

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**İZMİR İLİ VE ÇEVRESİNDE BULUNAN TERMAL
SULARDA GELİŞEN BAZI TERMOFİLİK MAVİ-YEŞİL
ALGLERİN (SİYANOBAKTERİLERİN) İZOLASYONU VE
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TAYİNİ**

Kerem YÜKSEL

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 401.05.00

Sunuş Tarihi : 06.02.2009

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Atakan SUKATAR

Bornova-İZMİR

III

Sayın **Kerem YÜKSEL** tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “**İzmir ili ve çevresinde bulunan termal sularda gelişen bazı termofilik mavi-yeşil alglerin (siyanobakterilerin) izolasyonu ve moleküler yöntemlerle tayini**” 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 **06.02.2009** tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oy birliği/oy çokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı :Prof. Dr. Atakan SUKATAR

.....

Üye :Prof. Dr. İsmail KARABOZ

.....

Üye : Doç. Dr. Meltem CONK DALAY

.....

ÖZET**İZMİR İLİ VE ÇEVRESİNDE BULUNAN TERMAL SULARDA
GELİŞEN BAZI TERMOFİLİK MAVİ-YEŞİL ALGLERİN
(SİYANOBAKTERİLERİN) İZOLASYONU VE MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE TAYİNİ****Kerem YÜKSEL****Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı****Tez Danışmanı: Prof. Dr. Atakan SUKATAR****Şubat 2009, 84 Sayfa**

Bu çalışmada, İzmir ili ve çevresindeki termal tesislerden elde edilen mavi-yeşil algler (siyanobakteriler) laboratuvar ortamında izole edilip, moleküler yöntemlerle tür tayini çalışılmıştır. Zeytindalı kaplıcaları, Şifne Termal Otel ve Balçova Termal Otel olmak üzere 3 istasyondan elde edilen 4 mavi-yeşil alg (siyanobakteri) türü, laboratuvar ortamında saflaştırılarak izole edilmişlerdir. Daha sonra elde edilen hücrelerden, DNA izolasyonu sonucu elde edilen DNA'lar PCR'da çoğaltılmıştır. Siyanobakterilere özgü primerler kullanılarak 16S rRNA gen bölgeleri tekrar PCR'da çoğaltılarak elde edilen dizi analizi verileri bilgisayar programlarında yorumlanarak filogenetik bakımdan tür tayini yapılmaya çalışılmıştır. Dizi analizlerine göre yapılan tür tayini doğrultusunda, örneklerden biri *Geitlerinema* cinsi olduğu diğer 3 türün ise kültürü belirlenmemiş tür olduğu belirtilmiştir.

Anahtar kelimeler: Termofilik mavi-yeşil algler, DNA izolasyonu, PCR, 16S r RNA, *Geitlerinema* sp.

ABSTRACT
ISOLATION AND MOLECULAR DETERMINATION OF BLUE
GREEN ALGAE (CYANOBACTERIA) WHICH GROW IN
THERMAL WATERS IN IZMIR AND SURROUNDINGS

YÜKSEL, Kerem

MSc. in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Atakan SUKATAR

February 2009, 84 Pages

In this study, the aim is the isolation and identification of blue-green algae (cyanobacteria) obtained from thermal waters of İzmir and around by using molecular methods in laboratory. The four types of blue-green algae (cyanobacteria) were collected from 3 centers which are Zeytindalı kaplıcaları, Şifne Termal Otel ve Balçova Termal Otel. The obtained four types of blue green algae (cyanobacteria) are isolated by purifying in culture medium at laboratory. Then DNA from the cells is isolated and amplified by PCR. Afterwards using the primers that are specific for blue green algae (cyanobacteria) , 16S rRNA gene spaces are amplified by PCR and the resulting sequence was analysed filogenetically in order to determine the species. According sequence analysis, one of the species was *Geitlerinema* and the other three species are uncultured .

Keywords: Termophilic blue gren algae, DNA isolation, PCR, 16S r RNA, *Geitlerinema sp.*

TEŞEKKÜR

Çalışmam boyunca, tezimin her aşamasında desteğini, bilgi ve katkılarını esirgemeyen danışmanım, Sayın Hocam, Prof. Dr. Atakan SUKATAR'a, denemelerimde Biyoloji Bölümü'nün tüm olanaklarını kullanmama izin veren Biyoloji Bölüm Başkanlığına, laboratuvar çalışmalarım ve tezimin yazımı sırasında sıklıkla bilgilerine başvurduğum, yardımlarını benden esirgemeyen Zeliha DEMİREL'e ve Araş. Gör. İnci TÜNEY'e, tezde yer alan fotoğrafların çekiminde yardımlarını esirgemeyen Yar. Doç. Dr. Remziye DEVECİ ve Dilek ÜNAL'a, moleküler analizlerdeki yardımlarından dolayı Ali KOÇYİĞİT'e, Yüksek lisans dönemim boyunca yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım, Ali Şahin KÜÇÜKASLAN, Emre BATIR, ve kuzenim Müşerref YERSEL'e, Hidrobiyoloji Anabilim Dalında lisansüstü eğitimi yapmakta olan arkadaşlarıma, bugüne kadar hayatımın her evresinde desteklerini arkamda hissettiğim sevgili AİLEME, ayrıca bu çalışmayı 2008 FEN 022 no'lu proje kapsamında destekleyen Ege Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fon Saymanlığına en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER	<u>Sayfa</u>
ÖZET	V
ABSTRACT	VII
TEŞEKKÜR	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XIV
1. GİRİŞ	1
1.1 Algler	1
1.2 Deoksiribonükleik asit (DNA).....	3
1.3 Bakterilerde DNA'nın replikasyonu.....	5
1.4 Ribonükleik asit (RNA).....	7
1.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction) (PCR)	10
1.5.1 PCR Çeşitleri.....	14
1.6 Elektroforez.....	17
1.6.1 Elektroforez çeşitleri.....	18
1.7 DNA Dizi Analizi.....	19
1.8 Mavi-Yeşil Alglerin Genel Özellikleri.....	21
1.9 Termal Alglerle İlgili Çalışmalar.....	25
1.9.1 Ülkemizde termal alglerle ilgili çalışmalar.....	32
1.10 İstasyonlarla İlgili Özellikler.....	35

İÇİNDEKİLER (devam)

2. MATERYAL VE METOT.....	41
2.1 Materyal	41
2.2 Metot.....	41
2.2.1 Örneklerin elde edilmesi ve fiksasyonu.....	41
2.2.2 Kültür ortamları.....	42
2.2.3 Fiziksel koşullar.....	45
2.2.4 Saflaştırma yöntemi.....	45
2.2.5 Türlerin kültüre edilmesi.....	46
2.2.6 Ekipmanlar.....	47
2.2.7 Moleküler tanımlama.....	48
2.2.7.1 <u>DNA izolasyonu</u>	48
2.2.7.2 <u>PCR analizi</u>	52
2.2.7.2.1 <u>PCR analizinde kullanılan primer çifti</u>	52
2.2.7.3 <u>Sekans analizi ve filogenetik yakınlık</u>	55
3. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	56
4. ÖNERİLER.....	75
KAYNAKLAR.....	76
ÖZGEÇMİŞ	82

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	Sayfa
2.1 Stok kültür hazırlanması.....	46
2.2 Yatık agarda üretim.....	46
2.3 1 L. Erlenelrde havalandırmalı üretim.....	47
2.4 Agaroz jel elektroforezi.....	52
2.5 PCR.....	53
3.1 Zeytindalı Kaplıcası.....	58
3.2 Şifne Termal Otel (Havuz).....	58
3.3 Balçova Termal Otel (Sıcak su çıkışı).....	59
3.4 Balçova 1	61
3.5 Balçova 2	61
3.6 Şifne.....	62
3.7 Zeytindalı.....	62
3.8 İzole edikmiş DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü...	64
3.9 PCR ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	65

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1: Şifne Termal Suyuna ait kimyasal kompozisyon.....	36
1.2: Balçova Termal Suyuna ait kimyasal kompozisyon.....	37
1.3: Zeytindalı Termal Suyuna ait kimyasal kompozisyon.....	39
2.1: Blue green algae (BG-11) ortamı kompozisyonu.....	43
2.2: Erdschreiber Medium (EM) kültür ortamı solüsyonu kompozisyonu	44
2.3. Kullanılan ekipman markaları ve özellikleri.....	47
2.4: Kullanılan primerlerin sekansları.....	52
2.5 : PCR Reaksiyon karışımı	54

1. GİRİŞ

1.1 Algler

Algler, gerçek kök, gövde ve yaprak yapısı göstermeyen talluslu bir yapıya sahip canlılar grubudur. Primer fotosentetik pigmentleri klorofil a'dır. Yaşam ortamları oldukça geniştir. Genellikle nemli ortamlarda ve sularda (tatlı su, acı su, deniz suyu ve termal sularda) bulunmalarına rağmen karlar üzerinde bulunan, *Cycas sp.* köklerinde endosimbiyont olan, toprakta ve çölde gelişim gösteren türleri de bulunmaktadır. Likenlerde görüldüğü gibi simbiyotik ilişkilerde bulunabilirler. Memelilerde ve omurgasızlarda patojen olan türleri de mevcuttur. Besin zincirinde, güneş enerjisi, su ve karbondioksiti kullanarak besin üretmeleri nedeniyle primer üretici görevindedirler. Birçok canlı için besin kaynağı olmalarının yanı sıra Dünya oksijen kaynağı olarak da görev yaparlar.

Deniz algleri ve kullanım alanları üzerinde yapılan araştırmalar M.Ö 2700 yıllarında Kral Shen Nung'a kadar uzanmaktadır. M.S. tıbbi alanda ve besin maddesi olarak Çin, Kore ve Japonya'da kullanılmaya başlanmıştır. Alglerden ilk olarak kozmetik sanayinde renk maddesi olarak Roma İmparatorluğunun Virjil ve Horas zamanında yararlanılmıştır. 17. yüzyılda alglerden iyot ve brom elde edilmeye başlansa da günümüzde bu maddeler alg endüstrisinde yan ürün durumundadır.

Alglerden elde edilen maddelerin başında agar agar, karragen, alginat ve benzeri maddeler gelmektedir. Bu maddeler boya sanayinde; renk eldesinde, kauçuk sanayinde; yumuşaklık ve akıcılık sağlamak için, tekstil sanayinde; katılaştırıcı madde olarak, kağıt sanayinde; mürekkebin dağılmasını önleyen kaliteli kağıt üretimini sağlamada, inşaat sanayinde; beton karışımı için dolgu maddesi ve kırılmaz cam yapımında, kozmetik sanayinde; saç bakımı maddelerinde, diş macunu, traş kremi, deri merhemi, losyon, güneş yağı ve köpüklerde sabitleyici, geciktirici ve katılaştırıcı olarak, ilaç sanayinde; öksürük şuruplarında ve tabletlerde taneleme ve birleştirme ürünü olarak, alkol sanayinde; bira ve şaraba berraklık ve yüksek kalite sağlamak için, yiyecek sanayinde sucuk, salam, sosis gibi yiyecek maddeleri üzerine koruyucu zar yapımında, kremalarda kıvam arttırıcı olarak kullanılmaktadır (Güner ve Aysel, 1999).

Mavi-yeşil algler fototrofik prokaryotik canlılardır. Yüksek bitkilerdeki gibi birbirine bağlı Fotosistem I ve Fotosistem II'yi kullanarak oksijenli fotosentez yapan tek prokaryotik canlı grubudur. Çok sayıda türü bilinmektedir ve her bir türün morfolojisi diğer türlerden oldukça farklılık gösterir (Castenholz R.W. and Waterbury J.B., 1989).

Mavi-yeşil alglerin erken Prekambriyen dönemde geliştiği ve ilk olarak atmosferik oksijenin artışından sorumlu olduğu var sayılmaktadır (Castenholz, 1969). Mavi-yeşil algler geniş ekolojik dağılıma sahip önemli primer üretici organizmalardır. Okyanus alanlarından, ılıman topraklara, tatlı su göllerine, hatta olağan dışı habitatlarda dahi (kurak çöller, soğuk göller, sıcak kaynaklar) bulunabilmektedirler (Herrero *et al.*

2001, Stewart 1973, Mackay *et al.*1983). Mavi-yeşil algilere daha sonra ayrıntılı şekilde değinilecektir.

1.2 Deoksiribonükleik asit (DNA)

DNA molekülleri, nükleotid adı verilen yapı taşlarından meydana gelen iki polinükleotid iplikçiğinin, sarmal biçimde birbirine bağlanması ile oluşan oldukça büyük moleküllerdir. Nükleotidlerin yapısında,

- Bir pürin veya pirimidin bazı,
- 5 karbonlu bir şeker (*pentoz*)
- Ester bağı oluşturan *fosfat* molekülü üç temel eleman bulunur.

Pürin bazları *Adenin (A)* ve *Guanin (G)*, pirimidin bazları ise *Sitozin (S)* ve *Timin (T)*'den oluşmuştur. Pentoz molekülü DNA'da deoksiriboz, RNA'da ise riboz yapısındadır; nükleik asitler şekerlerin yapılarına göre adlandırılır. Pürin veya pirimidin bazlarının pentoz molekülleri ile yaptıkları bileşiklere nükleosid adı verilir. Nükleosidler şeker (pentoz) moleküllerinin yapısında bulunan karbon atomlarının, pürin veya pirimidin yapısındaki nitrojen atomlarına bağlanması suretiyle oluşturulurlar. Nükleosidlerin pentoz molekülleri arasında (5' → 3' yönünde), fosforik asidin ester bağları oluşturmasıyla da nükleotidler meydana gelir. Nükleotidlerin polimerizasyonu ile oluşan DNA iplikçiği bir polinükleotid olup, DNA molekülü bu özelliğe sahip iki iplikçiğin yan yana gelip, hidrojen bağları ile bağlanması sonucu meydana gelen sarmal bir yapıdır. Adenin ile Timin (A=T) arasında iki, Guanin ile Sitozin (G=C) arasında üç hidrojen bağı vardır.

Bir DNA molekülündeki pürin ve pirimidin bazlarının (A, T, C, G) sayısı ve diziliş biçimi, her canlı varlık için değişmeyen ve özgüllük gösteren bir genetik yapı özelliğidir. Bunun doğal bir sonucu olarak doğada milyonlarca farklı canlı türü ve bu türlerin her birinin birbirine benzemeyen bireyleri (fenotip) bulunmaktadır. Bir canlının fenotipini belirleyen ve sayıları binlerce olabilen biyolojik özellik ve fonksiyonlarının her biri de spesifik genetik yapısının bir ürünüdür. Yani her bir biyolojik özellik ve fonksiyondan “gen” adı verilen genetik birimler sorumludur. Genler sorumlu oldukları fonksiyonları sentez ettirdikleri enzimlerle gerçekleştirmektedir.

Belli sayı ve sıra ile yan yana gelen aminoasitlerin polimerizasyonu sonucu oluşan her bir protein molekülünün, gen üzerinde spesifik bir kodlama düzeni vardır. Protein molekülü ile ilgili kodlama, pürin ve pirimidin bazları içeren nükleotidlerin üçlü gruplar halinde dizilmesi ile sağlanmaktadır. Her biri bir aminoasiti kodlayan bu üçlü gruplara (*taban üçlüsü=triplet*) genetik dilinde *kodon* adı verilmektedir. Proteinlerin yapıtaşı olan aminoasit türlerinin sayısı yirmi olup, pürin ve pirimidin bazlarının üçlü gruplar halinde yan yana gelmeleri sonucu oluşacak olan kodon sayısı daha fazladır. Yapılan çalışmalar 64 değişik kodon oluşabileceğini göstermiştir.

DNA molekülünü oluşturan iki polinükleotid iplikçigi birbirinden ayrılabilir ve her bir iplikçik, önceden karşısında bulunan ve kendisini tamamlayan diğer iplikçigi yeniden ve aynen oluşturabilme yeteneğindedir. Başka hiçbir molekülde bulunmayan bu özellik sayesinde, üreme sırasında birbirinden ayrılan iki polinükleotid zinciri (iplikçik), karşıtı olan diğer zinciri sentezleyerek aynı yapı ve özellikte

iki DNA molekülü meydana getirebilmektedir. Bu olaya replikasyon yani DNA'nın kendi kendini eşlemesi adı verilir

(<http://www.med.gazi.edu.tr/egitim/donem1/dersler/bakterigenetigmycira k.htm>).

1.3 Bakterilerde DNA'nın Replikasyonu

E. coli ve *Salomonella typhimurium* ile yapılan çalışmalar, bakteri kromozomlarının dairesel biçiminde olduğunu göstermiştir. DNA sarmalının replikasyonu “replication origin” adı verilen bir noktadan başlamaktadır. DNA bu nokta aracılığı ile mezozoma bağlanmış olup, mezozomda replikasyon için gerekli enzimler bulunmaktadır. Replikasyonun hücrenin bölünmesi ile birlikte, düzenli bir biçimde gerçekleşmesi ise kromozomun belli bir yerinde bulunan özgül bir genin denetimi altındadır. Replikasyonda önce, mezozomdan itibaren iki DNA iplikçığı birbirinden ayrılmaya başlar ve ayrılan polinükleotid iplikçiklerinden 5' uçlusu, mezozomun yakınındaki ikinci bir noktaya bağlanır. Çember biçimindeki DNA (bakteri kromozomu) saatin ters yönünde dönerken, polinükleotid iplikçikler de bir yandan birbirinden ayrılıp, diğer yandan da ayrılan her bir iplikçik hemen kendi karşılığını (tamamlayıcı iplikçik) sentezlenir. DNA'nın dönüşü tamamlanıp iki polinükleotid iplikçığın ayrılması tümüyle gerçekleştiğinde, bakteri içinde birbirinin tıpatıp benzeri olan iki DNA sarmalı oluşmuştur. Bu sırada uzayan bakteri hücresinde, ana bakteri DNA'sının iplikçiklerinin sitoplazma zarında bağlı olduğu noktalar (mezozom)da birbirinden uzaklaşmışlardır. Bunu takiben önce sitoplazmik zar, arkasından hücre

duvarı içeriye doğru girinti yapar. Böylece bakteride transvers (uzayan bakteriyi enine ikiye bölen) bir membran ve duvar yapımı, dış tabakalardan içeriye doğru tamamlanarak içinde yeni sentezlenen nükleer materyal bulunan iki yavru hücre oluşur. Bakterilerde transvers membran o şekilde oluşur ki, DNA'nın replikasyonu ile meydana gelen iki yeni kromozomdan her biri yavru hücrelere gider ve bu hücreler birbirinin tıpatıp benzeri olur.

DNA'nın replikasyonu sırasında bir takım enzim ve proteinler görev almaktadır. Replikasyonun başlangıcında, başlatma kompleksi (*initiation complex*) adı verilen ve replikasyon noktası ile DNA giraz ve RNA polimeraz gibi enzimlerin de aralarında bulunduğu, çeşitli proteinler uygun yerlerde birikir. Oluşan polinükleotid zincirlerinin uzaması DNA polimeraz III, uç kısımlarından bağlanması ise DNA ligaz enzimleri aracılığı ile gerçekleşir. Bakterilerdeki kromozomal DNA'nın replikasyonu ile ilgili kurallar, ekstrakromozomal (kromozom dışı) DNA elemanları (plazmid, bakteriyofaj) için de geçerlidir. Bu şekilde, hücre içinde kromozomal DNA'dan bağımsız olarak bulunan ve kendi kendine replike olabilen DNA yapısındaki birimlere replikon adı verilir.

DNA üzerindeki genler gelişi güzel dizilmeyip, belirli bir düzen içinde bulunurlar. Birbiri ile ilişkili olanlar genellikle “operon” adı verilen gen gruplarını oluştururlar. Operonlarda birbiri ile çok yakın ilişkili bulunanların bir arada uyumlu çalışmalarını sağlayan yardımcı genler de bulunur.

Bir DNA molekülünün uzunluğu, bin baz çiftini tanımlayan kilobase pairs (kbp) ile ifade edilir.

DNA molekülünün ikinci önemli özelliği ise, gerektiğinde üzerinde bulunan nükleotid sırasına uygun özellikte ribonükleik asit (RNA) molekülleri oluşturularak, hücrenin biyolojik fonksiyonlarını yönetmektir (<http://www.med.gazi.edu.tr/egitim/donem1/dersler/bakterigenetigmycira k.htm>)

1.4 Ribonükleik asit (RNA)

Yapısı genel olarak DNA molekülüne benzer. DNA'dan farklı olarak yapısında deoksiriboz yerine riboz, Timin (T) yerine onun gibi bir pirimidin olan Urasil (U) bulunur. Ayrıca RNA molekülü çift iplikli bir sarmal olmayıp, tek iplikli bir polinükleotid zincirinden oluşmuştur. Bununla birlikte, bu iplikçiğin kendi üzerine katlanıp, karşılıklı gelen pürin ve pirimidin bazlarının (A-U ve C-G) birleşmesi sonucu, yer yer çift katlı RNA bölgeleri meydana gelir. Hücre içinde üç tip RNA bulunur:

- Mesaj ileten RNA (mRNA)
- Ribozomal RNA (rRNA)
- Transfer RNA (tRNA)

Mesaj ileten RNA (mRNA)

Her biri ayrı bir protein molekülünü yapımından sorumlu olan genlerdeki bilginin, proteinlerin yapım yeri olan ribozomlara ulaştırılması gerekir. DNA 'da bulunan ve her biri ayrı bir amino asidin yapımından sorumlu olan üçlü pürin ve pirimidin bazlarının karşısına , uygun bazların gelmesiyle (A-U, C-G, G-C v.s.) oluşan nükleotidler,

mRNA'yi meydana getirirler. DNA'nın tek iplikçığının kalıp olarak kullanılıp, RNA polimeraz enzimi aracılığı ile mRNA'nın oluşması işlemine transkripsiyon (kopya çıkarma) adı verilir. Genler böylece, oluşturdukları mRNA'ya kendilerinde bulunan protein yapımı ile ilgili bilgiyi aktarmış, yani yapılması istenen proteinin kalıbını vermiş olur (<http://www.med.gazi.edu.tr/egitim/donem1/dersler/bakterigenetigmycira k.htm>).

Ribozomal RNA (rRNA):

Hücredeki tüm RNA'nın yaklaşık %80'nini oluşturan rRNA, ribozomlardaki proteinlere bağlı olarak bulunur. Yapılarında protein ve rRNA bulunan ribozomlar, biri büyük diğeri küçük iki alt birimden oluşmuşlardır. Bakterilerde büyük birim 50S, küçük birim 30S total ribozom 70S büyüklüğünde olduğu halde, ökaryotik hücrelerde büyük birim 60S, küçük birim 40S ve total ribozom ise 80S büyüklüğündedir (<http://www.med.gazi.edu.tr/egitim/donem1/dersler/bakterigenetigmycira k.htm>).

Prokaryotlarda 3 ribozomal RNA molekülü var: 5S, 16S ve 23S. Bakterilerdeki 16S (~ 1600 nükleotid) ve 23S (~ 3000 nükleotid) rRNA'larda, sekans analizi yapmaya yarayan çok iyi korunmuş sekansta birkaç bölge vardır. rRNA'ların bazı korunmuş sekansları bakterilerde, mantarlarda, bitkilerde, hayvanlarda ve hatta kloroplast ve mitokondrilerde hiç değişmemiştir.

16S rRNA çok iyi korunmuş diziler içerir, hem de her türe göre değişen dizilere sahiptir. Bu değişken dizilerin PCR ile çoğaltılması sayesinde tür tayini mümkün olabilmektedir.

(<http://w3.gazi.edu.tr/web/erkoc/MIKROP/giris.pdf>)

Transfer RNA (tRNA)

Bakterilerde genetik materyalin küçük veya büyük bir bölümü bir bakteriden diğerine çeşitli mekanizmalar aracılığı ile aktarılıp, sonunda önemli genetik değişiklikler oluşabilmektedir. Verici bakteriden alıcı bakteri hücresine, bakteri genomunun aktarılması sonucu her iki bakteri hücresinin genetik özelliklerini birlikte içeren melez bakteriler meydana gelirler. Bakterilerde görülen bu olaylar sırasında, yüksek canlılarda olduğundan farklı olarak, iki hücrenin çekirdeklerinin tümü birleşmemekte, alıcı bakterinin kromozomu yalnız belli bir bölüm için diploid (benzer genlerden çift dizi taşınması) duruma geçmektedir. Kısmi bir zigot olarak da nitelendirilen melez bakteride, verici hücreden alınan genetik materyale ekzogenot, bunun alıcı hücredeki karşılığına ise endogenot denir. Alıcı bakteri DNA'sının replikasyonu sırasında, ekzogenot da replike olur ve aralarında meydana gelen çaprazlaşmalar sonucu, alıcının DNA'sına vericiden gelen ekzogenot eklenir. Bu bakteriden oluşacak yavru bakteriler, alıcı hücrenin genomuna taşırlar. Verici bakteriden aktarılan bir DNA segmentinin alıcının genomuna girip, alıcı bakteriye birtakım yeni özellikler kazandırması mümkündür. Böylece meydana gelen olaya rekombinasyon (yeni bileşim), oluşan melez bakteriye rekombinant (yeni bileşen) adı verilir (<http://www.med.gazi.edu.tr/egitim/donem1/dersler/bakterigenetigmycira k.htm>).

1.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction (PCR))

PCR, ilk olarak Saiki *et al.*, 1988, tarafından tanımlanan bir teknik olup moleküler biyolojide bir devrim yaratmıştır.

PCR yöntemi, nükleik asitlerin *in vitro* olarak çoğaltılmasını sağlayan yöntemdir. DNA replikasyonu, PCR yönteminde bir tüp içinde taklit edilir. Bu amaçla, bakteri hücresinde DNA replikasyonu için kullanılan enzimlerin işlevleri, farklı ısı döngüleri kullanılarak gerçekleştirilir. DNA replikasyonunun başlayabilmesi için ilk basamak, DNA çift zincirlerinin birbirinden ayrılmasıdır. Bakterilerde bu işlem helikaz tarafından gerçekleştirilirken, PCR yönteminde 94°C gibi yüksek bir sıcaklık uygulaması yapılarak, zincirlerin birbirinden ayrılması sağlanır. Bakteriyel replikasyon, uygun çalışma sıcaklığı 37°C olan DNA polimeraz enzimi tarafından yapılırken, PCR yönteminde yüksek sıcaklıklarda çalışabilen Taq polimeraz enzimi kullanılır.

PCR' da gerekli olan bileşenler;

1. Amplifiye edilecek hedef DNA dizisini içeren kalıp DNA,
2. Amplifiye edilecek hedef DNA dizisinin komplementeri olacak şekilde seçilmiş kısa primerler,
3. Zincirin uzama reaksiyonunu gerçekleştiren termostabil karakterde Taq DNA Polimeraz enzimi.
4. Enzimin çalışması için gerekli kofaktör olarak görev alan Mg iyonunu sağlayan MgCl₂.

5. Amplifikasyona göre değişen miktarda hazırlanılan dATP, dCTP, dGTP ve dTTP karışımı (dNTP).

(Temizkan ve Arda., 2004)

PCR yöntemi, farlı sıcaklıkların uygulandığı üç basamağın, birbirini takip eden döngüler şeklinde tekrarlanması esasına dayanır. Birinci basamak olan denatürasyon basamağında amaç, DNA çift zincirlerinin birbirlerinden ayrılmasıdır. Bu ayrılma, 94⁰C'lik yüksek sıcaklık uygulamasıyla gerçekleştirilir.

İkinci basamak olan bağlanma (annealing) basamağında sıcaklığın düşürülmesi ile primerler, çoğaltılacak olan hedef bölgenin her iki ucunda tamamlayıcı oldukları bölgelere tutunurlar. Primerler, hem PCR karışımındaki konsantrasyonları çok yüksek olduğundan, hem de boyları daha küçük olduğundan, ayrılan hedef DNA parçaları birbirine bağlanmadan önce hedef DNA'ya bağlanırlar. Bu aşamada primerlerin özgül olarak hedef DNA'ya bağlanabilmeleri için gerekli sıcaklık 50-70⁰C'dir. Bu sıcaklık kullanılan primerlerin nükleotid içeriğine göre değişir.

Üçüncü basamak olan sentez basamağında ise iki primerden itibaren 5'-3' yönünde tamamlayıcı DNA sentezi başlar. DNA sentezinin başlayabilmesi için sıcaklığın, Taq polimeraz enziminin optimum çalışma sıcaklığı olan 72⁰C'ye getirilmesi gerekir. Böylece Taq polimeraz, hedef DNA'ya tutunmuş olan primerin 3' ucundan itibaren zincire yeni nükleotidler ekleyerek tamamlayıcı zincir sentezine başlar. Her yeni eklenen nükleotidin 3' hidroksil ucu açıktadır ve bir sonraki nükleotid bu uca bağlanır. Bu işlem hedef DNA'nın her iki tek zincirinde

de gerçekleşir. Bu nedenle sentez 5'-3' yönünde diğerk uçtaki primer bağlanma bölgesini de geçerek devam eder. Oluşan bu yeni DNA parçalarına uzun ürün adı verilir. Yeni bir döngü için sıcaklık tekrar 94⁰C'ye yükseltildiğinde sentez işlemi sonlanır ve yeni oluşmuş çift zincirler tekrar birbirlerinden ayrılır. Birleşme ve sentez basamaklarının tekrar uygulanmasıyla, tek zincirlerden yeniden 5'-3' yönünde sentez başlar. Bu aşamada uzun ürünlerin bir ucu primer bağlanma bölgesi iken diğerk ucu primer bağlanma bölgesinin ötesine uzanmaktadır. Bu nedenle ikinci sentez basamağında primer bağlanma bölgesinden başlayan sentez, bir önceki döngüdeki diğerk primer bağlanma bölgesine kadar devam edebilir ve daha fazla uzayamaz. Bu nedenle bu döngüde oluşan DNA dizileri, iki primer bağlanma bölgesi arasındaki bölge olur ve kısa ürün olarak adlandırılır. Kısa rnler, çoğaltma için seçilmiş olan hedef DNA dizileridir. Denatürasyon, bağlanma ve sentez basamaklarının birbiri ardı sıra tekrarlanmasıyla kısa ürünler geometrik olarak çoğalır. Döngü sayısı "n" olarak tanımlanacak olursa, PCR sonrasında çift zincirli bir kalıp DNA'dan 2xn sayıda uzun ürün, 2ⁿ sayıda kısa ürün oluşur. Böylece toplam 40-50 döngü yapılması sonucunda, genom üzerinde seçilmiş olan hedef bölge milyarlarca kopya halinde oğaltılmış olur.

PCR yöntemi kullanılırken, çoğaltılacak olan hedef bölgenin seçimi büyük önem taşımaktadır. Birbirinden tamamen farklı organizmalarda bile birçok gende önemli derecede DNA homolojisi bulunabilmektedir. PCR için seçilecek olan hedef DNA, sadece saptanması istenen mikroorganizmada bulunan bir gen bölgesi olmalıdır. Özgül hedef gen bölgesi belirlendikten sonra ikinci önemli aşama, primerlerin seçilmesidir. Doğru primer seçimi, PCR ile yapılacak olan çoğaltma

işleminin başarılı olmasını etkileyen en önemli etkenlerden biridir. Bu amaçla ilk dikkat edilmesi gereken nokta primer dizilerinin, varlığı araştırılan mikroorganizma genomunda mutlaka sadece bir yerde bulunmasıdır. Primerlerin 3' ucu DNA polimerazın bağlanması ve sentezin başlaması için en önemli bölgedir. Bu nedenle primerlerin 3' ucundaki 6-7 nükleotidlik dizinin de genom üzerinde tamamlayıcısının olmaması gerekmektedir.

Primerlerin kendi üzerlerine bağlanabilme olasılıkları olmamalıdır. Primerler kendi içlerinde 4 veya daha fazla nükleotidin uyumluluk göstermesi durumunda, kıvrılarak kendi üzerlerine bağlanabilme olasılıkları da olmamalıdır. Özellikle 3' uçlarında iki veya daha fazla nükleotid uygunluk gösterirse DNA polimeraz bu uçlara bağlanarak primer dimer adı verilen küçük ürünlerin sentezlenmesine neden olur.

Primerlerin nükleotid içerikleri de, iyi bir amplifikasyon saptanmasında önemlidir. Primer dizileri içinde tekrarlayan diziler olmamalı, bağlanma ve ayrılma sıcaklıklarında uyum sağlanabilmesi için GC/AT oranı kalıp DNA'daki orana yakın olmalıdır. İki primerin ayrılma-bağlanma sıcaklıkları birbirine mümkün olduğunca yakın olmalıdır. PCR döngüsünde primerlerin bağlanma aşamasındaki sıcaklık, bağlanma sıcaklığı düşük olan primere göre ayarlanmalıdır.

Magnezyum iyonu, DNA polimerazın çalışmasını sağlayan önemli bir kofaktördür. İki pozitif yük taşıyan magnezyum iyonu, iki DNA zincirinin arasına girerek negatif yükleri çeker ve bir araya getirir.

1.5.1 PCR çeşitleri

RT-PCR:

RT-PCR yöntemi ile RNA hedeflerinin çoğaltılması sağlanır. Hedef RNA ilk olarak revers transkriptaz enzimi ile cDNA'ya çevrilir. Bundan sonraki aşamada cDNA kullanılarak normal PCR ile çoğaltma işlemi yapılır.

Nested PCR:

Duyarlılığın artırılması amacıyla tasarlanmış olan bu yöntemde iki farklı primer seti kullanılır. İlk 15-30 döngüde uzunca bir hedef bölge çoğaltıldıktan sonra, bu bölge içindeki daha küçük bir hedef bölgenin çoğaltılması, ikinci primer kullanılarak sağlanır. İki aşamalı bu çoğaltma sonrasında yüksek bir duyarlılıkla ürünler elde edilmiş olur. Fakat ilk amplifikasyon sonrasında elde edilen ürünler, ikinci amplifikasyon için kullanılan iç primer setini içeren tüpe aktarılırken dikkatli çalışılmaması durumunda, sonraki deneyler için kontaminasyon riski oluşturabilir.

Multipleks PCR:

Multipleks PCR yöntemiyle tek bir tüp içerisinde iki ya da daha fazla hedef bölgeye özgül primerlerin kullanılmasıyla farklı çoğaltma ürünleri elde edilebilmektedir. Ancak kullanılacak olan primerlerin benzer bağlanma sıcaklığına sahip olmalarına ve birbirlerine komplementer bölgeleri olmamasına dikkat edilmelidir. Multipleks PCR yöntemi aynı klinik örnek içindeki farklı mikroorganizmaların tanısı için kullanılacağı gibi, aynı mikroorganizmanın farklı hedef bölgelerini saptayabilmek için de kullanılabilir.

Hot-Start PCR:

PCR’da karşılaşılan en önemli sorunlardan biri, özgül olmayan çoğaltmaların meydana gelmesidir. Bunun en önemli nedenlerinden biri primerlerin daha ilk amplifikasyon basamağından önce, özgül olmayan bölgelere bağlanmasıdır. Hot-Start PCR yöntemi, bu bağlanmalar sonrasında sentezin başlamasını önleyebilmek için geliştirilmiş bir yöntemdir. Bu yöntemde amaç, Taq polimeraz enziminin 94°C’lik denatürasyon basamağından sonra çalışmaya başlamasını sağlamaktır. Böylece ilk denatürasyon öncesindeki olası özgül olmayan primer bağlanmaları, Taq polimeraz henüz işlev görmediği için sentez ile sonuçlanmayacaktır. Taq polimerazın denatürasyon basamağı sonrasında çalışmaya başlamasını sağlayabilmek için kullanılan stratejilerden biri, sıcaklık 94°C’ye çıkarılıncaya kadar enzim aktivitesini durduracak Taq polimeraza özgül monoklonal antikorların kullanılmasıdır. Denatürasyon sıcaklığına çıkıldığında enzim üzerindeki inhibitör etki ortadan kalkmakta ve normal çalışmasına başlamaktadır. Diğer bir strateji de, 94°C’de tetiklenen konformasyonel değişikliklerle normale dönebilen modifiye edilmiş inaktif Taq polimeraz enziminin kullanılmasıdır.

Broad-Range PCR:

Özellikle bir enfeksiyon varlığını gösterebilmek için tasarlanmış bir yöntemdir. Bu yöntemde geniş bir bakteri veya virus topluluğunun tamamına özgül universal primerler kullanılarak, ortak bir gen bölgesi çoğaltılır. Hedef bölge olarak genellikle iyi korunmuş bir bölge olan 16 S rRNA küçük ünitesi seçilir. Böylece broad-range PCR işlemi sonrasında incelenen klinik örnekte enfeksiyöz bir ajan olup olmadığı anlaşılır.

Cobas Amplicor Sistemi:

Ticari olarak geliştirilmiş olan bu sistemde öncelikle hedef nükleik asit bölgesi biyotin ile işaretli primerlerle çoğaltılır. Çoğaltma sonrasında ampliconlar denatüre edilir ve elde edilen tek zincirler, özgül problemlerle hibridize edilir. Bunu takiben avidinle bağlı peroksidaz konjugatı, biotinle işaretli amplicona bağlanır. Bağlanmış konjugat, peroksit varlığında 3,3' 5,5'-tetrametil benzidin ile reaksiyona girerek renkli bir kompleks oluşturur. Sonuçlar fotometre ile ölçülerek değerlendirilir. Bu işlemlerin tamamı, kapalı bir sistem olan Amplicor cihazı (Roche Diagnostics) içerisinde gerçekleştirilir.

Real-Time PCR:

Çoğaltılan ürünlerin elektroforez yapılmadan saptanmasına yönelik olarak yapılan çalışmalar sonucunda, real-time PCR yöntemi ve yöntemi otomatize PCR sistemleri geliştirilmiştir. Real-time PCR yöntemi, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalinin ölçülmesiyle, kantitatif sonuç alınabilen bir PCR yöntemidir. Böylece hedef bölge, elektroforeze gerek kalmadan kısa bir süre içinde saptanabilmektedir. Aynı cihaz içerisinde hem çoğaltma işleminin, hem de çoğaltılan ürünleri saptama işleminin yapılabilmesi, bu yöntemi çok pratik bir yöntem haline getirmiştir. Ayrıca tüpler açılmadan test tamamlandığı için kontaminasyon riski de azalmaktadır. Real-time PCR'da amplifikasyon sonrasında elde edilen ürün varlığının saptanması çeşitli şekillerde yapılabilir.

1.6 Elektroforez

Elektroforez, moleküler teknikler içinde belki de en sıklıkla kullanılan fiziksel yöntemdir. Moleküllerin birbirinden ayrılması ve dolayısıyla tanımlanabilmesi için kullanılır. Elektroforez fikri, negatif yüklü moleküllerin pozitif yüklüleri ve pozitif yüklü moleküllerin negatif yüklüleri çekmesi esasına dayanır. Elektroforez için üzerlerinde yük taşıyan molekülleri su dolu bir tanka koyar, tankın iki kenarına biri pozitif diğeri negatif iki elektrod daldırıp elektrik akımı uygularız. Bu durumda molekülümüz negatif yüklüyse pozitif elektroda, pozitif yüklüyse negatif elektroda doğru hareket eder. Elektrik akımını ne kadar büyük uygularsak moleküllerin hareket hızı artar. Öte yandan bir molekül ne kadar büyükse hareketi o kadar yavaşlar.

Sıvı bir ortamda moleküllerin birbirinden ayrılarak saptanması mümkün olmadığı için, elektrik akımı altında moleküllerin büyüklüklerine göre ayrılmaları amacıyla daha katı ve hız kısıtlayıcı ortamlar kullanmak gereklidir. Bu amaçla en sıklıkla jel elektroforez yöntemleri kullanılır. Moleküller mikrobiyolojide kullanılan jel tipleri agaroz ve poliakrilamiddir. Agaroz jeller genellikle DNA ayırımları için kullanılır. Poliakrilamid jeller ise DNA yanında protein elektroforezi için de kullanılır. Agaroz ve poliakrilamid jeller değişik şekil, ebat ve yoğunlukta hazırlanabilirler. Bu değişkenlere karar vermek için ayrılması düşünülen molekül boyutları göz önüne alınmalıdır.

1.6.1 Elektroforez çeşitleri

Agaroz Jel Elektroforezi: Agaroz deniz alglerinden elde edilen D-galactose, 3,6-anhydro L-galactose moleküllerinin tekrarlayan polimerleridir. Sulu ortamda kaynatılarak eritilir ve soğutulduğunda yarı katı bir ortam jel oluşturur. Agaroz ile oluşturulan gözenekler akrilamide göre çok daha büyük olduğu için DNA gibi büyük moleküllerin ayırımında kullanılır.

Agaroz jel elektroforezi Tris-asetat-EDTA (TEA), Tris-borat-EDTA (TBE) ya da Tris-fosfat-EDTA (TPE) gibi tampon solüsyonları içinde gerçekleştirilir. TAE'nin tamponlama gücü diğerlerine göre daha düşüktür. Öte yandan DNA molekülleri TAE içinde %10 daha hızlı ilerleyebilmektedir. Agaroz jel elektroforezlerinde daha çok TAE kullanılmaktadır. İçerisinde asetik asitte eritilmiş Tris pH 8.0 ve EDTA vardır.

Poliakrilamid Jel Elektroforezi: Poliakrilamid, agarozun aksine tamamen sentetik olarak hazırlanan ve molekülleri ayırma gücü agarozdan daha fazla olan bir kimyasal bileşiktir. Serbest radikallerin varlığında (amonyum persülfat ile sağlanır) ve stabilize edici madde TEMED ile bir zincir reaksiyonu gerçekleşerek uç uca eklenip uzun zincirler oluşturur. Zincirlerin uzunluğu polimerizasyon reaksiyonuna katılan akrilamidin konsantrasyonuna bağlıdır.

Poliakrilamid jeller mutlaka iki cam arasına dökülerek polimerleştirilir. Bunun en büyük nedeni polimerizasyon için oksijen temasının bulunmaması gerektiğidir. Elektroforez dikey olarak yapılır.

1.7 DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi, mikroorganizmaların nükleik asit dizilimlerinin belirlenmesi için altın bir standart yöntemdir. DNA dizi analizinde dört temel basamak vardır. İlk olarak, seçilmiş olan hedef gen bölgesi PCR ile çoğaltılır. Bu basamağı, hedef nükleik asitlerin işaretlenmesi, elektroforez ile ayrıştırılması ve elde edilen bilginin anlamlı DNA dizisi haline dönüştürülmesi izler.

DNA dizi analizinden yüksek verim alınabilmesi için ilk basamak olan PCR başarılı bir şekilde başarılmalıdır. Daha sonraki basamaklardan iyi sonuç alınabilmesi, bu basamaktaki yüksek DNA eldesine bağlıdır. Hedef DNA bölgesindeki nükleotidlerin ayrıştırılması için sıklıkla kullanılan yöntem, zincir sonlandırma yöntemidir (Sanger Yöntemi). Bu yöntemde, sabit bir nokta başlangıç seçilecek biçimde farklı uzunlukta DNA parçaları elde edilir. Yöntemde, ayrı ayrı tüplerde A,T,G ve C nükleotidlerinden sadece birisi ile sonlanan parçalar elde edilmesi temel alınır. Bu temelden yola çıkarak, her tüpe PCR için gerekli primer, Taq polimeraz enzimi, deoksinükleotid trifosfatlar (dNTP), kalıp DNA ve dideoksinükleotid trifosfatlar (ddNTP) eklenir. PCR karışımından farklı olarak ddNTP'ler, deoksiribozun 3' ucundan fosfodiester bağı yapacak olan 3. karbondaki oksijenin çıkarılması ile elde edilirler. Taq polimeraz sentezi sırasında bunları kullanabilir ve zincire ekleyebilir, ancak bunların 3' ucuna başka nükleotid eklenemediği için, ddNTP'lerin zincire eklendiği noktalarda sentez sonlanır. Hazırlanan dört tüpte, ddATP bulunan tüpte adeninle sonlanan parçalar, ddTTP bulunan tüpte timinle sonlanan parçalar, ddGTP bulunan tüpte guaninle sonlanan parçalar ve

ddCTP bulunan tüpte sitozinle sonlanan parçalar olmak üzere farklı tüpler meydana gelir.

Bu karışımlar elektroforezde yan yana yüklenip ayrıştırılarak DNA dizisi saptanır. Tüm parçalar birbirlerinden sadece tek bir nükleotidle farklı olduklarından, yüksek ayrıştırma gücü olan bir yöntemle ayrılmaları gereklidir. Elde edilen parçaların saptanması, oligonükleotid pirimerlere veya dideoksi terminatör nükleotidlere yapıştırılan floresan veren maddeler sayesinde olur. Floresan madde ile işaretli primerlerin kullanılmasıyla, floresan madde ile işaretli ampikonlar elde edilmiş olur. Çoğaltma işlemi bittikten sonra. Elektroforez öncesinde bir saflaştırma işlemi yapılarak, ortamın saptama işlemini etkileyecek artıklardan arındırılması sağlanır. Elde edilen ürünlerin saptanması üç farklı şekilde yapılabilir.

1. Jel Elektroforezi: İki cam tabaka arasına dökülen, poliakrilamid jelde örneklerin ayrıştırılması esasına dayanır. Okuma uzunluğu, çözünürlük ve jelin stabilitesi polimer içeriğine bağlıdır. Bu yöntemi kullanan ticari olarak geliştirilmiş çeşitli otomatize sekans analiz cihazları mevcuttur.

2. Kapiller Elektroforez: Jel hazırlanmasına gerek olmaması, otomatize örnek yükleme sistemi bulunması ve daha az iş gücü gerektirmesi, Jel Elektroforesine göre bu yöntemin avantajıdır. Otomatize kapiller elektroforezli sekans cihazlarında, örnekler kapiller tipler içinde yürütülürken oluşan floresan ışıması, sürekli olarak monitörize edilir.

3. Pirosekanslama: Bu yöntem, DNA sentezi sırasında oluşan pirofosfatların luminometrik olarak saptanması esasına dayanır. Öncelikle hedef DNA, biotin işaretli primerler kullanılarak çoğaltılır.

Elde edilen biotin işaretli ampliconlar, streptavidin bağlı boncuklara bağlanır. Kimyasal denatürasyon sonrasında tek zincirli hedef DNA'lar, Klenow DNA polimerazı kullanılarak, uygulanan DNA sentezinde pirofosfat moleküllerinin oluşması sağlanır. Oluşan pirofosfatlar, ATP oluşturmak için adenosin 5'-fosfosülfat ile birlikte, ATP sülfirilaz enziminin substratı olarak kullanılır. ATP oluşması sonucunda, lusiferinin oksilusiflerine dönüşmesi ve ışıma olması sağlanır.

Her üç yöntem sonrasında elde edilen elektroforetik dizilim bilgisinin anlamlı bir DNA dizisi haline dönüştürülmesi, bilgisayar algoritmaları kullanılarak gerçekleştirilir (Temel Moleküler Tanı Yöntemleri Kursu Hacettepe Üniversitesi Tıp Fak: Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD Lab. 23-24 Eylül 2008 Ankara).

1.8 Mavi-Yeşil Alglerin Genel Özellikleri

Mavi-yeşil algler, 1969 yılında Whittaker tarafından yapılmış olan beşli alem sisteminde ilk basamağı oluşturan Monera alemi içinde incelenmektedir. Canlılar dünyasında hücre özelliklerine, morfolojik görünüşlerine göre yapılan sınıflandırmada mavi-yeşil alg üyeleri ve bakteriler prokaryotik organizmalar olarak ele alınarak aynı alem içinde incelenmektedir. Son zamanlarda yapılan üçlü alem sistemli sınıflandırmada ise Eubacteria grubuna dahil edilmişlerdir. Bakteriyologlar tarafından bakterilerle birlikte incelenen mavi-yeşil algler 'Siyanobakteri' (Cyanobacteria) olarak isimlendirilmektedir. Botanikçiler tarafından ise bitki olarak kabul edilerek alglerle birlikte ele alınmakta ve Cyanophyta divisiosu olarak incelenmektedir.

Sistematikteki yeri araştırmacılar tarafından hala tartışılan mavi-yeşil alglerin, son yıllarda yapılan moleküler düzeydeki araştırmalarla, DNA ve ribozom analizleriyle bulunduğu yer konusunda yeni fikirler ortaya atılmaktadır (Ulcay, 2005).

Mavi-yeşil alglerle bakterilerin ortak özellikleri, prokaryot canlılar olarak gerçek çekirdek ve plastidlere sahip olmamalarıdır. Mavi-yeşil alg üyeleri sahip oldukları klorofil a, fikosiyanin, fikoeritrin gibi pigment maddeleri ile bakterilerden ayrılır, metabolizma olaylarının durumu ile diğerk alglere yakınlık gösterirler. Hücreleri gerçek bakterilerden daha büyüktür, boyutları 1µm ile 10 µm arasında olabilir ve bakterilerden farklı olarak müsilağ bir kınla evrilidirler. Mavi-yeşil algler fotosentetik aerob turlar (fotosentetik gerçek bakteriler ise anaerob turlar)(Ulcay, 2005).

Mavi yeşil algler (Siyanobakteri), klorofil a, fikobiliprotein ve depo maddesi olarak glikojen içeren, hücre çeperinde amino şekerler ve amino asitler bulunduran organizmalardır (Sukatar, 2008).

Mavi yeşil algler (Siyanobakteri) basit olarak, tek hücreli, serbest yaşayan ya da müsilağ kılıf içerisinde bulunan organizmalardır. Evrim sonucunda trikom olarak adlandırılan tek sıra hücrelerden oluşmuş yapılar meydana getirmişlerdir. Trikom bir müsilağ kılıf ile çevrili ise filament (ipliksi) olarak adlandırılır. Bir filament birden fazla trikomdan oluşabilir (Sukatar, 2008).

Tek hücreli türlerde yaşam faaliyetlerini geçici olarak durduran tekli hücreler mesela pikoplanktonik türler (*Synechococcus sp.*) ya da onlarca hatta yüzlerce hücrenin bir araya toplandığı gruplar vardır

(*Microcystis aeruginosa*). Diğer tek hücreli türlerde az veya çok sayıda bireyin bir araya gelerek çok tabakalı polisakkarit yapılı ince kapsül veya kılıf ile çevrili ya da çevrili olmayan koloniler oluşturduğu görülür (*Merismopedia* sp., *Gloeotheca* sp., *Gloecapsa* sp.) (Ulçay, 2005).

Mavi yeşil alglerin (Siyanobakteri) hücre çeperi birkaç tabakadan oluşur. Mavi yeşil alglerin (Siyanobakteri) hücre çeperinin temel bileşeni peptidoglukan (=murein, glikopeptid=mukopeptid)'dır. Sadece en içteki iki tabaka tüm mavi yeşil alglerde (Siyanobakteri) aynıdır. Dışta bulunan çeperin yapısı, çevre koşullarına ve salgılanan müsilağ miktarına göre değişim gösterir.

Mavi yeşil alglerdeki (Siyanobakteri) hücre çeperi yapısının temel olarak gram negatif bakterilerin hücre çeperi ile büyük benzerlik göstermesi nedeniyle bu iki grup arasında bir akrabalığın olduğu düşünülmektedir. Hücre çeperinin dışında bulunan müsilağ katman (örtü ya da kapsül) fibrilli yapıdadır. Bu katmanın görevi hücreleri kuraklığa karşı korumaktır. Ayrıca hücrenin kayarak ilerlemesinde de işlev görür. Kılıflar bazen renklidir. Kırmızı katmana sahip algler genellikle yüksek asidik topraklarda, mavi katmana sahip olan algler ise bazik topraklarda gelişim gösterirler. Sarı ve kahverengi örtüye sahip olan algler ise yüksek tuz konsantrasyonlu bölgelerde bulunurlar (Sukatar, 2008).

Mavi-yeşil algler özellikle sıcak kaynak sularında pH'ı 6'nın üzerinde batık substratların üzerinde dikkat çekici ve sık unialgal kütle benzeri örtüler oluşturduğu yerlerde yoğundurlar (Castenholz R.W., 1969).

Mavi-yeşil algler arasında gelişen bir kanıt; N-fiksasyonu, heterosiste sahip türlere bağlıdır ve hatta heterosistin kendisine bağlıdır. İstisnalar görülebilir. 54 °C'nin üzerinde gelişen mavi-yeşil algler arasında, sadece *Mastigocladus laminosus* heterosiste sahiptir ve aksenik (bakterisiz) kültürlerde ve serbest hücre preparasyonlarında N-fiksasyonu gösterilmiştir. Stewart göstermiştir ki sıcak kaynak sularının akış yolunda azot fiksasyonu *Mastigocladus* türü egemenliği altındadır (Castenholz R.W., 1969).

Bakterilerde bulunan birçok protoplazmik yapı mavi yeşil alglerde (Siyanobakteri) de bulunmaktadır. Protoplazmanın merkezinde histonlar tarafından paketlenmemiş, dairesel DNA fibrilleri bulunur. Tek hücreli mavi yeşil alglerde (Siyanobakteri) DNA'nın miktarı 1.6×10^9 ile 8.6×10^9 dalton arası değişmektedir. Bu miktar bakterideki DNA miktarına ($1.0 \times 10^9 - 3.6 \times 10^9$ dalton) oldukça yakındır (Sukatar , 2008).

Mavi yeşil alglerin (Siyanobakteri) fotosentezinde başlıca ışık yakalayan sistemin bileşenleri, tilakoid zarda bulunan klorofil a ve tilakoidlerin dış zar yüzeyine bağlı olarak bulunan ve suda çözünebilen kromoproteinler olan fikobiliproteinlerdir (Sukatar , 2008).

4 tip fikobiliprotein bulunur: (1) C-fikosiyanin, (2) allofikosiyanin, (3) C- fikoeritrin ve (4) fikoeritrosiyanin. Tüm mavi yeşil algler (Siyanobakteri) ilk ikisine sahiptirler ancak diğer ikisi bazı türlerde görülür. Fikobiliproteinlerin konsantrasyonu, ışık şiddetine ve büyüme koşullarına göre değişim gösterir (Sukatar, 2008).

Eşysiz üreme, hormogonium ya da endospor oluşumu ya da kolonilerin fragmentasyonu ile gerçekleşir.

Tüm gerçek filament oluşturan siyanobakterilerde gözlenen hormogonyumlar, küçük trikom parçalarıdır ve ana filamentten koparak meydana gelir. Başka bir ortama tutunarak yeni bir filament meydana getirir. *Oscillatoria* ve *Cylindrospermum* gibi bazı basit iplikli siyanobakterilerde tüm filament parçalanırken, diğerlerinde hormogonium özelleşmiş dalların ucunda üretilir. Bazı alglerde özelleşmiş ayrılma diskleri ya da nekritler hormogonyumun ana filamentten ayrılmasına yardımcı olurken, diğerlerinde filament parçalanır.

Siyanobakterilerde gerçek üreme yapıları endosporlardır. Bunlar protoplastın bölünmesiyle oluşur. Sonuç olarak düzensiz spor yığınları (*Dermocarpa*) ya da spor sıraları (*Chamaesiphon*) (bazen eksospor ya da tomurcuklanma olarak adlandırılır) (Sukatar, 2008).

1.9 Termal Alglerle İlgili Çalışmalar

Termal kaynaklar en yoğun halde Kuzey Amerika'daki Yellowstone Plato'sunda, Yeni Zelanda'nın Kuzey Adasında, İzlanda ve Japonya'da görülmektedir. Sıcak kaynakların büyük çoğunluğu Amerika'nın genelinde, Great Plains'in doğusunda, And Dağları sınırında, İtalya'da, Cezayir-Tunus arasında, Yunanistan'da, Türkiye'de, Orta Amerika'nın bir kısmında, Hindistan'da, Orta Asya'da, Endonezya'da, Malenazya'da, Filipinler'de, Kamchatka'da geniş bir yayılım göstermektedirler (Castenholz R.W., 1969).

Sıcak sular çok fazla literatüre sahip olmamakla birlikte ilk termal alg çalışmalarından biri Amerika'da bulunan Yellowstone milli parkının

alg ve diğ er canlı grupları üzerinedir. 1897 yılında Davis tarafından yapılan çalışmalarda, renkli türler Cyanophyceae sınıfı içinde, renksiz ve en ilkel alg grupları Schizomycetes altında bakteri ya da en ilkel mantar grupları olarak ayrılmışlardır. Bu araştırmada 85 C'nin üzerinde canlı bulunmadığına dikkat çekilmiş olup hangi sıcaklık aralıklarında hangi renk canlı gruplarının yaşadığı belirtilmiştir. 1898'de Tilden'in Batı Amerika'nın termal algleri üzerine yaptığı çalışmasında 11 cinse ait 17 mavi-yeşil alg türü tespit edilmiştir. 1934 yılında Flowers yapmış olduğu çalışmasında Büyük Tuz Gölü etrafında bulunan 7 kaplıcada 19 mavi-yeşil alg türü tespit etmiştir. 1941'de Gray tarafından yapılan bir araştırmada Arkansas'ta bulunan iki sıcak kaynağın alg yapısında 16 cinse ait 36 tür tespit edilmiştir.

Termal bölgelerde yaşayan türlerle ilgili ilk ayrıntılı çalışmaların öncülerinden biri Castenholz olmuştur. 1967 yılında yayınlanan makalesinde termofilik *Oscillatoria* cinsinin özelliklerini incelemiştir. Stockner, Yellowstone parkı ve çevresinde yaptığı çalışmalarda alg topluluklarını incelemiş ve termal bölgelerdeki alg büyümesi ve ışık arasındaki ilişkiyi araştırmıştır. Termal alg çalışmaları ile ilgili en geniş bölgeye ait yapılan çalışmalardan bir tanesi 1968 yılında Hindistan'ın termal mavi-yeşil alglerini araştıran Vasishta'ya aittir. Bu  alışma da belli sıcaklık aralıklarında yaşayan mavi-yeşil alglerin tür ve cins sayıları belirtilmiştir. Ayrıca kaynak ağızlarının ayrıntılı sıcaklık ve kimyasal analizleri verilmiştir.

1969 yılında Castenholz tarafından "Termofilik mavi-yeşil algler ve termal  evre" isimli çalışma yapılmış ve termal kaynaklar her yönden detaylı bir şekilde araştırılmıştır. Castenholz'un aynı yayınlanan

araştırmasında ısının diğer termal kaynak ağızlarına göre yüzeyde daha düşük olduğundan tür sayısının daha sınırlı olduğu tespit edilmiştir. Laboratuvar ve arazi çalışmaları yüksek sıcaklığa adaptasyonla ilgili çalışmalara dikkate değer bir boyut kazandırmıştır. Ayrıca çoğu sıcak kaynak organizmaları, yüksek tuzluluğa ve belirli iyonların yüksek konsantrasyonuna adaptasyon gösterdiği belirtilmiştir. Kısmen magmatik orijinli oluşu nedeniyle çoğu termal sulara göl ve akarsu yüzey sularından farklı bir kimyasal özellik kazandırdığı anlaşılmıştır (Castenholz R.W., 1969).

Sperling 1975 yılında kış aylarında güney İzlanda’ da sıcak kaynaklardaki algal ekolojisini incelemiştir. Buna göre alg gruplarının büyümesinde yaz-kış ayları arasındaki farkı ortaya koymuştur. Mitchell 1974 yılında sıcak kaynaklarda termofil canlıların evrimini araştırmış ve bu kaynaklarda yaşayan canlılardan özellikle mavi-yeşil alglerin uyumunu ve karakteristiklerini karşılaştırmalı olarak göstermiştir. Mitchell birçok termofil canlının orjininin aynı olduğunu ama bu canlıların karakteristik sıcaklık limitlerinin farklılık gösterdiğini belirtmiştir. 1982 yılında Kullberg sıcak kaynak ağızlarında yüksek sıcaklıklarda yaşayan 4 dominant mavi-yeşil alg türü belirlemiştir. Bu türler: *Mastigocladus laminosus*, *Phormidium laminosum*, *P. angustissimum*, *Synechococcus lividus* olup son türün 60 °C’de dominant olduğu belirtilmiştir. Raven ve Geider 1988 yılında ısı ve algal büyümesi üzerine yaptığı çalışmalarda sıcaklığın canlı büyümesi üzerine etkisini, enzimlere etkisini, ışığın canlılara etkisini ve elektron taşınmasında sıcaklığın etkisini ayrıntılı olarak anlatmaktadır.

Castenholz, 1996 yılında yaptığı farklı araştırmada termofilik mavi-yeşil alglerde endemizm ve biyolojik çeşitliliği çalışmış, ayrıca endemik ve kozmopolit olan termal mavi-yeşil alg türlerini belirlemiştir. Son zamanlarda termal ortamlardaki literatür çalışmaları azalmış ve sıcaklık kaynaklarda yaşayan türlerin özellikleri daha detaylı incelenmeye başlandığı belirtilmiştir. Ward ve Castenholz, 2000 yılında jeotermal çevrelerde yaşayan mavi-yeşil algleri tüm yönleriyle incelemişlerdir. Termal ortamlarda yapılan bu çalışma son yıllardaki en detaylı çalışmadır (Ulçay, 2005).

Setchell ve Nash Yellowstone sıcak kaynağında, 73 ve 75 °C 'nin üzerinde mavi-yeşil alg bulunmadığını belirtmişlerdir. Kempner Yellowstone'da ki birkaç bitişik kaynaktaki 73 °C nin üzerinde hiçbir şeye rastlamamıştır ve bu sıcaklığın yaşam için üst limiti gösterdiği sonucuna varmıştır (Castenholz R.W., 1969).

Castenholz, asidik olmayan sıcak kaynakların bulunduğu termal alanlarda birkaç cm' ye varan kalınlıkta değişik renkte, jel gibi ve kalkerli örtüler oluştuğunu belirtmiştir. En üst katmanlarını fotosentetik mavi-yeşil algler oluşturmaktadır. Bu örtülerin dikkat çekici görünüşleri, açık yeşil, kahverengi, kırmızı, turuncu ve sarı renklerinde olmasından kaynaklanır. Bu geniş örtüler, yüksek sıcaklıklarda açık bir bozunma olmaksızın çoğalırlar. Bu örtüler, geniş bir şekilde, hücre dışı jelatinimsi materyalleri ile tutunan yaşayan organizmalardan oluşmaktadır. Mavi yeşil algler genellikle ilk birkaç milimetrede veya daha aşağısında bulunurlar ve geri kalanını da turuncu, sarı, kırmızı veya ten rengi filamentli bakteriler oluşturur. Fotosentetik mavi-yeşil alglerin 73-74 °C

sabit sıcaklıkta, fotosentetik olmayan bakterilerin ise 95⁰C geliştiği bilinmektedir (Castenholz R.W., 1969).

1966 yılında Thomas D. ve M. Lousie Brock; Yellowstone ve İzlanda'daki alkalın sıcak kaynaklarında termal katmanlaşma boyunca sürekli alg ürünlerini ve diğer materyalleri klorofil, ribonükleik asit ve protein ölçümleriyle belirlemişlerdir. Yellowstone'dan alınan sudan bu üç materyal 51 ve 56 ⁰C aralığında maksimum düzeyde üretilmiştir. Bu aynı zamanda termal tabakada kütle birikimin gözle görülür şekilde en çok artış gösterdiği bölgedir

Brock; ayrıca klorofil yardımıyla fotosentetik verimi belirlemiş ve fotosentetik oranları grafiğe dönüştürmüştür. En iyi verimlilik 40 ile 50 ⁰C arasında belirlenmiştir.

Sargent, yüksek yoğunluktaki beyaz ışığın veya geniş spektral bantların *Gleocapsa montana*'da koyu mavi-yeşilden sarıya bir renk değişimine neden olduğunu bulmuştur. Klorofil değişimi sadece bir kaç hücrede gözlenen klorofil azalışı ile açıklanabilir olduğu düşünülmektedir. *S. lividus* ve *A. nidulans* yüksek ışık yoğunluğunda gelişirler, klorofildeki azalmayla fotosentetik tillakoidler de azalma gözlemlendiği belirtilmiştir. Artan ışık yoğunluğuyla birlikte görülen klorofildeki azalma, fikoeritrin miktarında da önemli bir azalmaya neden olduğu belirtilmektedir. Böylece; *O. terebriformis* öncelikli olarak büyük miktardaki fikoeritrin nedeniyle, düşük ışık yoğunluğunda koyu kırmızı-kahverengi bir renk aldığı belirtilmiştir (Castenholz R.W., 1969).

Bir termofilik siyanobakteri olan *Myxosarcina concinna* Printz'den elde edilen fikobilizomların (PBSs) temel polipeptid bileşenleri

incelenmiştir. PBS özünden elde edilen (core) üç allofikosiyanın poliakrilamid jel elektroforez gradienti (PAGE) yöntemiyle hazırlanarak spektral özelliklerinden yola çıkarak 684/685 nm ve 77 K de maksimum floresans salınımına (yayılımına) sahip olduğu belirtilmiş ve allofikosiyanın B (AP-B) altbirimini gösterilmiştir (Sun and Wang, 2003).

Sıcak kaynaklardan izole edilen filamentli siyanobakteri *Phormidium* sp. ve tek hücreli siyanobakteri *Synechococcus* sp'nin boya biyobirikim yetenekleri incelenmiştir (Sadettin S. ve Dönmez G., 2006)

Yellowstone Milli Parkı'ndan toplanan bir termofilik siyanobakteri cinsi olan *Chlorogleopsis* sp. (veya SC2)'nin mikroalgal CO₂ biyofiksasyonu için potansiyel aday olduğunu tanımlanmıştır. Sonuç olarak SC2'nin CO₂-azaltma fotobiyoreaktörlerinde kullanım için ümit verici bir termofilik siyanobakteri olduğu belirlenmiştir (Ono E., ve Cuello J. L., 2007).

Kommunité DNA'sındaki genotiplerden 16S rRNA tanımlı genlerin ayrılması DGGE ile başarılmıştır. 36 sekanslar DGGE bantlarından çıkarılmıştır. Filogenetik analizler, *Calothrix*, *Cyanothece*, *Fischerella*, *Phormidium*, *Pleurocapsa*, *Oscillatoria* ve *Synechococcus* cinslerinin içinden, mezofilik karşılıklarından ayrılarak oluşan yeni termofilik nesilleri gösterilmiştir (Hongmei J. et. al., 2005)

M.limosus'un C-fikosiyanınleri jel filtrasyon ve iyon değişim kromatografisi ile izole edilmiştir. Protein; amino asit bileşimi, en küçük moleküler ağırlık, amino-terminal uç grupları, alt birim bileşimleri ve spektral özelliklerine göre nitelendirilmiştir (Binder A. et al., 1972)

Çok ince trikomlu kısmen halofilik, tuza dayanıklı ve termofilik yeni bir siyanobakteri cinsine ait 4 tür üzerine 16S rRNA gen sekansına dayanan filogenetik analizler bu türlerin yakından ilişkili (%99) olduklarını göstermiştir ve bu türler için *Halomicronema excentrium* önerilmiştir (Abed M.R.R., *et al.*, 2002)

Bir termofilik siyanobakteri türü, PCC7518, ve *Mastigocladus laminosus* HTF' olarak tanımlanan türde heterosist ve dallanma olmamasının nedenini araştırmak için yapılan 16S rRNA sekans analizinde bu türün, heterosistli türler kümesine ait olduğu anlaşılmıştır. Heterosis üretme yeteneğinin kaybolmasının mutasyon sonucu olabileceği düşünülmüştür (Wilmotte A., *et al.*, 1993)

Üç kültür koleksiyonu türlerinden ve hipersalin ortamda izole edilmiş on yeni saynobakteri türlerinin morfolojileri, fizyolojileri ve 16S rRNA gen sekansları incelenmiştir. Yapılan çalışmalar filogenetik olarak uyumlu siyanobakteri türlerinin fizyolojileri temel alınarak tanımlanabileceği belirtilmiştir (Garcia-Pitchel F., *et al.*, 1998)

Mavi-yeşil algler (siyanobakteriler) fotosentetik aparatın kendisi hem sıcaklığa en duyarlı bileşik olup hem de en yüksek sıcaklık toleransına sahiptir (Castenholz R.W., 1969). Termofilik mavi-yeşil alglerin (siyanobakterilerin) ekstrem koşullarda yaşayabilme yeteneğinde olduğu bilinmekte olup, yüksek sıcaklığa maruz kaldıklarında farklı bir biçimde yüksek oranda Isı-şok proteini (Heat shock protein (HSP)) ürettikleri gözlenmiştir (Shigeno S., *et al.*, 2004). *Synechococcus sp.* üzerine yapılan bir çalışmada HtpG (HSP90 'ın homologue) mavi-yeşil

algler üzerinde sıcaklık toleransında temel bir rol aldığı belirtilmiştir (Tanaka, N., Nakamoto, H., 1999).

1.9.1 Ülkemizde termal alglerle ilgili çalışmalar

Ülkemizde tatlı su çalışmaları ile ilgili şimdiye kadar pek çok detaylı araştırma yapılmıştır. Ancak bu çalışmaların çoğunlukla göl, gölet, baraj gölleri ve akarsularla ilgili çalışmaların yoğunlukta olduğu görülmektedir. Bununla birlikte kaplıca ağzlarında yaşayan termal alg çalışmaları oldukça azdır.

Türkiye’de farklı özelliklere sahip kaplıca ve maden suları bakımından zengin olmakla birlikte 1000 dolayında kaplıca ve içme kaynağı bulunmaktadır.

(http://www.sabem.saglik.gov.tr/kaynaklar/1152_1saglik_turizmi.pdf).

Bu kaynaklar insan sağlığı açısından yararlı olduğu için tarih boyunca önem kazanmış olanları bulunmaktadır. Dünyadaki birçok kaplıcada olduğu gibi ülkemiz kaplıca suları da eski çağlardan beri birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Son zamanlardaki çalışmalarla sıcak su kaynaklarının hangi hastalıklara iyi geldiği araştırılmış ve kullanım yararlarının artırılması sağlanmıştır. Birçok hastalığa iyi gelen, doğal güzelliğe sahip bu kaynaklar ülkemiz için büyük ekonomik değere sahiptir. Kaynakların önemi ve değeri, halkın bilinçli yararlanmasını sağlamak için sıcak kaynak sularının özelliklerinin ortaya konması gerekmektedir. Sağlık bakanlığı sıcak

kaynak suyu analizlerinin yapılması için M.T.A. (Maden Tetkik ve Arama) Enstitüsü'nü görevlendirmiştir.

Ülkemizdeki termal kaynakların biyolojisi ile ilgili ilk çalışma Regel tarafından 1932-1935 yılları arasında Pamukkale ve çevresinden toplanan örnekler ile yapmış ve Yunanistan'da bulunduğu sırada Skuja ile birlikte incelenmiştir.

Güner 1966 yılında yapmış olduğu çalışmasında Pamukkale termal suyunun mikroflorasını incelemiş ve 9 mavi-yeşil alg cinsine ait 19 tür tespit etmiştir (Güner, 1966). Aynı araştırmacı 1967 yılında Ege bölgesi termal sularının alg vejetasyonu ile ilgili ön gözlemlerini yayınlamıştır (Güner, 1967).

1970 yılında yine Güner tarafından yapılan çalışmada ise Ege bölgesi kaplıca ve maden sularının alg vejetasyonu ile ilgili inceleme yayınlanmış, 14 mavi-yeşil alg cinsine dahil 47 tür belirlenmiş ve ayrıntılı şekilde tablo halinde verilmiştir (Güner, 1970).

Aysel ve arkadaşları 1992 yılında yaptıkları çalışmada, mavi-yeşil alglere ait 33 takson saptamışlardır(Aysel ve ark., 1992). Güner'in danışmanlığında Ünal (1996) tarafından yapılan yüksek lisans çalışmasında İzmir Balçova (Agamemnon) Kaplıcası mikroskobik ve makroskobik alg florası açısından incelenmiş, 12 mavi-yeşil alg cinsine ait 34 tür tespit edilmiştir (Ünal, 1996).

Tarkan (2000), tarafından Ustaoglu danışmanlığında 2000 yılında yapılan yüksek lisans tez çalışmasında, Urganlı Kaplıcaları (Turgutlu-Manisa) alg popülasyonunun incelenmesi ve su kalitesinin

değerlendirilmesi amaçlanmış, sonuçta mavi-yeşil alg grubuna ait 8 cins ve 10 tür tespit edilmiştir (Tarkan, 2000).

Ulcay tarafından 2005 yılında yapılan yüksek lisans tez çalışmasında, Manisa ve çevresinde ekonomik ve sağlık yönünden yararları göz önünde bulundurularak seçilen 5 kaplıcadan toplam 12 istasyondan 12 ay süreyle örnekleme yapılmıştır, sonuçta mavi-yeşil alg grubuna ait 4 ordo, 7 familya altında toplanan 25 tür tespit edilmiştir. (Ulcay, 2005). Yine Ulcay ve ark. tarafından Dikili ve çevresindeki kaplıcalardan mavi-yeşil alg türleri incelenmiş ve toplam 7 istasyondan, 8 cise ait 19 tür tespit edilmiştir.

Sıcak su kaynaklarından izole edilen termofil siyanobakteri *Phormidium sp.* ile reaktif boya biyobirikim çalışmalarında, izolatin en yüksek boya giderimi yaptığı pH, sıcaklık ve konsantrasyon kesikli sistemlerde termofilik şartlar altında araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda, *Phormidium sp.* termofilik koşullarda tekstil atık sularındaki reaktif boyaların uzaklaştırılmasında kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (Bakır, 2006).

Literatür özetlerinde de belirtildiği gibi yurt dışında termal alglerle ilgili çalışmalar çok sayıda olup, oldukça ayrıntılı bir şekilde yapılmıştır. Ülkemizde bu konudaki çalışmalar henüz yeterli düzeye ulaşmamış olup, bu eksikliklerin giderilmesi amaçlanmaktadır. Yapılan çalışmalarda ise sadece morfolojik düzeyde sistematik çalışmalar seviyesinde kalmıştır. Bu çalışmada şimdiye değin üzerinde durulmayan, moleküler yöntemler kullanılarak termal sularda gelişen mavi yeşil alglerin tayini esas alınmıştır. Bu amaç çerçevesinde İzmir ili sınırları içinde yer alan

ekonomik ve halk sağlığı bakımından önemli 3 termal tesisten örnekleme noktası seçilmiştir. Bu termal tesislerden elde edinilen mavi-yeşil alg grubuna ait algler izole edilmiş ve morfolojik, moleküler tayinleri amaçlanmıştır. Çalışmanın gelecekteki çalışmalara da ışık tutacağı inancındayız.

1.10 İstasyonlarla İlgili Özellikler

Şifne Termal Otel

Şifne Termal Otel şifalı termal suyu ile yıllardan beri sağlığını kazanmak isteyenlerin uğrak yeri olmuştur (Çizelge 1.1). Termal suyun iyi geldiği hastalıklardan bazıları; romatizmal hastalıklar, iç hastalıkları, raşitizm, mide, bağırsak, böbrek ve idrar yolları rahatsızlıkları, egzama ve kadın hastalıklarıdır. Şifalı suyun çamur ile birlikte iyi geldiği hastalıklar; selülit, sedef hastalığı ve çeşitli cilt hastalığıdır. Şifalı çamurda ise maden sularıya senelerce ıslak kalarak çamur halini almış kaplıca toprağı, madensel tuzlara doyar ve vücuda uygulandığında gözeneklerden içeri sızarak dokulara nüfuz eder. Böylece şifalı çamur, kılcal damarları çalıştıran fonksiyonları ile cildi yeniler. Şifalı su ayrıca sindirim bozukluklarına ve stresde çare olmaktadır. Termal suyun ısısı 38-42 °C'dir.

Çizelge 1.1: Şifne Termal Suyuna ait kimyasal kompozisyon

İyonlar		mg/L
Potasyum	K^{+}	460.207
Sodyum	Na^{+}	8.262.146
Kalsiyum	Ca^{+2}	1.237.970.8
Magnezyum	Mg^{+2}	1.878.652
Demir	Fe^{+2}	0.400
Alüminyum	Al^{+3}	0.170
Çinko	Zn^{+2}	0.130
Klorür	Cl	18.900.039
Bromür	Br	18.900.039
Florür	F	4.800
Kükürt	SO^{-2}	2.150.000
Nitrat	NO^{-3}	0.660
Hidrofosfat	HPO^{-2}	0.225
Bikarbonat	HCO_3	28.600
Metaborik asit	HBO_3	18.630
Metasiliat asit	H_2SiO_3	13910
pH		6.76
Radyoaktivite Total (a) Acti: 106.9.8 Pci/L Total (a) Acti: 71.05 ± 11.16 Pci/L Radon: 850 Pci/L		

Balçova Termal Tesisleri

Tarihte "Agamemnon Kaplıcaları" olarak bilinen ve 2500 yıldan beri insanlık için şifa kaynağı olan kaplıcalar, şimdi modern bir tesis olan

Balçova Termal Tesisleri bünyesindeki Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Merkezi olarak hizmet vermektedir (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2: Balçova Termal Suyuna ait kimyasal kompozisyon

İyonlar	mg/L
Potasyum	28,4
Sodyum	375,0
Kalsiyum	16,7
Kükürt	0,1
Magnezyum	10,3
Demir	0,1
Bikarbonat	695,0
Klor	206,0
Sülfat	165,5
pH	8,1

Tedavi edilebilen hastalıklar:

- İnflamatuvar Romatizmal Hastalıklar (Romatoid artrit, Ankilozan spondilit, Psoriatik artrit, Kollajen doku hastalıkları vb,)
- Dejeneratif eklem hastalıkları (Kireçlenmeler)
- Romatizmal kas ve yumuşak doku hastalıkları (Fibromiyalji, Periartrit, Tendinit, Bursit, Epikondilit vb,)
- Bel-boyun fıtık ve ağrıları

- Kemik-metabolizma hastalıkları (Osteoporoz, Paget hastalığı, Gut vb.)

- Ortopedik ve nörolojik rehabilitasyon (Kırıklar, Felçler, MS, CP, Parkinson vb.)

- Spor sakatlıkları ve rehabilitasyonu

- Moral motivasyon ve kondüsyon artırma egzersiz programları

- Geriatrik rehabilitasyon programları

Tedaviye mani hastalıklar:

- Ağır kalp, karaciğer, akciğer ve böbrek yetmezlik ve hastalıkları

- Kontrol altında olmayan hipertansiyon ve diabet mellitus (Şeker) hastaları

- Akut enfeksiyonlar

- Kanserler

- Ağır dolaşım bozuklukları

- Romatizmal hastalıkların aktivasyon dönemleri

Zeytindalı Termal

Bakırçay bölgesi, termal kaynaklar yönünden 3,000 yıllık geçmişe sahiptir, Dünyanın ilk fizik tedavi merkezi ve akıl hastanesi Bergama ASKLEPİONE ‘dur, yine tedavi amacıyla termal suların kullanıldığı ilk kaplıca Bergama ALLİONAI’dır, Kleopatra Güzellik Ilıcası adıyla ün yapmış olan kaplıcada Bergamada’dır (Çizelge 1.3).

Zeytindalı Kaplıcası, Bakırçay Bölgesinde ilk ve tek olması nedeniyle önemli bir özellik kazanır.

Çizelge 1.3: Zeytindalı Termal Suyuna ait kimyasal kompozisyon

İyonlar	mg/L
Sodyum	219,555
Potasyum	7,038
Amonyum	0,193
Magnezyum	18,233
Kalsiyum	125,801
Mangan	0,100
Demir	1,000
Florür	2,210
Klorür	50,694
Bromür	0,150
Nitrit	0,023
Sülfat	550,000
Bikarbonat	274,500
Sülfür	0,001
Fosfat	0,090
pH	7,32

Tedavi edilebilen hastalıklar:

- Bütün romatizmal ve kreçlenme rahatsızlıkları
- Güneş yanıkları ve her türlü yara bere ve kaşıntı

- Kadın hastalıkları
- Böbrek taşı ve prostat hastalığı
- Sedef ve çeşitli cilt hastalıkları
- Trafik, spor vb kazalardaki yaralanmalardan dolayı oluşan hastalıklar
- Kalp, damar sertliği, tansiyon rahatsızlıkları
- Sinir, damar, felç rahatsızlıkları

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

Bu araştırma 2007 Temmuz ile 2008 Ağustos yılları arasında gerçekleştirilmiştir. Bu araştırma kapsamında İzmir ili sınırları içerisinde 3 istasyon belirlenmiştir.

Çalışma boyunca İzmir ili içindeki çeşitli kaplıca ve termal tesislerin listesi çıkarılmış ve bunların içinden farklı bölge ve özelliklere sahip 3 istasyon belirlenmiştir. Bunlardan birincisi, Bergama –Dikili bölgesinde olup, İzmir-Çanakkale yolunun üzerinde, İzmir’e 110 km, uzaklıkta bulunan Zeytindalı Termal Tesisidir. İkinci yer ise, Şifne-Çeşme Termal Oteldir. Otel, Ildır yolu üzerinde olup, Çeşme’ye 7,5, Ilıca’ya 1,5 km uzaklıktadır. Üçüncü örnekleme yerimiz ise Balçova Termal Tesisidir.

2.2 Metot

2.2.1 Örneklerin elde edilmesi ve fiksasyonu

Seçilen istasyonlarda örnekler alınmış ve kendi suyunun fiziksel (pH, sıcaklık, oksijen) ölçümleri yapılmıştır. Daha sonra örnekler cam şişelere alınarak laboratuara getirilmiştir.

Örnekler, sıcak su akışın olduğu bölgelerden, taş ve kayadan spatula ile kazılarak alınmıştır. Alınan örnekler cam şişelere alınarak üzeri etiketlenmiştir. Örneğin alındığı suyun sıcaklığı termometreyle

ölçülmüş, pH metre ile pH'ı, oksijen ölçer ile de oksijen ölçümü yapıp not edilmiştir.

Örnekler laboratuara getirildikten sonra, 100'lük erlenlere ayrılıp, sıcak su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Geriye kalan kısmı ise hücrel organizasyonunun bozulmaması için % 5'lik formaldehit çözeltisi eklenerek fiksasyonu sağlanmıştır.

2.2.2 Kültür ortamları

Zeytinalı ve Balçova termal tesislerinden elde edilen örnekler için, mavi-yeşil algler (siyanobakteriler) için genel bir ortam olan Blue Green Algae (BG 11) kültür ortamı kullanılmıştır (Çizelge 2.1). Şifne termal tesisinden elde edilen materyal için ise Erdschreiber Medium (EM) kültür ortamı kullanılmıştır (Çizelge 2.2). Hazırlanan ortam içeriği kendi suyunda (filtre edilmiş) çözöldükten sonra, pH metre ile pH'sı kontrol edilip otoklavlanarak sterilizasyonu sağlanmıştır. Katı ortam hazırlamak için litreye 15 g agar ilave edilmiştir.

Örneklerimizin kontaminasyona uğramaması amacıyla çalışmalar sırasında kullanılan her türlü cam malzeme otoklavda (121⁰C) ve diğer malzemeler kurutma fırınında sterilize edilmiştir.

BG 11 Ortamı (Sukatar, 2002)

Çizelge 2.1: Blue green algae (BG-11) ortamı kompozisyonu

<u>ml</u>	<u>Stok solüsyonu</u>	<u>g/1000ml H₂O</u>
100	NaNO ₃	15,0
10	K ₂ HPO ₄	4,0
10	MgSO ₄ 7H ₂ O	7,5
10	CaCl ₂ 2H ₂ O	3,6
10	Sitrik asit	0,6
10	Amonyum ferrik sitrat	0,6
10	Na ₂ EDTA	0,1
10	Na ₂ CO ₃	2,0
1	İz elementi solüsyonu	

İz elementi solüsyonu

1000 ml saf suya aşağıdaki bileşikler ilave edilir,

<u>Bileşik</u>	<u>Miktar (g)</u>
H ₃ BO ₃	2,86
MnCl ₂ 4H ₂ O	1,81
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,222
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,39
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,079
Co(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	0,0494

Stok çözeltilerden belirlenen konsantrasyonlarda alınan miktarlar, kendi suyu (filtre edilerek) eklenerek 1 L olacak şekilde hazırlanarak, otoklavlanmıştır.

EM Ortamı (Sukatar, 2002)

Çizelge 2.2: Erdschreiber Medium (EM) kültür ortamı solüsyonu kompozisyonu

<u>ml</u>	<u>Stok solüsyonu</u>	<u>g/100 ml H₂O</u>
10	NaNO ₃	2
10	Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	0,3
0,750	Na ₂ EDTA	10
12	İz elementi solüsyonu	

İz elementi solüsyonu

1000 ml saf suya aşağıdaki bileşikler ilave edilir,

<u>Bileşik</u>	<u>Miktar (g)</u>
FeCl ₃ 6H ₂ O	0,0970
MnCl ₂ 4H ₂ O	0,0410
ZnCl ₂	0,0044
CaCl ₂ 6H ₂ O	0,0060
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0,0040

Stok çözeltilerden belirlenen konsantrasyonlarda alınan miktarlar, kendi suyu (filtre edilerek) eklenerek 1 L olacak şekilde hazırlanarak, otoklavlanmıştır.

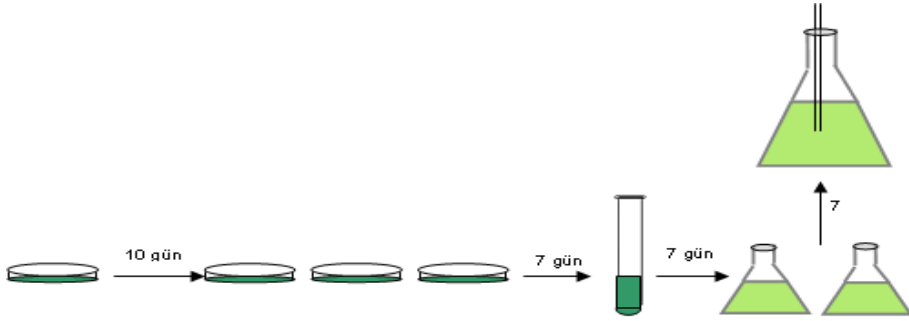
2.2.3 Fiziksel koşullar

Çoğaltılan örnekler su banyosunda 40-45°C arasında inkübe edilecektir, Bulundukları ortamın pH, ışık (24h aydınlıkta) ve sıcaklık ayarları sürekli kontrol edilmiştir.

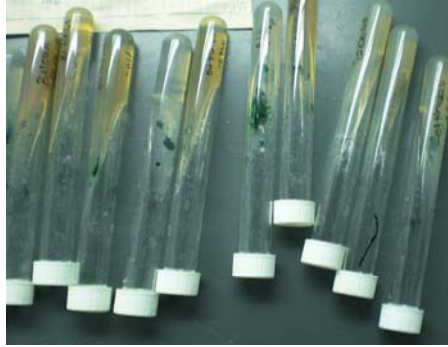
Işık kaynağı olarak Philips marka (18W/54) day light floresan lambalar kullanılmıştır.

2.2.4 Saflaştırma yöntemi

Örnekler ilk başta termofilik olduklarından sıcak su banyosunda tutulmuşlardır. Daha sonra erlenlere alınarak ekolojik gereksinimlerine göre kültür koşulları (ışık, sıcaklık, pH vb,) sağlanmıştır. Kültüre alınan örnekler düzenli şekilde uygun kültür ortamları ile seyreltme uygulanarak izolasyonu sağlanmıştır. Yeterince seyreltilen türler agar (%1,5) ve yatık agara ekimleri yapılarak saflaştırılması sağlanmıştır. Agara ve yatık agara ekimde, çizgi ekim metodu uygulanmıştır (Şekil 2,1, 2,2). Belirli periyotlarla ekimler tekrarlanmıştır. Bu sayede istenilen türün saflaştırılması sağlanmıştır. Daha sonra saflaştırılan örnekler sıvı besi ortamına alınarak kültürüne alınacaktır. 100'lük erlende başlatılan kültürler, biyokütle artışı sağlandıkça daha büyük ölçeğe (1 L) geçirilmiştir.



Şekil 2.1: Stok kültür hazırlanması



Şekil 2.2 : Yatık agarda üretim

2.2.5 Türlerin kültüre edilmesi

Saflaştırılan türler ayrı ayrı 1 L erlenler de 35 °C’de, sürekli aydınlatmada ve havalandırılmalı olarak kültüre alınarak üretilmesi sağlanmıştır (Şekil 2.3). Kültürler devam ederken, yatık agara ekim yapılarak herhangi bir bakteri kontaminasyonu olup olmadığı kontrol edilmiştir. Yeterince üreme sağlanan kültürlerden biyokütle elde edilerek, moleküler analizler için -20°C’ de depolanmıştır.



Şekil 2.3: Erlenlerde (1L) havalandırmalı üretim

2.2.6 Ekipmanlar

Çizelge 2.3. Kullanılan ekipman markaları ve özellikleri

Otoklav	Hirayama Hiclave (HVE-50)
Santrifüj	Hettich Universal 32R
Spektrofotometre	Carry-300
Lüksmetre	Lutron LX-105
pH-metre	Mettler Toledo
Vorteks	Stuart Scientific SA 2
Analitik Terazî	Metler Toledo
Membran Filtre Ünitesi	Sartorius SM 16309
Su Banyosu	Memmert
Floresans Mikroskobu ve Fotoğraf Çekim Aparatı	Leica DM400B- Olympus DP71
Derin Dondurucu	Arçelik
Filtrasyon Sistemi	Sartorius

2.2.7 Moleküler tanımlama

2.2.7.1 DNA izolasyonu

İzolasyon Yöntemleri

İki farklı izolasyon yöntemi uygulanmıştır.

1. Manuel Yöntem ile İzolasyon

Bu yöntemde, örnekler önce PBS solüsyonuyla birlikte falkon tüplerine konulmuştur. 30 sn periyotlarla yaklaşık 5-6 kere (hücreler iyice parçalandığı gözlenene denk) sonikasyon yapılmıştır. Örneklerden yaklaşık 1-2 gr. eppendorf tüplerine dağıtılmıştır. 7000 rpm de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı atılmıştır. Daha sonra. 567 µl TE çözeltisi eklenerek hücreler pipet yardımıyla çözünmüştür. 30 µl %10 SDS. 3 µl Proteinaz K (20 mg/ml) eklenmiştir ve tüp alt-üst edilerek karıştırılmıştır. 37 °C’de 1 saat inkübe edilmiştir. Çok kısa santrifüj edilmiştir. Daha sonra 100 µl 5 M NaCl eklenerek karıştırılmıştır. 80 µl CTAB + NaCl (% 10 CTAB+0.2 M NaCl) karışımı eklenerek karıştırılmıştır. 65 °C’de 10 dakika inkübe edilmiştir. Çok kısa santrifüj edilmiştir. 700 µl fenol/kloroform eklenerek karıştırılır. 13 000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz yeni bir eppendorf tüpüne aktarmıştır. 750-800 µl kloroform/izoamilalkol (24:1) eklenmiştir ve karıştırılmıştır. 13 000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz temiz bir eppendorf tüpüne aktarılmıştır. 340 µl izopropanol eklenmiştir. Fibriller görülene dek kuvvetlice karıştırılmıştır ve -20 °C’ de bir gece beklemeye bırakılmıştır. Daha sonra 13 000 rpm’de 15 dakika santrifüj

edilmiştir ve üst sıvı atılmıştır. 100 µl %75 EtOH eklenerek pellet yıkanmıştır. 13 000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir ve üst sıvı faz atılmıştır. Pelet oda sıcaklığında yaklaşık 15 dakika bekletilerek kurutulmuştur. DNA 100 µl dH₂O içinde çözülmüştür ve tek tüpte toplanmıştır. Daha sonra spektroskopik olarak miktar tayinleri yapılmıştır.

Çözeltilerin Hazırlanması

PBS Çözeltisi:

8 g NaCl
0.2 g KCl
1.44 g Na₂HPO₄
0.24 g KH₂PO₄
800 ml Distile su
pH 7.4 e sabitlenir

CTAB Çözeltisi:

4 g CTAB
56 ml 5M NaCl
20 ml 1M Tris-HCl
8 ml 0.5M EDTA
115 ml Distile su

%10 CTAB Çözeltisi

100 ml Distile su
10 g CTAB

TE Çözeltisi:

10 ml 1M Tris-HCl
2 ml 0.5M EDTA

998 ml Distile su

Kloroform: İzoamilalkol CIA (24:1):

24 ml Kloroform

1ml İzoamilalkol

1M Tris- HCl:

121.1 g Tris-HCl

1 L Distile su

%10 SDS

10 g SDS

100 ml Distile su

Proteinaz K

1 ml Distile su

20 mg Proteinaz K

5 M NaCl

1 lt. Distile su

292.2 g. NaCl

0.2 M NaCl

1 L Distile su

11.68 g NaCl

Fenol/Kloroform (25:24)

25 ml Fenol

24 ml Kloroform

% 75 Etanol

75 ml Etanol

25 ml Distile su

Tüm çözeltiler Merck marka kimyasallar kullanılarak hazırlanmıştır.

2. ZRFungal/Bacterial DNA Kit ile İzolasyon

İkinci yöntemde ise ZRFungal/Bacterial DNA Kit (Zymo Research.USA) kullanılarak izole edilmiştir. Bu yöntemde örnekler öncelikle ZR BashingBead™ Lyses Tube'e eklenmiştir. En yüksek hızda 5 dakika Vortekste tutularak iyice homojenize olması sağlanmıştır. 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra üst fazdan 400 µl alınarak Collection Tube içindeki Zymo-Spin™ IV Spin Filter (turuncu kapaklı)'a aktarılmıştır ve 7.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Bir önceki adımdaki Collection Tube içinde kalan süzölmüş sıvının üzerine 1.200 µl Fungal/Bacterial DNA Binding Buffer eklenmiştir. Oluşan bu karışımdan 800 µl alınarak Collection Tube içindeki Zymo-Spin™ IIC Column'e aktarılmıştır ve 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüpüne gelen sıvı atılır ve işlem tekrar edilmiştir. Daha sonra yeni Collection Tube içindeki Zymo-Spin™ IIC Column'e 200 µl DNA Pre-Wash Buffer eklenmiştir ve 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir sonra Fungal/Bacterial DNA Wash Buffer ile yıkanmıştır. Kolon 1.5 ml santrifüj tüpüne aktarılmıştır ve kolon matriksine 100 µl DNA Elution Buffer eklenmiştir. Son olarak DNA'yı ayrıştırmak için 10.000 g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir.

Bu iki yöntem ile elde edilen DNA'lar agaroz jel elektroforezi yöntemi (Şekil 2.4) ve spektrofotometrik yöntemler ile gözlenmiştir. Jel

elektroforezi için %1'lik agaroz jel hazırlanmış ve örnekler 80 V.. 35 mA ve 3 W'da 1 saat yürütülmüştür.



Şekil 2.4 Agaroz jel elektroforezi (Consort EV265)

2.2.7.2 PCR analizi

2.2.7.2.1 PCR analizinde kullanılan primer çifti

Siyanobakteri genlerinin spesifik bölgelerinin PCR yöntemiyle amplifikasyonları için gen bölgelerine özgül primer dizileri seçildi

Çizelge 2.4: Kullanılan primerlerin sekansları.

Primer 1 (27F)	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
Primer 2 (809 R)	5'-GCTTCGGCACGGCTCGGGTCGATA-3'

Liyofilize halde ve 0.01 μmol sentez skalasında ticari olarak satın alınan forward ve reverse primerlerinin (Çizelge2.4) ikisi de 100 pmol/ μl olacak şekilde firmanın önerisi olan 100 μl steril su eklenerek çözüldü ve 40 μl ' lik eşit hacimlere bölünerek -20°C 'de saklandı.

250-10.000 bç.'lik gen bölgesi PCR (Şekil 2.5) yöntemi kullanılarak çoğaltıldı. Her bir örnek için hazırlanan 50 μl ' lik PCR reaksiyon karışımı aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı.

DNA'nın çoğaltılması işlemi için gerekli olan. MgCl_2 . *Taq* DNA polimeraz. dNTP. random primerler ve genomik DNA gibi PCR bileşenlerinin konsantrasyonları benzer makaleler göz önüne alınarak saptanmıştır.



Şekil 2.5 PCR (GeneAmp PCR System 9700)

PCR Reaksiyon karışımı (Fast Start Taq DNA Polimeraz enzimine göre)

Çizelge 2.5: PCR Reaksiyon Karışımı

Bileşenler	Hacim
Steril Distile Su	37.6 µl
10 X PCR Buffer	5 µl
dNTP	1 µl
Primer 1	0.5 µl
Primer 2	0.5 µl
Fast Start Taq DNA pol.	0.4 µl
Genomik DNA	5 µl
Toplam Hacim	50 µl

PCR protokolü:

Denatürasyon	95°C	6 dak	
Denatürasyon	95°C	30 sn denatürasyon	} 35 Döngü
Annealing	50°C	40 sn bağlanma	
Elongation	72°C	48 sn uzama	
Final Extension	72°C	7 s	
Soğutma	+4°C	∞	

Elde edilen PCR ürünleri sekans analizi için. REFGEN (ODTÜ-TEKNOKENT) Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti.'ne gönderilmiştir.

2.2.7.3 Sekans analizi ve filogenetik yakınlık

REFGEN’de tamamlanmış olan siyanobakteriyel 16S rRNA gen sekansları BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) analizi kullanılarak dizilmiş ve neighbor joining gibi BLAST yazılımında bulunan metotlarla filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Bu veriler doğrultusunda, örneklerimizin filogenetik yakınlıkları belirlenmiştir.

3. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bakterilerde, mantarlarda ve hayvanlarda termofil terimi için farklı tanımlamalar kullanılmıştır. 45 °C'nin üstündeki sıcaklıklarda maksimum büyüme oranı temelde prokaryotik organizmaların bir karakteridir. Fotosentetik mavi-yeşil alglerin (siyanobakterilerin) 73-74 °C sabit sıcaklıkta. fotosentetik olmayan bakterilerin ise 95°C geliştiği bilinmektedir (Castenholz. 1969).

Mavi yeşil algler için hala doğal koşullar altında gelişmeyi destekleyebilecek bir maksimum sabit bir sıcaklık bulunamamıştır ama 73-74 °C arası yüksek sıcaklıktaki türler için üst sıcaklık sınırı olabilir. Şimdiye kadar 73 °C nin üzerinde fotosentez veya fotoototrof gelişimi gözlenmemiştir (Castenholz. 1969). Büyüme için alt sıcaklık limiti hakkındaki bilgiler yetersizdir. İncelenen termofilik mavi yeşil alglerin çoğunun 30-35 °C den düşük sıcaklıklarda üremediği ya da sınırlı üreme gösterdiği anlaşılmıştır. *Synechococcus*'ların belirli türleri 50-55 °C 'den düşük sıcaklıklarda gelişmemektedir. *Mastigocladus laminosus*'un yüksek sıcaklıklardaki klonları 29 ile 62 °C arası sıcaklıklarda kültürü yapılabilinmiştir. Mavi yeşil algler arasında üst sıcaklık ile alt sıcaklık sınırı arasında büyük farklılıklar vardır. Üst sıcaklık limiti genellikle optimumun birkaç derece üzerindedir. Alt limit esnektir; önceki şartlara. ışık yoğunluğu ve diğer faktörlere bağlıdır (Castenholz. 1969). Bir termofilik mavi yeşil alg olan *Myxosarcina concinna* Printz. 45°C sıcaklıkta izole edilmiştir (Sun and Wang. 2003). '*Mastigocladus*

laminosus HTF' türün. pH'ı 9 olan ve 62-73°C sıcaklığa sahip küçük gölden izole etmiştir (Wilmotte *et al.* 1993).

Ünal (1996) tarafından. Balçova Kaplıcalarında yapılan çalışmada 74 takson tespit edilmiş olup bunlardan 35 taksonun Cyanophyta (Siyanophyta) grubuna ait olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada, farklı sıcaklıktaki istasyolardan elde edilen mavi yeşil algler morfolojik olarak tanımlanmıştır. 80°C de egemen canlı *Phormidium* sp. olduğu belirtilmiştir. 70°C'de karakteristik canlılar ise; *Phormidium fragile*, *Oscillatoria terebriformis* ve *Anabaena constricta*'dır. 60°C'de *Phormidium purpurascens*, *P. fragile*, *P. tenue*, *P. laminosum*, *Pseudanabaena catenata* egemen olduğu belirtilmiştir. Sıcaklık artıka tür sayısının azaldığı belirtilmiştir. 55°C'de *Pseudanabaena catenata*, *Phormidium tenue*, *P. fragile* görülmüştür. 30-45°C'de *Oscillatoria* egemen canlı olmuştur ve *Oscillatoria formosa*, *O. rubescens*, *O. terebriformis*, *O. curviceps*, *Lyngbya confervoides*, *Chroococcus turgidus*, *C. minor* türleri kayıt edilmiştir.

Ulcay (2005), yüksek lisans tez çalışmasında Manisa ve çevresindeki kaplıcalardaki mavi yeşil alg türlerini çalışmıştır. Bu çalışmada 60-86°C sıcaklık aralığında tespit edilen türler şunlardır; *Chroococcus dimidiatus*, *C. minor*, *Gloecapsa quaternata*, *Spirulina subsalsa*, *S. subtilissima*, *S. meneghiniana*, *S. major*, *Leptolyngbya tenuis*, *Planktolyngbya subtilis*, *Limnotrix amphigranulata*, *Jaaginema pseudogeminata*, *Oscillatoria princeps*, *O. proteus*, *O. boryana*, *O. cacuttensis*, *Lyngbya contorta*, *Phormidium chlorinum*, *P. willei*, *P. terebriforme*, *P. amphibium*, *P. formosum*, *P. splendens*, *Calothrix thermalis*, *Mastigocladus laminosus*.

Dikili ilçesindeki kaplıcalarda yayılış gösteren termal Cyanophyceae türleri üzerine yapılan çalışmada 8 cinse ait 19 tür belirlenmiştir. *Chroococcus membraninus*, *C. globus*, *Pseudanabaena mucicola*, *P. galeata*, *P. thermalis*, *Jaaginema geminatum*, *Spirulina tenerrima*, *S. meneghiniana*, *Phormidium numidicum*, *P. subuliforme*, *P. animale*, *Hormoscilla endophytica*, *Oscillatoria ucrainica*, *O. ornata*, *O. bonnemaisonii*, *O. janus*, *Lyngbya thermalis*, *L. meneghiniana*, *L. confervoides* türleri kayıt edilmiştir.



Şekil 3.1: Zeytindalı Kaplıcası



Şekil 3.2: Şifne Termal Otel (Havuz)



Şekil 3.3: Balçova Termal Otel (Sıcak su çıkışı)

Çalışmamızda, Zeytindalı Kaplıcaları (Zeytindalı) ve Şifne Termal Otelden (Şifne) bir, Balçova Termal Otelden (Balçova-1 .Balçova-2) 2 tür laboratuvar ortamında izolasyonu sağlamak amacıyla belirlenmiştir.

Örneklerimiz termofilik oldukları için laboratuvar ortamında sıcak su banyosunda ($35-40^{\circ}\text{C}$) üremeye bırakılmışlardır. Bir kısım örnek, morfolojik tayin için % 5 formaldehit ile fikse edilmiştir. Üremesi sağlanan hücrelerden, agar (%1.5) ve yatık agara (Şekil 2.2) ekim yapılmıştır. Agarda saflaştırılan hücreler sıvı ortama aktarılmıştır (şekil 2.1). Her örnek kendi yaşam ortamlarındaki sular filtre edilerek hazırlanan otoklavlanmış kültür ortamlarında kültüre alınmıştır. Yatık agarda ekim yapılarak hücrelerin saflaştırılması kontrol altında tutulmuştur. Sıvı ortamda üremesi sağlanan hücreler daha büyük ölçekli erlenlerde havalandırılmalı üretime alınmıştır (Şekil 2.3).

Zeytindalı ve Balçova örnekleri için BG-11 (Sukatar. 2002), Şifne örneği için ise EM (Sukatar. 2002) ortamı kullanılmıştır. BG -11 ortamı pH'ı 7-8. EM ortamının pH'ı ise 8-9 olarak ayarlanmıştır. Belirli bir

biyokütle birikimi sağlanan materyaller moleküler çalışmalar için ayrı ayrı steril endopodlar içine alınarak -20°C 'de muhafaza edilmiştir.

Termofilik mavi yeşil alglerin çoğu kuruma ve donmaya tolerans gösterebildiği belirtilmiştir. Yaygın türlerden *M. laminosus* ve *P. laminosum*'un tüm kültür nesilleri yavaş donmaya tolerans göstermişlerdir ve -20°C 'de hiçbir hücre ölümü gözlenmeden depolanmışlardır. *Mastigocladus* 3 ay kadar depolanabilinmiştir. Bazı denemeler süresince, *S. lividus*'un çeşitli nesilleri donmaya karşı tolerans göstermiş ve bazı hücreler 1-2 yıllık depolamadan sonra bile canlı kalabilmişlerdir. Fakat bu metot her durumda iyi sonuç vermediği belirtilmiştir. *O. terebriformis* yavaş veya hızlı dondurmaya karşı tolerans göstermemişlerdir (Castenholz. 1969).

Hareketli veya hareketli hormogonyuma sahip olan filamentli cinsler (örn. *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Lyngbya*, *Symploca*, *Calothrix*, *Mastigocladus*) genellikle, uygun sıcaklıkta inkübe edilmiş ve %1.0-1.5'lik agarla katılaştırılmış D ortamı ve Cg-10 ortamında birkaç saat içinde kayma yolu ile kolayca izole edilebildikleri belirtilmiştir (Castenholz. 1969). Tek hücreli bir alg olan *M. concinna*; cool-white floresans lambası altında ve Medium D ortamı içinde kültürü yapılmıştır. Kültür; tüm gün boyunca 45°C 'de ve havalandırılmalı olarak korunmuştur (Sun and Wang. 2003). *Halomicronema excentricum* için deniz suyu ortamına benzer olması için gerekli besinler vitaminler ve iz elementler eklenerek ortam (1/2 PES) hazırlanmıştır.

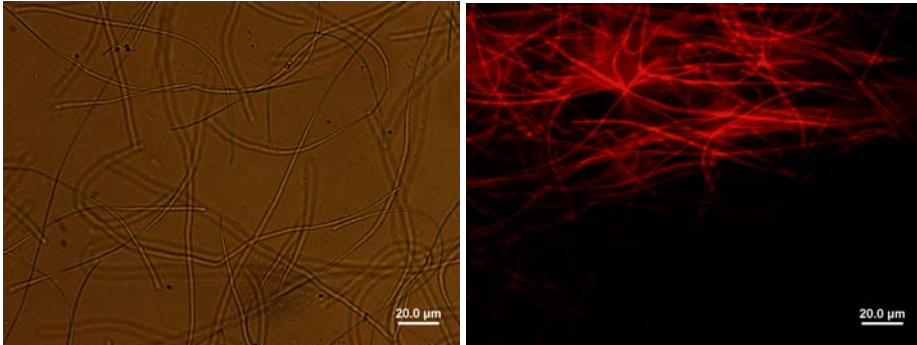
Örnekler, floresan ve ışık mikroskopta incelenmiştir. Örnekler ortak şekilde iplikli, çok ince kılıflı ya da kılıfsız, gerçek dallanma

göstermeyen, yalancı dallanma gösterebilir, iplikler trikom organizasyonlu, heterosist, hormogonium mevcut, uca doğru karakteristik özellik gösteren yapıdadır. Bu özellikler temel alındığında bu örneklerin Oscillatoriales ordosunda bulunduğu düşünülmüştür (Şekil.3.4,3.5,3.6,3.7).

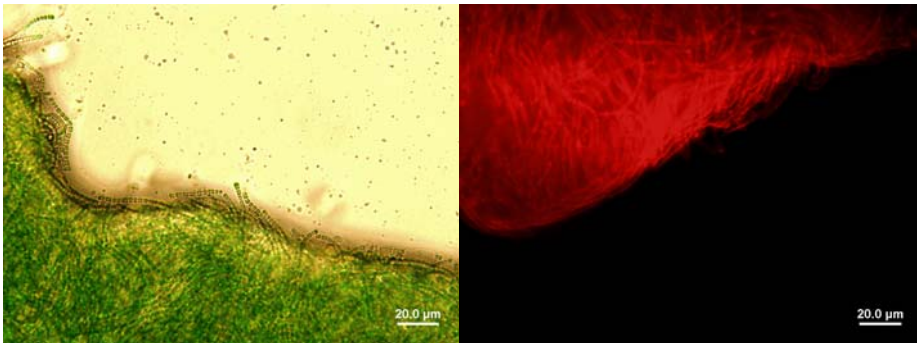
Divisio : Cyanophyta

Classis : Cyanophyceae

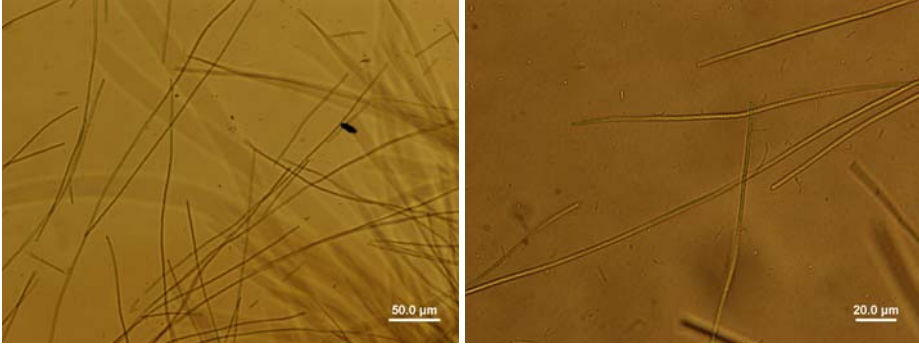
Ordo : Oscillatoriales (Desikachary. 1959)



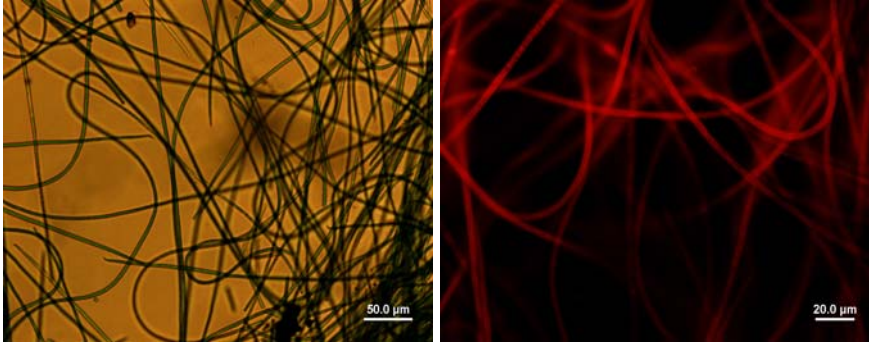
Şekil 3.4: Balçova 1



Şekil 3.5: Balçova 2



Şekil 3.6: Şifne



Şekil 3.7: Zeytindalı

Oscillatoriales ordosu olarak belirlediğimiz örnekler, sınıf ve cins düzeyinde morfolojik olarak tayin edilememiştir. Bu yüzden moleküler yöntemlerle tür tayini yapılmasına karar verilmiştir.

Termofillerin özgün türlerinin çok geniş bir coğrafik dağılım gösterdiği gözlenmiştir. Bununla birlikte; bu konuyla ilgili kategorik bir anlatım yapmak zordur. Öncelikle mavi-yeşil alglerin türe özgü tanımlanması pek mümkün değildir (Castenholz, 1969). Çalışmalar; çevresel örneklemelerden elde edilen 16S rRNA gen bilgisinden, gözlem ve kültür tekniklerinden tahmin edildiği gibi genotipik çeşitliliğin

fenotipik çeşitliliğe göre çok üstün olduğunu göstermek için yararlanılmışlardır (Ferris, *et al.*, 1996).

Belirli bir kommunité DNA'sındaki 16S rRNA tanımlı genler DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) yöntemi ile ayrılmaya çalışılmıştır. 36 türün sekansları DGGE bantlarından çıkarılmıştır. Filogenetik analizler, *Calothrix*, *Cyanothece*, *Fischerella*, *Phormidium*, *Pleurocapsa*, *Oscillatoria* ve *Synechococcus* cinslerinin içinden, mezofilik karşılıklarından ayrılarak oluşan yeni termofilik nesilleri gösterilmiştir (Hongmei J. *et al.*, 2005).

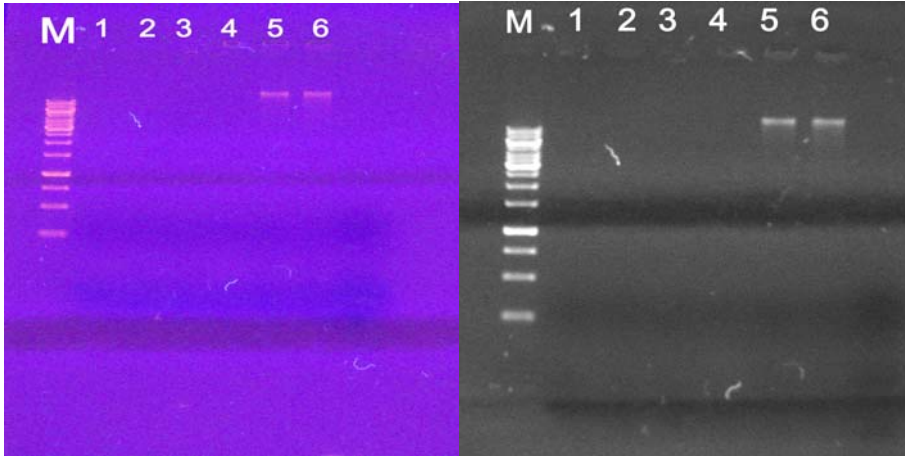
Kısmen halofilik, tuza dayanıklı ve termofilik yeni bir siyanobakteri cinsine ait 4 tür üzerine 16S rRNA gen sekansına dayanan filogenetik analizler bu türlerin yakından ilişkili (%99) olduklarını göstermiştir ve bu türler için *Halomicronema excentrium* önerilmiştir (Abed M.R.R., *et al.*, 2002).

Bir termofilik siyanobakteri türü, PCC7518, ve *Mastigocladus laminosus* HTF' olarak tanımlanan türde heterosist ve dallanma olmamasının nedenini araştırmak için yapılan 16S rRNA sekans analizinde bu türün heterosistli türler kümesine ait olduğu anlaşılmıştır. Heterosis üretme yeteneğinin kaybolmasının mutasyon sonucu olabileceği düşünülmüştür (Wilmotte A., *et al.*, 1993).

Kütle örneklerinden DNA' nın elde edilmesi CTAB içinde lizozim, RNase A ve Proteinaz K kullanımıyla, 60⁰C'de fenol: kloroform ekstraksiyonu ile sağlanmıştır (Hongmei, *et al.*, 2005). Siyanobakteriyel kültür örneklerinin total genomik DNA izolasyonu. sukroz tamponu içinde lizozim ve proteinaz K, SDS (sodyum dodesil sülfat) kullanımıyla

fenol:kloroform:izoamilalkol ekstraksiyonuyla gerçekleştirilmiştir (Lu, *et al.*, 1997).

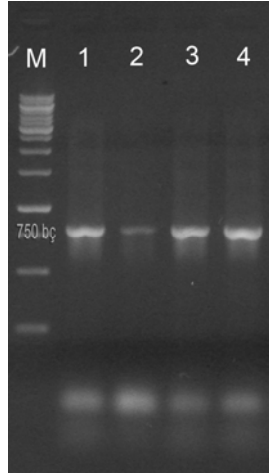
Saflaştırılan mavi yeşil alg kültürlerinden DNA izolasyonu manuel yöntemle ve otomatize olarak ZRFungal/Bacterial DNA Kiti kullanılarak iki şekilde karşılaştırmalı olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.8: İzole edilmiş DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü (1.2.3.4 nolu manuel yöntemle izole edilen DNA örnekleri; 5.6 nolu örnekler ise ZRFungal/Bacterial DNA Kiti ile izole edilen DNA örneklerinin görüntüsüdür)

Şekil 3.8'de görüldüğü gibi ZRFungal/Bacterial DNA Kiti ile gerçekleştirilen DNA izolasyonunda bant oluşum gözlemlenirken. manuel yöntemle herhangi bir bant oluşumu gözlenmemiştir.

Universal primer çifti bakteri ve siyanobakterilere özgü primerler (27F-809R) kullanılarak izole edilen dört farklı DNA PCR ile çoğaltılmıştır.



Şekil 3.9: PCR ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Marker,1: Şifne, 2:Balçova 1, 3: Balçova 2, 4: Zeytindalı)

Daha sonra elde edilen PCR ürünleri sekans analizi için. REFGEN (Odtü-Teknokent) Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti.'ne gönderilmiştir. Gelen sekans sonuçlarına göre BLAST analizi ile filogenetik haritası çıkarılarak tür tayin işlemi tamamlanmıştır.

```

Query 11  TGAACGCGTGGCGGGGTTCCCTAACACCATGCAAGTTGAACGAAGTTCTTTGGAATTTAGT 70
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 3   TGAACGC-TGGCGGCGTGCCTAACA-CATGCAAGTCGAACGAAG-TC-TTCGGACTTAGT 58

Query 71  CGGTCGGGACGGGTGAGTGTAAACGCGTGAGAACCTGCCTTGAGGAGGGGGATAACAGCGG 130
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 59  -GG-C-GGACGGGTGA--GTAACGCGTGAGAACCTGCCTCGAGGAGGGGGATAACAGCGG 113

Query 131 GAAACTGCTGCTAATACCCCATATGCCGAAAGGTGAAAAGAAATTTGCCTTGAGAGGGGC 190
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 114 GAAACTGCTGCTAATACCCCATATGCCGAAAGGTGAAAAGAAATTTGCCTTGAGAGGGGC 173

Query 191 TCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGAGCTTACCAAGGCGACGATCGGTAGCTGG 250
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 174 TCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGAGCTTACCAAGGCGACGATCGGTAGCTGG 233

Query 251 TCTGAGAGGATGAGCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCA 310
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 234 TCTGAGAGGATGAGCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCA 293

Query 311 GCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGGGGGAAG 370
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 294 GCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGGGGGAAG 353

Query 371 AAGGCCTTTGGGTTGTAACTCCTTTTCTCAGGGAAGAAGAAGTACGGGTACCTGAGGAA 430
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 354 AAGGCCTTTGGGTTGTAACTCCTTTTCTCAGGGAAGAAGAAGTACGGGTACCTGAGGAA 413

Query 431 TCAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGAGGCAAGCGTTATCC 490
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 414 TCAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGAGGCAAGCGTTATCC 473

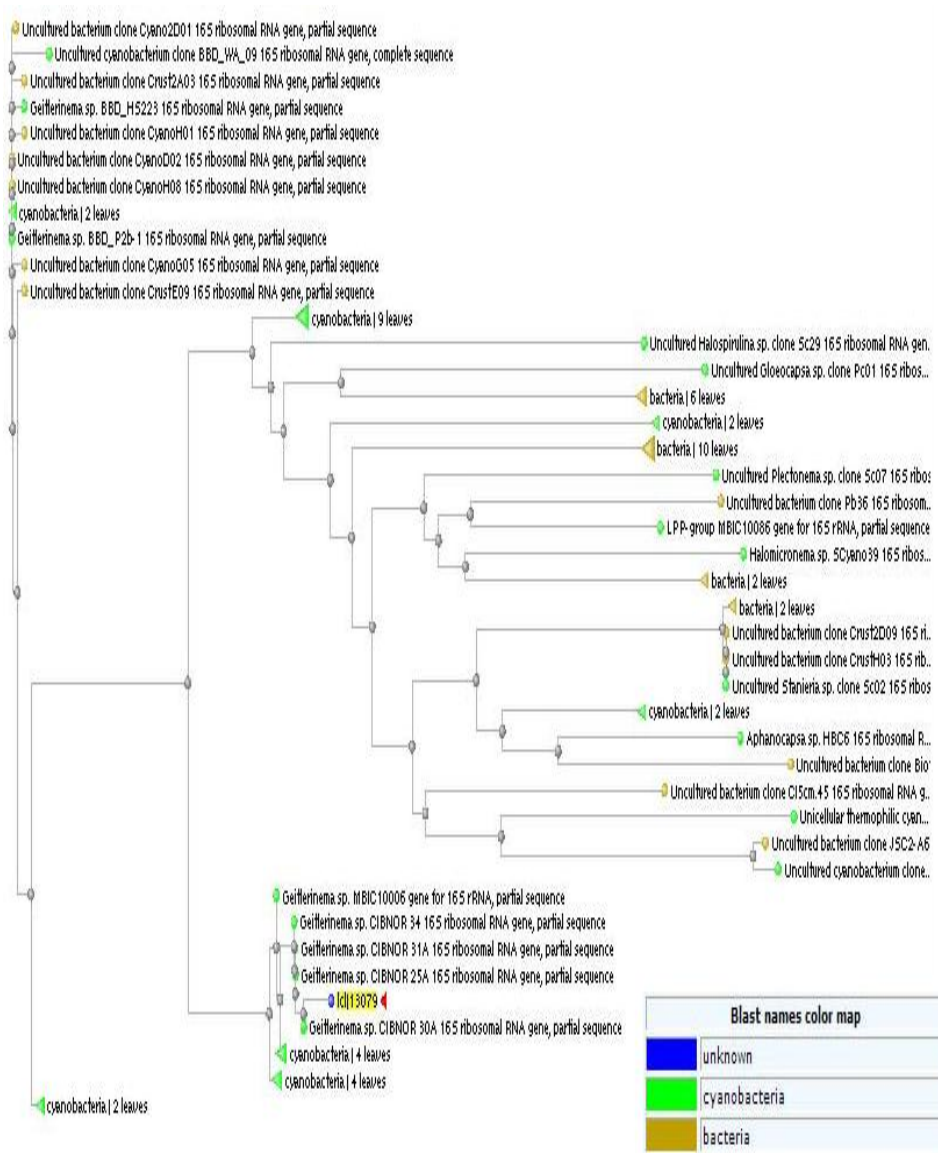
Query 491 GGAATTATTGGGCGTAAAGCGTTCGTAGGCGGCGTTTCAAGTCTGCTGTCAAAGGCCGAG 550
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 474 GGAATTATTGGGCGTAAAGCGTTCGTAGGCGGCGTTTCAAGTCTGCTGTCAAAGGCCGAG 533

Query 551 GCTCAACTTCGGAAAGGCAGTGGAACTGAAAAGCTAGAGTTCGGTAGGGGCAGAGGGAA 610
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 534 GCTCAACTTCGGAAAGGCAGTGGAACTGAAAAGCTAGAGTTCGGTAGGGGCAGAGGGAA 593

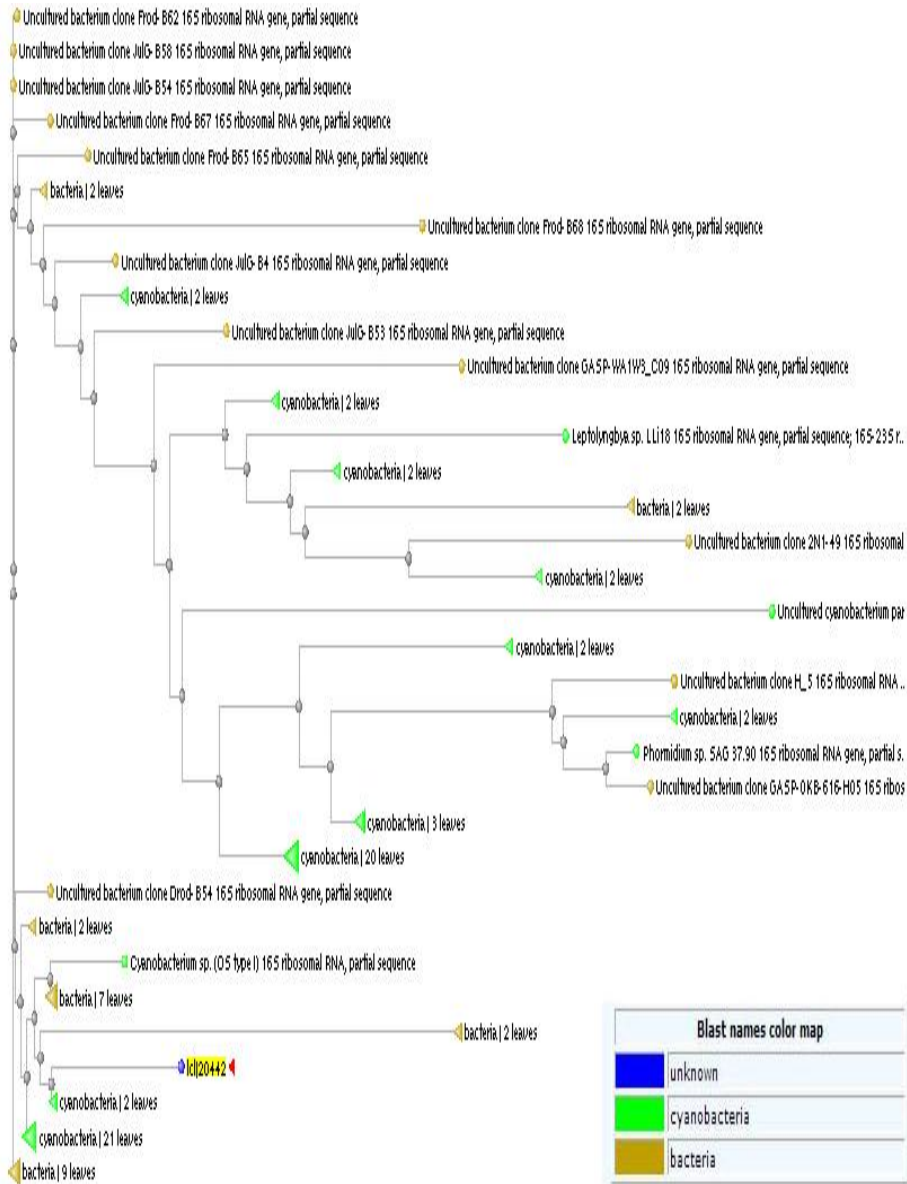
Query 611 TTCCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTC 670
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 594 TTCCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTC 653

Query 671 TGCTGGGCCGAACCTGACGCTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGGAAGATGGGATTAGAT 729
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 654 TGCTGGGCCGAACCTGACGCTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGC--GAATGGGATTAGAT 710

```



Şifne örneğimizin. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> veritabanındaki sonuçlara göre 701/719 baz çiftlik bir alandaki dizilime göre *Geitlerinema* sp. PC 7105 ile % 97 benzerlik göstermiştir.



Balçova.1 örneğimizin. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> veritabanındaki sonuçlara göre 635/660 baz çiftlik bir alandaki dizilime göre Oscillatoriales ordosu altında belirlenen tür, kültüre edilemeyen(uncultured) olarak belirlenmiştir.

```

Query 2      TGCAAGTTGAACGGAGTGCTTTTGGGCACTTAGTGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGA 61
            ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 29     TGCAAGTCGAACGGAGTGCCCTTCGGGCACTTAGTGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGG 88

Query 62     ATTTG-CCTTCAGGTCGGGGATAACGGCTGGAAACGGTCGCTAATACCGGATGTGCCGAG 120
            ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 89     ATCTGCCCTT-AGGTCGGGGATAACGACTGGAAACGGTCGCTAATACCGGATATGCCGAG 147

Query 121    AGGTGAAAGGTTAACTGCCTGAGGATGAGCTCGCGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA 180
            ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 148    AGGTGAAAGGTTAACTGCCTGAGGATGAGCTCGCGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA 207

Query 181    GGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTTTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGGACT 240
            ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 208    GGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTTTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGGACT 267

Query 241    GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGCAA 300
            ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 268    GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGCAA 327

Query 301    GCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGCGGGAGGAAGGCCTGTGGGTTGTAAACCGCTTTTCTC 360
            ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 328    GCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGGGGGAGGAAGGCCTGTGGGTTGTAAACCTCTTTCTC 387

Query 361    AAGGAAGAAGTCAGTGACGGTACTTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGC 420
            ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 388    AAGGAAGAAGCCAGTGACGGTACTTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGC 447

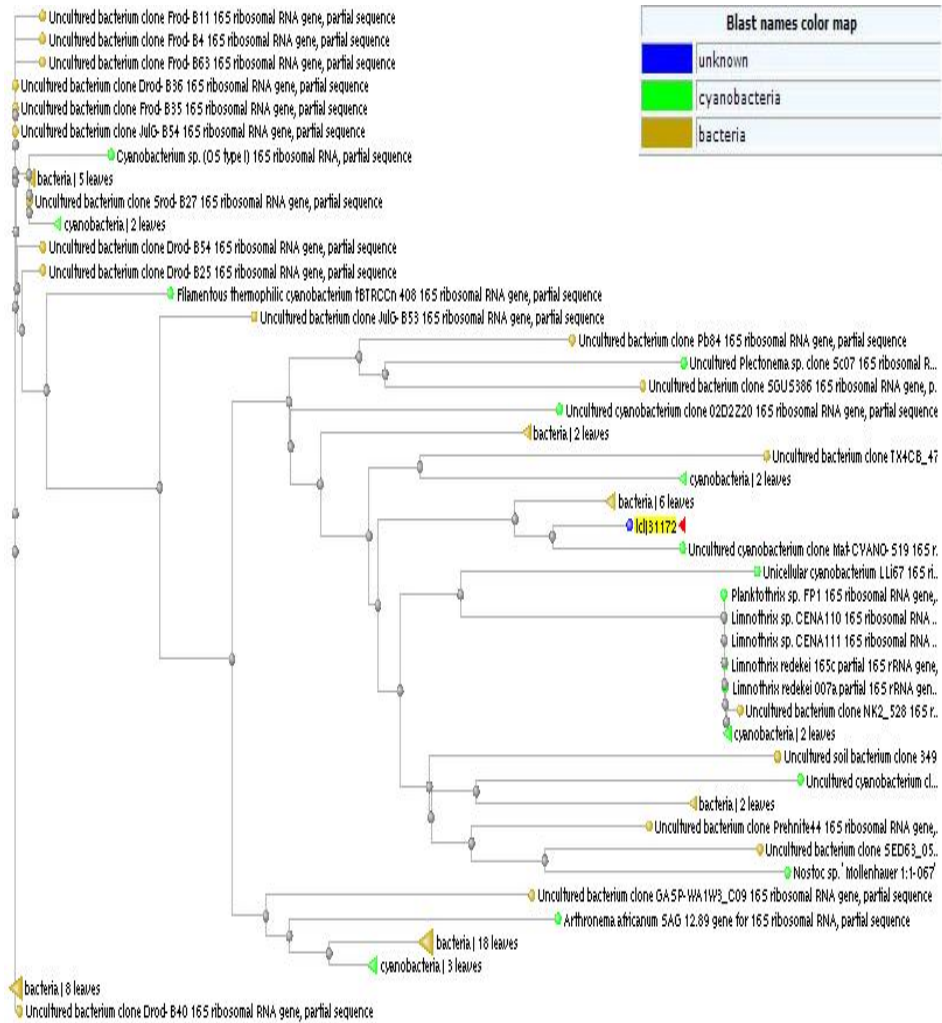
Query 421    CGCGGTAAGACGGAGGATGCAAGCGTTATCCCGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGG 480
            ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 448    CGCGGTAAGACGGAGGATGCAAGCGTTATCCCGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGG 507

Query 481    TGGTTATACAAGTCTGCCGTTAAAGCGTGGGGCTTAACTCCATAAGGGCGGTGGAACTG 540
            ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 508    TGGTTATACCAGTCTGCCGTTAAAGCGTGGG-CTTAACTCCATAAAGGGCGGTG-AACTG 565

Query 541    TATGACTAGAGTGAGGTAGGGGTAGAGGGAATCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT 600
            ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 566    TATGACTAGAGTGAGGTAGGGGTAGAGGGAAT-CCCGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAT 624

Query 601    ATCGGGAAGAACACCAGTGGCGAAAGCGCTCTACTGGGCCTTGACTGACACTGAGGTGAC 660
            ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 625    ATCGGGAAGAACACCAGTGGCGAAAGCGCTCTACTGGGCCTTGACTGACACTGAGG-GAC 683

```



Balçova.2 örneğimizin. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> kısmi 16S rRNA sonuçlarına göre 639/660 baz çiftlik bir alandaki dizilimde Oscillatoriales ordosu altında belirlenen tür kültüre edilemeyen(uncultured) olarak belirlenmiştir.

```

Query 41 CAGGAGGGGGACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCCATAAGCCGAGAGGTAAAAAG 100
      |||
Sbjct 1 CAGGAGGGGGACAACCATTTGGAAACGGTGGCTAATACCCATAAGCCGAGAGGTGAAAAG 60

Query 101 GAATCCGCCTGTGGAGGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTAGGTAGGTAAGAGCTTACCT 160
      |||
Sbjct 61 GAATCCGCCTGTGGAGGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTAGGTAAAGTAAAAGCTTACCT 120

Query 161 AGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGAGCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGC 220
      |||
Sbjct 121 AGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGAGCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGC 180

Query 221 CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGA 280
      |||
Sbjct 181 CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGA 240

Query 281 GCCAGACCGCGTGAGGGAAGAAGGCCCTTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAAG 340
      |||
Sbjct 241 GCCAGACCGCGTGAGGGAAGAAGGCCCTTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAAG 300

Query 341 AAAGTGACGGTACCTGAGG-AATCAG-CCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA 398
      |||
Sbjct 301 CAAGTGACGGTACTTGAGGCAAT-AGGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA 359

Query 399 GACGGAGGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGTGATT 458
      |||
Sbjct 360 GACGGAGGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGTGACT 419

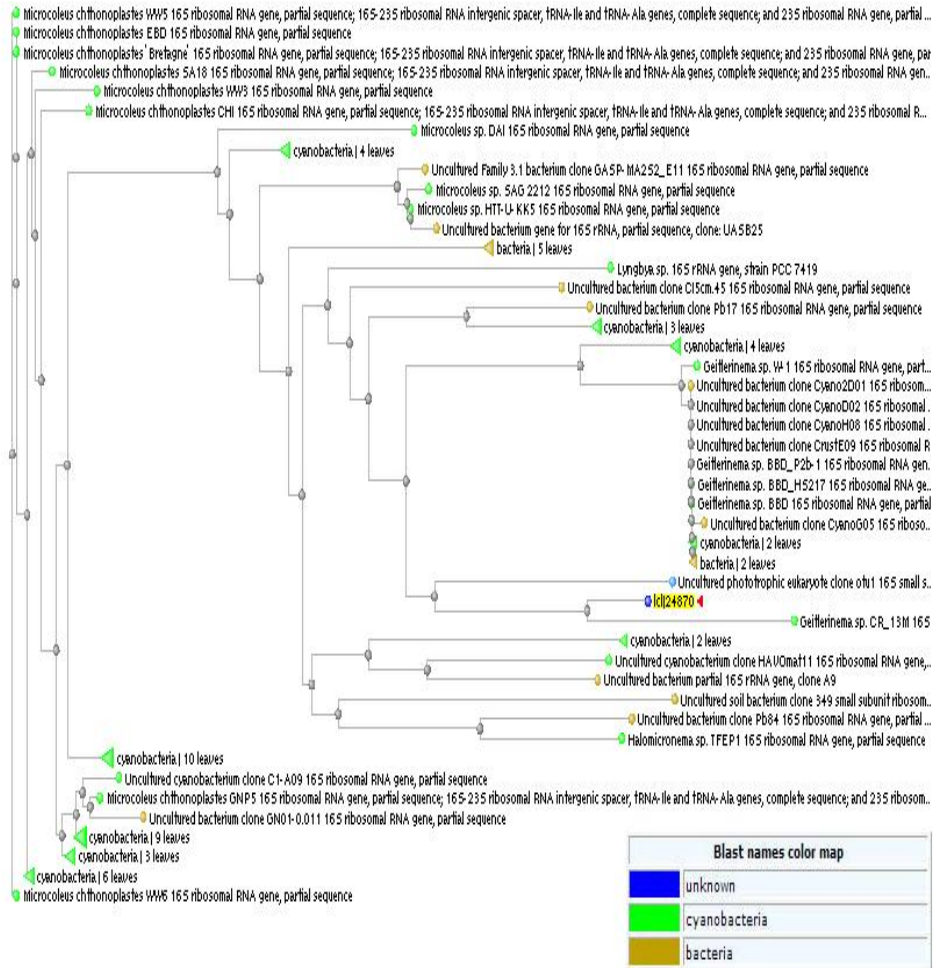
Query 459 CAAGTCTGCTGTCAAAACCCAGGGCTTAACCTCTGGATCGGCAGTGGAACCTGAATGACTA 518
      |||
Sbjct 420 CAAGTCTGCTGTCAAAACCTAGGGCTTAACCTCTAGAGAGGCAGTGGAACCTGAGTAACTA 479

Query 519 GAGTGCGGCAGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAA 578
      |||
Sbjct 480 GAGAGCGGCAGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGRGATCGGGAA 539

Query 579 GAACACCGCTGGCGAAAGCGCTCTGCTGGGCCGCGACTGACACTCACAGGACGAAACGTC 638
      |||
Sbjct 540 GAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTGGGCCGCGACTGACACTCACAGGACGAAA-G-C 597

Query 639 TAGGGGAGGGAATGGGATTAGATAC 663
      |||
Sbjct 598 TAGGGGAGCGAATGGGATTAGATAC 622

```



Zeytinalı örneğimizin. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> veritabanındaki kısmi 16S rRNA sonuçlarına göre 600/625 baz çiftlik bir alandaki dizilimde *Geitlerinema* sp. CR_13M ile % 96 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak, daha önce Şifne ve Zeytindalı olarak isimlendirdiğimiz örneklerimiz *Geitlerinema sp.* olarak tayin edilmiştir. Diğer Balçova örnekleri ise kültüre edilmeyen tür olarak kayıt edilmiştir.

Divisio : Cyanophyta

Classis : Cyanophyceae

Ordo : Oscillatoriales

Familya : Pseudanabaenaceae

Genus : *Geitlerinema sp.*

Geitlerinema sp. Tanımlanması:

İpliksi; iplikleri dallanmamış, genellikle tek yaşayan, uca doğru genellikle paralel şekilde yönelir, pürüzsüz, akıcı ve zarsı tabaka, zemini kaplar, başta mikroskobik daha sonra makroskobik, trikomlar daima kılıfsız, düz veya hafifçe dalgalı veya hilal şeklinde, isopolar, dar, 1-4 µm genişliğinde, tek sıralı, silindirik hücrelerden oluşmuş, karşılıklı duvarlarda daralma görülür, genellikle dardır ve sonlara doğru büzülmüş, genellikle hareketlidir. Hücreler silindirik, uzamış, az ya da çok isodiametrik, daha sonraları hücrelerin uzunluğu genişliğinden fazladır. Bazen belirgin granüller gözlenir (karotenoid), tillakoitler hücre çeperi boyunca konsantrik düzenlenmiştir; sondaki hücreler yuvarlak veya dar ve büzülmüştür, bazen çengel biçiminde, nokta şeklinde, dar-yuvarlak, bazen yuvarlak bir kaliptrayla sonlanır. Hücreler, mat mavi-yeşil, sarımsı yeşil, zeytin yeşili ve parlak yeşil renkte olabilirler. Heterosist ve akinet bulunmaz.

4. ÖNERİLER

Moleküler analiz yöntemleri birçok organizma üzerinde kullanılmıştır. Ancak alglerle ilgili bu tür çalışmalara özellikle de ülkemizde oldukça az rastlanmaktadır. Ayrıca termal mavi-yeşil alglerin (siyanobakteri) florası ile ilgili ülkemizde ve Dünyada çalışmalar morfolojik sistematik düzeyinde kalmaktadır.

Bu çalışmanın, daha sonra ülkemizde ve dünyada yapılacak moleküler çalışmalar için temel oluşturacağı ve ülkemizdeki termal mavi-yeşil alg florasının saptanmasına katkı yapılmıştır.

Bu çalışma ile ülkemizde termal mavi-yeşil alglerle (siyanobakterilerle) moleküler düzeyde yapılan bir çalışmanın bulunmamasından doğan boşluğu kapatarak ülkemizdeki sistematik çalışmalara yardımcı olmak beklediğimiz yararlar arasındadır. Bu çalışma sonunda elde edilen sonuçların ülkemizdeki moleküler sistematik ve ekstremofil organizmalar ile yapılan çalışmalara zemin oluşturacağı ve ileride yapılması planlanan araştırmalara yön vereceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abed M.R.R., Gracia-Pichel. F., Hernandez-Marine. 2002. M.,**
Polyphasic characterization of benthic. moderately halophilic.
moderately thermophilic cyanobacteria with very thin trichomes
and the proposal of *Halomicronema excentricum* gen. nov.. sp.
nov.. Arch Microbiol 177 :361–370
- Aysel, V., Çelik. A., Yayıntaş. A., Şıpal. U., 1992. 1992. Zonguldak**
Ilıksu Kaplıcası Alg Florası E.Ü.S.Ü. Dergisi. Sayı 9 (33–36): 72-
82.
- Bakır, M., 2006. Kalsiyum Alginatta İmmobilize Edilen Termofil**
Phormidium sp. ile Boya Giderimi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara
Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı.
- Binder, A., Wilson, K., Zuber, H., 1972. C-Phycocyanin from the**
thermophilic blue-green alga *Mastigocladus laminosus*. isolation.
characterization and subunit composition. Vol. 20. number 1.
- Birben, E., 2006. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain**
Reaction (PCR)). Astım alerji immünoloji.. 4 (2): 92-94
- Castenholz, R., W., 1967. Aggregation in a Thermophilic *Oscillatoria*.**
Nature. Vol. 215. 1285 – 1286.
- Castenholz, R., W., 1969. Thermophilic Blue-Green Algae and the**
Thermal Environment. Bacteriological Reviews. Dec. : 476-504.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Castenholz, R., W.,** 1996. Endemism and Biodiversity of Thermophilic Cyanobacteria. Nova Hedwigia. Beiheft. 112; 33-47.
- Castenholz, R., W., Waterbury, J., B.,** 1989. Oxygenic Photosynthetic Bacteria. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.3. Sec. 19. 1710-1806
- Çadircı, B., Tuney, İ., Yaşa, I., Sukatar, A., Gökçen, G.,** 2007. Isolation and identification of a thermophylic cyanobacterium from Balçova.İzmir.Turkey.38th CIESM Congress 9-13 April 2007 Istanbul-Turkey
- Desikachary, T.V.,** 1959. Cyanophyta. Indian Council Agricultural Research. New Delhi
- Garcia-Pichel, F., Nübel. U., Muyzer, G.,** 1998. The phylogeny of unicellular. extremely halotolerant cyanobacteria. Arch Microbiol. 169: 469-482
- Güner, H., Aysel, V.,** 1999. Tohumusuz Bitkiler Sistematığı Cilt I (Algler). IV. Baskı.251 s.
- Güner, H.,** 1966. Pamukkale Termal Suyunun Mikroflorası. Biologi 19. Ege Üni. Fen Fak. İlmi raporlar serisi No.31. Ege Üni. Matbaası. İzmir.
- Güner, H.,** 1967. Ege Bölgesi Termal Sularının Alg Vegetasyonu ile İlgili Ön Gözlemler. V. Türk Biyoloji Kongresi Tebliğleri

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Güner, H.**, 1970. Ege Bölgesi Kaplıca ve Maden Sularının Alg Vegetasyonu ile İlgili İnceleme. E.Ü.F.Fak. İ.R.S.. No: 99..
- Herrero, A., Muro-Pastor, A. M., and Flores, E.**, 2001. Nitrogen control in cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*. 183 (2): 411-425
- Hongmei, J., Aitchison. J.C., Lacap. D.C., Peerapornpisal. Y., Sompong. U., Pointing. S.B.**, 2005. Community phylogenetic analysis of moderately thermophilic cyanobacterial mats from China. the Philippines and Thailand. *Extremophiles*. 9. 325–332
- Kullberg. R. G.**, 1982. Algal Succession in a Hot Spring Community. *American Midland Naturalist*. Vol. 108. No. 2. 224-244.
- Lu, W., Evans, E.H., McColl. S.M., Saunders. V.A.**, 1997. Identification of cyanobacteria by polymorphisms of PCR-amplified ribosomal DNA spacer region. *FEMS Microbiology Letters* 153. 141-149
- Mackay, M.A., Norton. R.S., and Borowitzka. L.J.**, 1983. Marine blue green algae have a unique osmoregulatory system. *Marine Biology*. 73; 301-307.
- Mitchell, R.**, 1974. The Evolution of Thermophily in Hot Springs. *The Quarterly Review of Biology*. Vol. 49. No. 3. 229-242.
- Ono, E., Cuello J., L.**, 2007. Carbon Dioxide Mitigation using Thermophilic Cyanobacteria. *Biosystems Engineering*. 96 (1): 129–134

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Raven, J., A., Geider, R., J.,** 1988. Temperature and Algal Growth. The New Phytologist. Vol. 110. 441- 461.
- Sadettin, S., Dönmez G.,** 2006. Bioaccumulation of reactive dyes by thermophilic Cyanobacteria. Process Biochemistry 41. 836–841
- Saiki, R.K., Gelfand, D.U., Stoffel, S., Scharf, S.J., Iliguchi, R., Horn. G.T., Mnlis, K.B., Erlich, H.A.,** 1988. Primer Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. Science; 239:487-91.
- Shigeno, S., Toshiaki, K., Shigenori, K., Tetsuo, H.,** 2004. Enhancement of Human Fibroblast Growth and Other Dermatological Effects Induced by Cell Extract from Heat-Shocked Blue Green Alga (Cyanobacteria). Science Links Japan. Volume 38. No:1. 34-38.
- Sperling, J, A.,** 1975. Algal Ecology of Southern Icelandic Hot Sprinhgs in Winter. Ecology. Vol. 56. No. 1. 183-190.
- Stewart, W.D.P.,** 1973. Nitrogen fixation by photosynthetic microorganisms. Annual Review of Microbiology. 27; 283-316.
- Stockner, J, G.,** 1967. Observations of Thermophilic Algal Communities in Mount Rainier and YellowstoneNational Parks. Limnology and Oceanography. Vol. 12. No. 1. 13-17
- Sukatar, A.,** 2002. Alg Kültür Yöntemleri. Ege Üni. Fen Fak. Kitapları Serisi No:184. syf: 104

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sukatar, A.**, 2008. Fikoloji Ders Notları. Üniversiteliler Fotokopi.
- Sun L., Wang S.**, 2003. Allophycocyanin complexes from the phycobilisome of a thermophilic blue-green alga *Myxosarcina concinna* Printz. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 72. 45–53
- Tanaka, N., Nakamoto, H.**, 1999. HtpG is essential for the thermal stress management in cyanobacteria. FEBS Letters 458.117-123
- Tarkan, Ş.**, 2000. Urganlı Kaplıcaları (Turgutlu -Manisa) Alg Populasyonunun İncelenmesi ve Su Kalitesinin Değerlendirilmesi. Yük. Lis. Tez Çalışması. Ege Üni. Su Ürünleri A.B.D.
- Temel Moleküler Tanı Yöntemleri Kursu Hacettepe Üniversitesi Tıp Fak: Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD Lab. 23-24 Eylül 2008 Ankara
- Temizkan, G., Arda, N.**, 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. ISBN: 975423474. 73-111
- Tüney, İ.**, 2005. İzmir Körfezinde gelişen bazı *Cystoseira* türlerinin moleküler yapılarının karşılaştırmalı olarak incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi.
- Ulcay, S.Ö.**, 2005. Manisa ili ve çevresindeki kaplıcalarda yayılış gösteren mavi-yeşil alg türleri. Yüksek Lisans Tezi

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ulcay, S.Ö., Ö., S., Kurt, T., Taşkın, O., Öztürk, M.,** 2007. Dikili İlçesi (İzmir) kaplıcalarında yayılış gösteren termal Cyanophyceae (mavi-yeşil alg) türleri. Türk Sucul Yaşam Dergisi. 5-8: 371-378
- Ünal, T.,** 1996. İzmir Balçova (Agamemnon) Kaplıcası Mikroskopik ve Makroskopik Alg Florası. Yük. Lis. Tez Çalışması. Ege Üni. Fen Fak. Bio. A.B.D.
- Vasishtha, P., C.,** 1968. Thermal Cyanophyceae of India-I. Phykos. Vol. 7. 198- 241
- Ward, D.M., Castenholz, R.W.,** 2000. Cyanobacteria in geothermal habitats. In: Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space (Whitton. B. A. and Potts. M.. eds.). Kluwer Acad. Publ.. Dordrecht. pp. 37-59.
- Wilmotte, A., Auwera, G.V., Watcher, R.D.,** 1993. Structure of the 16 ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF (*Mastigocladus laminosus* HTF) strain PCC7518. and phylogenetic analysis. Volume 317. number 1.2. 96-100.

URL Adresleri

<http://www.med.gazi.edu.tr/egitim/donem1/dersler/bakterigenetigmycirak.htm>

http://www.sabem.saglik.gov.tr/kaynaklar/1152_1saglik_turizmi.pdf

<http://w3.gazi.edu.tr/web/erkoc/MIKROP/giris.pdf>

ÖZGEÇMİŞ

18. 01. 1982 tarihinde Mardin’de doğdu. İlköğrenimini Akıncılar İlköğretim Okulunda ve liseyi ise Buca Şirinyer Lisesinde okudu. 2000 yılında mezun oldu ve 2001 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı. 1 sene İngilizce hazırlık ve 4 sene lisans eğitimi gördükten sonra 2006 yılında Biyoloji Bölümü Botanik opsiyonundan mezun oldu. Aynı yıl Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü Hidrobiyoloji opsiyonunda yüksek lisansına başladı ve 2009 Şubat ayında ise tez çalışmasını tamamladı.