun (2 ay)	1997
SSK Hastanesi-İskenderun (2 ay)	1998
Ege Üniv. Eczacılık Fak. Uygulama Eczanesi	1998

İş Deneyimi:

Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Araştırma Görevlisi 2001-...

Katıldığı Toplantı ve Kurslar

Temel Moleküler Tanı Yöntemleri Kursu, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fak., 23-24 Eylül 2008, Ankara.

Tıpta Tez Yönetimi Kursu, Ege Üniversitesi Tıp Fak. Araştırma ve Eğitim Laboratuvarı, 21 Haziran 2008, İzmir.

Laboratuvar Güvenliği Sempozyumu, Ege Üniversitesi Tıp Fak. Araştırma ve Eğitim Laboratuvarı, 16 Nisan 2008, İzmir.

XV. Deney Hayvanları Kursu, Ege Üniversitesi Tıp Fak., 21-23 Kasım 2006, İzmir.

Bilimsel Araştırmalar: Bilgi Üreten Topluma Geçiş Sempozyumu, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 24-27 Ekim 2005, İzmir.

Hücre Kültürü Teknolojisinde Temel Prensipler ve Yapay Organlar, Ege Üniv., Biyomühendislik Bölümü, 24-26 Kasım 2004, İzmir.

Ege Akılcı Antibiyotik Kullanım Kursu, Ege Üniversitesi Tıp Fak. 8 Mart 2003, İzmir.

Ulusal Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi, Ege Üniversitesi Tıp Fak. 2-4 Mayıs 2003, İzmir.

Recombinational Telomere Elongation in Yeast and The Pharmaceutical Implications, Workshop, 21 Mayıs 2003, İzmir.

Moleküler Tanı ve Uygulamaları Yaz Okulu, Ege Üniv. Eczacılık Fak., 28-31 Mayıs, 2002.

Eczacılar için Fitoterapi Kursu, Ege Üniv. Eczacılık Fak., 1 Mart-4 Haziran, 1999.

Bilimsel Tebliğler:**Uluslararası toplantılarda yayınlanmış bildirileri**

Demirel, Z., Yilmaz F. F., Ozdemir, G., Conk Dalay In vitro Activity of Scenedesmus protuberans Fritsch Extract Against Human Pathogens, 2006; Workshop and Training Course on Microalgae Culture Collections, Türkiye (Poster).

Yilmaz Koz, F.F., Ozdemir, G., Sukatar, A., Karabay, U. Antimicrobial Activities of Some Macroalgal Essential Oil and Extracts from Turkey 3rd S Y M P O S I U M on Microalgae and Seaweed Products in Agriculture. 21-23 June 2006; Mosonmagyaróvár - Hungary (Sözlü Bildiri).

Yilmaz F. F., Ozdemir, G., Conk Dalay, M., Demirel, Z. Antibacterial Activity of Volatile Component and Various Extracts, 6th European Workshop on Microalgal Biotechnology, 23-25 May 2005; Nuthetal, Germany (Sözlü bildiri).

Yilmaz F. F., Ermertcan Ş., Fluoroquinolone Resistance In *Escherichia coli* Strains Isolated From Urinary Tract Infections , 2003; 3rd Balkan Conference of Microbiology, 4-6 Eylül 2003, İstanbul Türkiye (Poster).

Ulusal bilimsel toplantılarda yayınlanmış bildirileri

Yılmaz Köz, F.F., Demirel, Z., Karabay Yavaşoğlu, N.Ü., Özdemir, G., Conk Dalay, M. (2008), Synechocystis sp. (Burdur Göl' ü) Uçucu Yağı' nın Bileşenleri ve Ekstrelerin Antimikrobiyal, Antioksidan

Aktivitesi, IV. Ulusal Biyomühendislik Kongresi (Uluslar arası katılımı) 15-18 Ekim, İzmir (Poster).

İçyüz, E., Demirel, Z., Yılmaz Köz, F.F., Özdemir, G., Conk Dalay, M., Denizli Sarayköy' de bulunan Termal Su Kaynağından İzole Edilen Siyanobakteri *Pseudoanabaena* sp.' in Antimikrobiyal ve Antifungal Aktivitenin Araştırılması. 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran, Trabzon (Poster).

Demirel, Z., Yılmaz Köz, F.F., Karabay Yavaşoğlu, N.Ü., Özdemir, G., Conk Dalay, M., İzmir Körfezinde Yayılış Gösteren Bazı Kahverengi Alglerin Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivitelerinin Araştırılması, 23-27 Haziran, Trabzon. 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran, Trabzon (Poster).

Demirel, Z., Yılmaz Köz, F.F., Karabay Yavaşoğlu, N.Ü., Özdemir, G., Conk Dalay, M. *Laurencia obtusa* (Hudson) J. V. Lamoroux ve *Laurencia obtusa* var. *pyramidata* Boryex J. Agardh Çeşitli Eksrelerinin ve Uçucu Yağların Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi, 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran, Trabzon (Poster).

Karabay Yavaşoğlu, N.Ü., Yılmaz Köz, F.F., Demirel, Z., Özdemir, G., Conk Dalay, M., *Chlorella* sp. Ekstrelerinin Analjezik Aktivitesi ve Akut Toksisitesi, 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran, Trabzon (Poster).

Özdemir, G.; Yılmaz Köz, F.F., Demirel, Z., Karabay Yavaşoğlu, N.Ü., Conk Dalay, M., *Chlorella* sp.' nin Uçucu Yağı ve Ekstrelerinin

Antimikrobiyal Aktivitesi, 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran, Trabzon (Poster).

Yılmaz K  z, F.F., Demirel, Z., Karabay Yava  o  lu, N.  .,   zdemir, G., Conk Dalay, M. (2007) Acıg  l' den   zole Edilen Siyanobakteri *Oscillatoria amphibia*'nın Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivitesi. 21-23 Haziran, XV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi (s  zl   bildiri)

Demirel, Z., Yılmaz K  z, F.F., Karabay Yava  o  lu, N.  .,   zdemir, G., Conk Dalay, M. (2007) *Spirulina platensis*' den elde edilen C-Fikosiyanin Analjezik Etkisi, Antioksidan Aktivitesi ile Akut Toksisitesinin Ara  tırılması, 21-23 Haziran, XV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Antalya (Poster).

SCI Dergilerde yayınlanmı   makaleleri

Demirel, Z., **Yılmaz Koz, F.F.**, Karabay Yavasoglu, N. U., Ozdemir, G., Sukatar, A., 2009, Antimicrobial and antioxidant capacity of brown algae collected from Aegean Sea, *Journal of the Serbian Chemical Society*, (Yayın a  amasında).

Yılmaz Koz, F. F., Karabay Yavasoglu, N. U., Demirel, Z., Sukatar, A., Ozdemir, G., 2009, Antioxidant and antimicrobial activities of *Codium fragile* (Suringar) Hariot (Chlorophyta) essential oil and extracts, *Asian Journal of Chemistry*, 21(2):1197-1209.

Diğer bilimsel dergilerde yayınlanmış makaleleri

Yılmaz,F. F., Ermertcan,Ş., 2005, İdrar Yolu İnfeksiyonlarından İzole Edilen *Escherichia coli* Kökenlerinde Florokinolon Direncinin Araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi* 19(4);429-433.

Projeler

Yöresel Kaynaklardan İzole Edilen Bazı Mikroalg Ve Siyanobakterilerin Çeşitli Ekstraktlarının Farmakolojik Aktivitelerinin İncelenmesi, 2009, Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu.

İdrar Yolu İnfeksiyonlarından İzole Edilen *Escherichia coli* Kökenlerinde Florokinolon Direncinin Araştırılması, 2003, Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu.

Hazırladığı Bilimsel Tezler

Doktora Tezi: Yöresel Kaynaklardan İzole Edilen Yeşil Mikroalg *Chlorella* sp. ve Siyanobakteri *Oscillatoria amphibia*' nın Çeşitli Ekstraktlarının Farmakolojik Aktivitelerinin İncelenmesi, 2009.

Yüksek Lisans Tezi: İdrar Yolu İnfeksiyonlarından İzole Edilen *Escherichia coli* Kökenlerinde Florokinolon Direncinin Araştırılması, 2003.