



**T.C.  
BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**MİKROALG KAYNAKLI ÖZÜTLERİN POTANSİYEL BİYOPESTİSİT  
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

Vesile Esra ERÇETİN

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Doktora Programı

**ARALIK 2024**

**T.C.  
BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**MİKROALG KAYNAKLI ÖZÜTLERİN POTANSİYEL BİYOPESTİSİT  
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Vesile Esra ERÇETİN**

**(181324815006)**

**ORCID: 0000-0001-8337-1154**

**Biyoteknoloji Anabilim Dalı  
Biyoteknoloji Doktora Programı**

**Danışman: Prof. Dr. Mete YILMAZ**

**ORCID: 0000-0002-0982-727X**

**ARALIK 2024**



BTÜ, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün 181324815006 numaralı Doktora Öğrencisi Vesile Esra ERÇETİN, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “MİKROALG KAYNAKLI ÖZÜTLERİN POTANSİYEL BİYOPESTİSİT AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

**Tez Danışmanı :**      **Prof. Dr. Mete YILMAZ** .....  
Bursa Teknik Üniversitesi

**Jüri Üyeleri :**      **Prof. Dr. Aydın TÜRKEÇ** .....  
Bursa Uludağ Üniversitesi

**Prof. Dr. Nurhayat DALKIRAN** .....  
Bursa Uludağ Üniversitesi

**Doç. Dr. Gökçe TANER** .....  
Bursa Teknik Üniversitesi

**Dr. Öğr. Üyesi Münevver Müge ÇAĞAL** .....  
Bursa Teknik Üniversitesi

**Teslim Tarihi**      :  
**Savunma Tarihi**    : **30 Aralık 2024**



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, Bursa Teknik Üniversitesi’nin aboneliği olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Lisansüstü Eğitim Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, 121N251 numaralı TÜBİTAK projesi ile desteklenmiştir.

## İNTİHAL BEYANI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belgelediğimi, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Vesile Esra ERÇETİN

İmzası:



*Aileme,*

## ÖNSÖZ

Bu tezin oluşum aşamasında bilgi ve tecrübeleri ile beni geliştiren, yol gösteren, gerekli olan her türlü imkanı sağlayarak en büyük katkıyı sağlayan, her açıdan desteklerini esirgemeyen değerli tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mete YILMAZ'a

Bu tez Prof. Dr. Mete Yılmaz'ın yürütücüsü olduğu TÜBİTAK 121N251 no'lu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir. Maddi desteğinden dolayı TÜBİTAK'a,

Laboratuvar çalışmalarım boyunca, çalışmaların huzurlu ve güzel bir ortamda gerçekleşmesini sağlayan laboratuvar arkadaşlarım Arş.Gör. Kübra ŞENTÜRK, Arş.Gör. Nazlı BAŞARAN, Meryem DİNDAR, Sena Karın KOTANCILAR'a

Tez yazım aşamasında beni destekleyerek tezi tamamlamam da büyük desteği olan Psikolog Nesrin TÜRKER'e

Tez çalışmamın yürütülmesi ve yazım aşamasında manevi desteğini esirgemeyen annem, babam, kardeşlerim, eşim ve kızıma,

Öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi hep yanımda olan, sevgi ve desteklerini bir an olsun ayırmayan annem, babam, kardeşlerim ve eşime

Sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim.

Aralık 2024

Vesile Esra ERÇETİN  
(Moleküler Biyolog)

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER .....	viii
KISALTMALAR .....	ix
SEMBOLLER .....	x
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
ÖZET.....	xiv
SUMMARY .....	xv
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>16</b>
1.1 Tezin Amacı .....	19
1.2 Genel Bilgiler .....	20
1.3 Literatür Araştırması .....	23
<b>2. MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>29</b>
2.1 Mikroalg Suşları ve Kültür Ortamları .....	29
2.2 Solventlerin Mikroorganizmalar Üzerindeki Toksik Etkisinin Belirlenmesi ..	38
2.3 Mikroalg Ekstraksiyon Yöntemleri .....	38
2.4 Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri.....	43
<b>3. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>	<b>50</b>
3.1 Solvent Toksikite Denemesi .....	50
3.2 Soxhlet Aparatı ile Ekstraksiyonu .....	54
3.3 Ultrasonik Banyo ile Ekstraksiyon .....	55
3.4 Prob Sonikasyon ile Ekstraksiyon .....	67
3.5 Cam Boncuk ile Ekstraksiyon Sonuçları.....	67
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>71</b>
4.1 Çalışmanın Uygulama Alanı .....	77
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>79</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>86</b>

## KISALTMALAR

<b>ATCC</b>	: American Type Culture Collection, VA, USA
<b>BBPD</b>	: Biyopestisit Kirlilik Önleme Bölümü
<b>CLSI</b>	: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
<b>DDT</b>	: Diklorodifeniltrikloroetan
<b>DHA</b>	: Dokosaheksaenoik asit
<b>DNA</b>	: Deoksiribo Nükleik Asit
<b>EPA</b>	: Eikosapentaenoik asit
<b>EPS</b>	: Ekzopolisakkarit
<b>GC-MS</b>	: Gaz kromatografisi/kütle spektroskopisi
<b>HCH</b>	: Hegzaklorosiklohegzan
<b>INT</b>	: Iodonitrotetrazolium
<b>MBC</b>	: Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
<b>MBCA</b>	: Mikrobiyal Biyokontrol Ajanları
<b>MIK</b>	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
<b>NA</b>	: Nutrient Agar
<b>NAD-GDH</b>	: NAD-Glutamat Dehidrogenaz
<b>NB</b>	: Nutrient Broth
<b>NR</b>	: Nitrat Redüktaz
<b>OD</b>	: Optik yoğunluk
<b>PAL</b>	: Fenilalanin amonyak liyaz
<b>PDA</b>	: Patates Dekstroz Agar
<b>PDB</b>	: Patates Dekstroz Broth
<b>PIP</b>	: Prolaktin İndüklenen Protein
<b>PLE</b>	: Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu
<b>POX</b>	: Peroksidaz
<b>PZR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonları
<b>SAR</b>	: Sistemik edinilmiş direnç

## SEMBOLLER

<b>%</b>	: Yüzde
<b>°C</b>	: Santigrat derece
<b>bp</b>	: Baz çifti
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbondioksit
<b>Dk</b>	: Dakika
<b>H<sub>2</sub>O</b>	: Hidrojen Dioksit (Su)
<b>K</b>	: Potasyum
<b>kb</b>	: Kilobaz
<b>kHz</b>	: Kilohertz
<b>M</b>	: Molar
<b>mg</b>	: Miligram
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	: Magnezyum klorür
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>mm</b>	: Mikrometre
<b>N</b>	: Azot
<b>NaCl</b>	: Sodyum Klorür
<b>NaNO<sub>3</sub></b>	: Sodyum Nitrat
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>P</b>	: Fosfor
<b>ppm</b>	: Milyonda bir birim
<b>ppt</b>	: Binde bir
<b>W</b>	: Watt
<b>α</b>	: Alfa
<b>β</b>	: Beta
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>µm</b>	: Mikrometre
<b>µmol</b>	: Mikromol

## ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 : Seçilen türler ve büyüdüğü ortamlar. ....	30
Çizelge 2.2 : BG11+N Ortamı. ....	30
Çizelge 2.3 : TAP (Tris-Acetate-Phosphate) Ortamı. ....	31
Çizelge 2.4 : Modifiye Johnsons J/1 Ortamı (Borowitzka, 1988). ....	32
Çizelge 2.5 : Plymouth Erdschreiber Ortamı (PES), (J.S. Erdschreiber, 1970). ....	32
Çizelge 2.6 : <i>Spirulina</i> Ortamı. ....	33
Çizelge 2.7 : Testlerde kullanılan bakteri ve kodları. ....	43
Çizelge 2.8 : Testlerde kullanılan mantar ve kodları. ....	44
Çizelge 3.1 : Bakteri ve mantarlarda, solventlerin (%100'lük) toksisite denemesinde oluşan zon çapları (mm). ....	54
Çizelge 3.2 : Metanol kullanılarak soxhlet aparatı ile gerçekleştirilen ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstrakt miktarları. ....	55
Çizelge 3.3 : MİK değerlerinin belirlenmesi için antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılan mikroalg kültürlerinin deneyler için numaralandırılması. ...	60
Çizelge 3.4 : Gram negatif bakterilerin mikroalg ekstraktlarının (%70 Metanol) zon çapları (mm) ve MİK değerleri (mg/mL). ....	65
Çizelge 3.5 : Gram pozitif bakterilerin mikroalg ekstraktlarının (%70 Metanol) zon çapları (mm) ve MİK değerleri(mg/mL). ....	66
Çizelge 3.6 : Cam boncuk ile elde edilen Karışık örnek ekstraktların agar kuyucuk ile belirlenen zon çapları (mm). ....	69
Çizelge 3.7 : Cam boncuk ile elde edilen <i>Spirulina</i> sp. ekstraktların agar kuyucuk ile belirlenen zon çapları (mm). ....	70

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 2.1 : Tek hücre izolasyonlarında kullanılan 96 kuyucuklu plateler.....	29
Şekil 2.2 : İzole edilen türlerin mikroskop görüntüleri.....	30
Şekil 2.3 : Türler ve büyüdüğü ortamlar .....	35
Şekil 2.4 : EPS elde edilme aşamaları, örnek yoğunlaştırma, etanol eklenerek karıştırılması.....	36
Şekil 2.5 : Diyaliz yöntemi ile tuzların uzaklaştırılması.....	37
Şekil 2.6 : Büyük hacimde büyütülen kültürlerin şişelerdeki görüntüsü.....	37
Şekil 2.7 : Hasatta kullanılan filtrasyon sistemi ve santrifüj sonunda elde edilen peletler.....	38
Şekil 2.8 : Soxhlet düzeneği ve rotary-evaporatör.....	39
Şekil 2.9 : Soxhlet işlemi sonrası kartuş içerisinde kalan biyokütle.....	40
Şekil 2.10 : Sonikasyon işlemi ile ekstraktların hazırlanması ve EPS'lerin homojen hale getirilmesi. ....	41
Şekil 2.11 : Cam boncuklar ile ekstraksiyon. ....	42
Şekil 2.12 : Ultrasonik banyo ile ekstraksiyon ve örneklerin santrifüjlenme aşaması. ....	43
Şekil 2.13 : Bakterilerin katı ve sıvı besiyerlerine öze yardımıyla ekimi.....	45
Şekil 2.14 : Ekstraktların platelerde disklerle emdirilmesi ve etanol uçurulması. ...	46
Şekil 2.15 : Diske emdirilmiş ekstrakt örnekleri ve pozitif kontrolün petri üzerinde görünümü. ....	46
Şekil 2.16 : Kuyu difüzyon yöntemi, pipet ucuyla açılan kuyucuklar.....	47
Şekil 2.17 : Platelerde (96 kuyucuklu) Broth mikrodilüsyon testi. ....	48
Şekil 2.18 : Plaka (96 kuyucuklu) MİK testi görünüm örneği. ....	48
Şekil 2.19 : INT ile MIC değerlerinin kolorimetrik olarak belirlenmesi.....	49
Şekil 3.1 : <i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876 solvent toksisite denemesi.....	51
Şekil 3.2 : <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 solvent toksisite denemesi. ....	51
Şekil 3.3 : <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 solvent toksisite denemesi.....	52
Şekil 3.4 : <i>Pseudomonas syringae pv. Tomato</i> solvent toksisite denemesi. ....	52
Şekil 3.5 : <i>Clavibacter michiganensis</i> solvent toksisite denemesi. ....	52
Şekil 3.6 : <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404 solvent toksisite denemesi.....	53
Şekil 3.7 : <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 solvent toksisite denemesi.....	53
Şekil 3.8 : <i>Penicilium</i> sp. solvent toksisite denemesi. ....	53
Şekil 3.9 : Soxhlet aparatı ile ekstraksiyon, <i>Salmonella typhimurium</i> bakterisinde oluşan halo zonlar.....	55
Şekil 3.10 : <i>Escherichia coli</i> bakterisinde zon çapları ölçüm ve görünümleri. ....	57
Şekil 3.11 : <i>Salmonella typhimurium</i> bakterisinde zon çapları ölçüm ve görünümleri. ....	57
Şekil 3.12 : <i>Bacillus cereus</i> bakterisinde zon çapları ölçüm ve görünümleri.....	58
Şekil 3.13 : <i>Staphylococcus aureus</i> bakterisi zon çapları ölçüm ve görünümleri. ....	58

<b>Şekil 3.14</b> : <i>Clavibacter michiganensis</i> bakterisinde zon çapları ölçüm ve görünümleri. ....	<b>58</b>
<b>Şekil 3.15</b> : MIK yönteminde kullanılan mikroalg ekstraktlarının 96 kuyucuklu plaka içerisinde yerleşimi. ....	<b>61</b>
<b>Şekil 3.16</b> : <i>Escherichia coli</i> bakterisine ait INT MIK yönteminde etkinin görüldüğü konsantrasyonun bulunduğu kuyular. ....	<b>62</b>
<b>Şekil 3.17</b> : <i>Bacillus cereus</i> bakterisine ait INT MIK yönteminde etkinin görüldüğü konsantrasyonun bulunduğu kuyular. ....	<b>63</b>
<b>Şekil 3.18</b> : <i>Staphylococcus aureus</i> bakterisine ait plakaların görünümü. ....	<b>63</b>
<b>Şekil 3.19</b> : <i>Salmonella typhimurium</i> bakterisine ait INT MIK yönteminde etkinin görüldüğü konsantrasyonun bulunduğu kuyular. ....	<b>64</b>
<b>Şekil 3.20</b> : <i>Clavibacter michiganensis</i> bakterisine ait plaka görünümü. ....	<b>66</b>
<b>Şekil 3.21</b> : <i>Pseudomonas syringae pv. Tomato</i> bakterisine ait plaka görünümü. ....	<b>67</b>
<b>Şekil 3.22</b> : Cam boncuklar ile elde edilen Karışık örnek ekstraktların <i>Escherichia coli</i> bakterisinde oluşan zon görüntüleri. ....	<b>68</b>
<b>Şekil 3.23</b> : Cam boncuklar ile elde edilen Karışık örnek ekstraktların <i>Bacillus cereus</i> bakterisinde oluşan zon görüntüleri. ....	<b>68</b>
<b>Şekil 3.24</b> : Cam boncuklar ile elde edilen Karışık örnek ekstraktların <i>Clavibacter michiganensis</i> bakterisinde oluşan zon görüntüleri. ....	<b>69</b>
<b>Şekil 3.25</b> : Cam boncuklar ile elde edilen Karışık örnek ekstraktların mantarlarda oluşan zon görüntüleri. ....	<b>69</b>
<b>Şekil 3.26</b> : Cam boncuklar ile elde edilen <i>Spirulina</i> sp. örnek ekstraktların <i>Escherichia coli</i> bakterisinde oluşan zon görüntüleri. ....	<b>69</b>
<b>Şekil 3.27</b> : Cam boncuklar ile elde edilen <i>Spirulina</i> sp. örnek ekstraktların bakterilerde oluşan zon görüntüleri. ....	<b>70</b>
<b>Şekil 3.28</b> : Cam boncuklar ile elde edilen <i>Spirulina</i> sp. ekstraktların <i>Pseudomonas syringae pv. Tomato</i> bakterisinde oluşan zon görüntüleri. ....	<b>70</b>

## MİKROALG KAYNAKLI ÖZÜTLERİN POTANSİYEL BİYOPESTİSİT AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

### ÖZET

Bitki hastalıkları, tarımda ürün verimi ve kalitesini ciddi şekilde olumsuz etkileyen önemli sorunlardan biridir. Bu hastalıklarla mücadelede yaygın olarak kullanılan sentetik kimyasallar, yalnızca hedef organizmalara değil, aynı zamanda çevreye ve diğer canlılara da zarar verebilmektedir. Bu olumsuzluklar, çevre dostu ve sürdürülebilir alternatifler arayışını artırmış, biyopestisitlerin önemini ön plana çıkarmıştır. Mikroalgler hem tarımsal ürünlerin korunması hem de geliştirilmesi açısından önemli bir potansiyel sunmaktadır. Mikroalgler, ıslah, yapraktan uygulama ve tohum hazırlama gibi farklı tarımsal uygulamalarda kullanılmakta ve çeşitli biyopestisit etkisi gösteren metabolitler üretmektedir. Bu çalışmada, Bursa Teknik Üniversitesi Alg ve Siyanobakteri Kültür Koleksiyonunda (AQUAMEB) bulunan 32 mikroalg suşu kullanılmıştır. Suşlar tatlı su, deniz ve yüksek tuzluluk içeren ortamlardan izole edilmiştir. Küçük ölçekli üretimlerin ardından hasat edilen mikroalgler liyofilize edilerek kurutulmuş ve farklı çözücüler (metanol, etanol, aseton, DMSO, hekzan ve metanol:su) ile çeşitli ekstraksiyon yöntemleri (soxhlet, prob sonikasyon, ultrasonik banyo ve cam boncuk) kullanılarak ekstrakt edilmiştir. Bu ekstraktların antimikrobiyal etkileri, bakteri ve mantarlar üzerinde agar disk difüzyon, agar kuyu difüzyon ve minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) yöntemleriyle test edilmiştir. Sonuçlar, polar çözücülerle hazırlanan ekstraktların gram-negatif bakterilere karşı daha etkili olduğunu göstermiştir. Özellikle metanol ve metanol-su çözücülerile hazırlanan ekstraktlar, *Escherichia coli* üzerinde güçlü inhibitör aktivite göstermiş ve MİK değerleri 0,625 mg/mL'nin altında tespit edilmiştir. *Salmonella typhimurium* testlerinde ise 25 mm'ye kadar zon çapı gözlenmiş, *Chlorophyta* AQUAMEB-59 ve *Scenedesmus sp.* AQUAMEB-57 türlerinden elde edilen ekstraktların bu bakteri üzerinde en etkili olduğu belirlenmiştir. Ancak, gram-pozitif bakteriler ve mantarlar üzerinde sınırlı bir etkinlik gözlenmiştir. Agar difüzyon ve MİK yöntemleriyle elde edilen bulgular birbiriyle tutarlıdır. Sonuç olarak, mikroalglerin antimikrobiyal ajan ve biyopestisit olarak kullanılma potansiyeli güçlü bir şekilde desteklenmektedir. Mikroalgler, tarım sektöründe antimikrobiyal direnç gelişimini azaltarak daha sağlıklı ve uzun vadede etkili çözümler sunabilir. Ayrıca, kimyasal kalıntı bırakmadan doğada kolayca parçalanabildikleri için çevresel etkileri de minimuma indirir. Ancak, bu türlerin geniş ölçekli uygulamalarda etkili ve yaygın bir şekilde kullanılabilmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Biyopestisit, Mikroalg, Sürdürülebilir Tarım, Mikrobiyal Aktivite.

## INVESTIGATION OF POTENTIAL BIOPESTICIDES ACTIVITIES OF MICROALGAE DERIVED EXTRACTS

### SUMMARY

Plant diseases are one of the major problems that significantly affect crop yield and quality in agriculture. Synthetic chemicals commonly used in the fight against these diseases can harm not only the target organisms but also the environment and other living organisms. These negative impacts have increased the search for environmentally friendly and sustainable alternatives, highlighting the importance of biopesticides. Microalgae present significant potential for both the protection and improvement of agricultural products. They are used in various agricultural applications such as breeding, foliar application, and seed treatment, producing metabolites with biopesticide effects. In this study, 32 microalgal strains from the Bursa Technical University Algae and Cyanobacteria Culture Collection (AQUAMEB) were used. The strains were isolated from freshwater, marine, and high salinity environments. After small-scale productions, the harvested microalgae were lyophilized and dried, and then extracted using various solvents (methanol, ethanol, acetone, DMSO, hexane, and methanol:water) with different extraction methods (Soxhlet, probe sonication, ultrasonic bath, and glass beads). The antimicrobial effects of these extracts were tested on bacteria and fungi using agar disk diffusion, agar well diffusion, and minimum inhibitory concentration (MIC) methods. The results showed that extracts prepared with polar solvents were more effective against gram-negative bacteria. In particular, extracts prepared with methanol and methanol-water solvents exhibited strong inhibitory activity against *Escherichia coli*, with MIC values detected below 0.625 mg/mL. In *Salmonella typhimurium* tests, a zone diameter of up to 25 mm was observed, with extracts obtained from *Chlorophyta* AQUAMEB-59 and *Scenedesmus sp.* AQUAMEB-57 being the most effective against this bacterium. However, limited activity was observed against gram-positive bacteria and fungi. The findings obtained through agar diffusion and MIC methods were consistent with each other. In conclusion, the potential of microalgae as antimicrobial agents and biopesticides is strongly supported. Microalgae can provide healthier and more effective long-term solutions in the agricultural sector by reducing antimicrobial resistance development. Furthermore, since they decompose easily in nature without leaving chemical residues, their environmental impact is minimized. However, further research is needed for the effective and widespread use of these strains in large-scale applications.

**Keywords:** Biopesticides, Microalgae, Sustainable Agriculture, Microbial Activity.

## 1. GİRİŞ

Tarımsal üretim, iklim değişikliği, dünya nüfusunun hızla artması gibi faktörler nedeniyle giderek zorlaşan ve azalmaya başlayan bir hal almaktadır. Ayrıca tarım zararlıları nedeniyle tarımsal verimlilik her geçen yıl azalmaktadır (Arora, 2019). Bitki zararlıları ve hastalıkları tarımda karşılaşılan en büyük sorunlardan biridir. Bu durum her yıl dünya genelinde önemli ölçüde verim kaybına neden olarak tarım ekonomisine ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Bu zararlılarla mücadele amacıyla kullanılan pestisitler, etkili sonuçlar vermiş olmasına karşılık, içeriğindeki bileşenler nedeniyle çevreye ve insan sağlığına olumsuz etkilere neden olmakta ve ekosistemin dengesini bozmaktadır (Pimentel, 2005).

Sürdürülebilir tarım uygulamalarının temel zorluklarından biri olan tarımsal zararlı organizmaların kontrolünde geleneksel pestisitlere alternatif olarak kullanılabilen etkili ve çevre dostu ürünlerin araştırılması tarım, insan sağlığı ve çevre için hayati önem taşımaktadır (Mol ve Purushothaman, 2020).

Pestisit, tarım zararlısı organizmaların (bakteri, virüs, mantar, böcek) mahsullere olumsuz etkilerini azaltmak amacıyla kullanılan kimyasal veya organik bileşenlerden oluşan maddelerdir. Bu ürünler sadece tarım zararlılarının etkilerini engellemez aynı zamanda yararlı organizmalara olumsuz etki göstererek ekolojik dengenin bozulmasına ve biyolojik çeşitliliğin yok olmasına neden olur. Kuşlar, suda yaşayan organizmalar, hayvanlar ve insanlar pestisitlerin tehdidi altındadır. Özellikle bu ürünlerin kontrolsüz ve bilinçsiz kullanımı çevrenin sürdürülebilirliği ve canlıların sağlığı açısından büyük endişe kaynağıdır (Carson, 2015; Köhler ve Triebkorn, 2013).

Stockholm Sözleşmesi (2002) ile kalıcı (DDT, HCH, toksafen, aldrin ve dieldrin) ve biyolojik birikimli kimyasallar yasaklanarak daha güvenli kabul edilen kimyasallarla değiştirilmiş olmasına rağmen geçmişte yoğun kullanımları hala toprak, tortu ve biyosferde kalıntılarını sürdürmekte çevre ve canlılar için toksik etki riskleri devam etmektedir (Carvalho, 2017). Yine de bu kimyasalların uzun vadede birikimleri aynı

sorunların katlanarak gözlenmesine etken olacaktır. Bu nedenle daha güvenilir olarak biyolojik kaynaklı ürünlerin kullanımı desteklenmelidir.

Biyopestisit terimi, doğal olarak oluşan bileşikleri (örneğin sodyum bikarbonat, sodyum asetat), çeşitli organizmalar veya genetiği değiştirilmiş bitkiler tarafından doğal olarak üretilen biyokimyasal maddeleri ve ayrıca tarımsal uygulamalarda zararlıları kontrol etmek için kullanılan mikroorganizmaları (bakteri, virüs, mantar, alg vb.) kapsamaktadır (Sudakin, 2003). Ayrıca tarımsal ürünlere DNA'nın genetik olarak dahil edilmesini içeren süreçleri (bitkiye dahil edilmiş koruyucular) kapsar. Çoğunlukla bakteri, virüs, mantar gibi mikroorganizmalardan, alg ve bitki ekstraktlarından veya belirli biyokimyasal bileşiklerden elde edilirler. Temel özellikleri hedef zararlı organizmaya özel etki etme ve doğada biyobozunur olmalarıdır. Ekolojik zincirde büyük hasarlar oluşturmadan veya çevreyi olumsuz yönde etkilemeden tarımsal zararlı kontrolünde oldukça etkilidirler. Bu yönüyle sürdürülebilir tarım uygulamaları için çevre dostu bir yaklaşım olması ile tercih sebebidirler (Copping ve Menn, 2000). Bazı zararlı türlerinde pestisit direncinin gelişmesi ve kimyasal kalıntıların güvenliğiyle ilgili endişeler nedeniyle, bitki koruma için kimyasal pestisitlere alternatifler geliştirme gereksinimi vardır. Bir çözüm, gıda üretiminde alternatif olarak biyopestisitlerin (canlı organizmalara dayalı zararlı kontrol ajanları) kullanılmasıdır (Rani ve diğ, 2013, Saritha ve Prasad Tollamadugu, 2018).

Biyopestisit ve Kirlilik Önleme Birimine (BPPD) göre Biyopestisitler temel olarak üç alt kategoride ele alınır; biyokimyasal biyopestisitler (bitkilerden veya doğal maddelerden elde edilen kimyasallar), mikrobiyal biyopestisitler (biyolojik kontrol ajanları olarak işlev gören mikroorganizmalar) ve (PIP'ler) bitkiye dahil edilmiş koruyucu maddeler (bitkiye genellikle genetik mühendislik yoluyla eklenen genetik materyal içeren, bitkiler tarafından üretilen pestisit maddelerdir). Tüm biyopestisit türleri, tarımsal soruna yönelik spesifik, etkili ve güvenli çözümleri hedeflemektedir (Marrone, 2019). Kökenlerine bağlı olarak ise biyokimyasal biyopestisitler, bitkisel biyopestisitler ve mikrobiyal biyopestisitler olarak sınıflandırılabilirler (Marutescu ve diğ, 2017).

Köhl ve diğ. (2019) yaptıkları çalışmalar doğrultusunda biyopestisitlerin, bilhassa mikrobiyal biyokontrol ajanlarının (MBCA'lar), tarım zararlılarına karşı etkin mekanizmalar (besin rekabeti ile patojen büyümesini baskılama, doğrudan üretilen

antimikrobiyal bileşiklerle patojen ile savaşma ve bitkilerde direnç oluşturma) ile kontrol sağladığını ifade etmektedir. Bu durum biyopestisitleri, kimyasal pestisitlere oranla daha düşük direnç geliştirme riski ile onları daha sürdürülebilir seçenek olarak sunar. Ayrıca biyopestisitlerin, kullanılan mikroorganizmaların doğal süreçlerine olumsuz etki göstermemesi ile insan ve çevre açısından onları daha güvenli kılmaktadır. Tarımsal üretim verimliliğinin artmasını sağlaması, çevre dostu bir alternatif oluşturması, insan sağlığına daha az zararlı olması, çevre bilincinin artması, pestisit direncini azaltması ve kimyasal pestisitlerin olumsuz etkileri nedeniyle son yıllarda biyopestisitlere olan ilgiyi artırmaktadır.

Pestisit ve biyopestisitlere ait farklar, avantaj ve dezavantajlar aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

#### Pestisitler:

- Kimyasal maddelerden oluşan ürünlerdir.
- Bitki hastalıklarını ve zararlılarını önler veya yok eder.
- Avantajları: Etkili, hızlı ve ucuzdur.
- Dezavantajları: Doğaya ve insan sağlığına zararlı olabilir, uzun dönemli etkileri bilinmez.

#### Biyopestisitler:

- Doğal maddelerden (örneğin bakteriler, mantarlar, toksinler) veya sentetik olarak oluşturulan mikroorganizmalardan oluşan ürünlerdir.
- Bitki zararlılarını kontrol etmek ve hastalıkları önlemek için kullanılır.
- Avantajları: Doğal, güvenli ve uzun dönemli etkileri bilinir.
- Dezavantajları: Etkinliği sınırlı olabilir, pahalıdır ve kullanımı zordur.

Mikrobiyal biyopestisitler olarak mikroalgler, sentezledikleri bir dizi metabolit içerikleri ile toprak ve bitkiler için zararlı organizmaların kontrolünde potansiyel biyolojik ajanlar olarak kabul görmektedir (Costa ve diğ, 2019).

Mikroalglerin, bitkilerden farklı olarak, büyümeleri için basit besin gereksinimleri olmaları, hızlı ve yüksek biyokütle üretimi gerçekleştirebilmeleri ve ekilebilir araziye ihtiyaç duymamaları nedeniyle biyopestisit olarak üretimleri daha avantajlı olmaktadır (Richmond, 2004). Biyokütlesi biyorafineri mantığı ile sadece

biyopestisit olarak değil, tarım uygulamaları için içeriğinde yer alan N, P, K gibi elementler sebebiyle makro ve mikro besin kaynağı olarak kullanılabilir (Abdel-Raouf ve diğ, 2012). Erozyonu azaltabilir, biyogübre olarak kullanılabilir, toprağın ve tarımsal atık suyun geri kazanımını sağlayabilirler ve topraktan ağır metallerin uzaklaştırılmasında önemli rollere sahiptirler (Bidyarani ve diğ, 2016, Kheirfam ve diğ, 2017, Manjunath ve diğ, 2016, Marks ve diğ, 2017, Quadros ve diğ, 2016).

Son yıllarda mikroalglerin tarımsal sürdürülebilirlik üzerine potansiyel özellikleri ile farklı tarımsal uygulamalar ve biyopesitisit üretiminde kullanımları onların daha fazla araştırılması gerekliliğini artırmıştır.

### **1.1 Tezin Amacı**

Bu doktora tezi, biyoçeşitliliği ve çevre dostu tarım uygulamalarını teşvik etmek amacıyla mikroalglerden elde edilen potansiyel biyopestisitlerin anti-mikrobiyal aktivitelerini incelemeyi amaçlamaktadır. Mikroalgler, biyoçeşitliliğin önemli bir bileşeni olarak değerlendirilir ve tarımsal zararlı organizmalarla mücadelede alternatif çözümler sunma potansiyeline sahiptir. Bu tez çalışması, mikroalglerden elde edilen biyoaktif bileşenlerin antimikrobiyal etkilerini belirleyip değerlendirerek, sürdürülebilir tarım uygulamalarında tarımsal zararlı organizmalara karşı geliştirilmesine katkı sağlamayı amaçlamaktadır. Mikroalglerin biyolojik kaynaklar olarak kullanımını artırmak ve kimyasal pestisitlerin kullanımını azaltarak tarımın çevresel sürdürülebilirliğini artırmak için bu çalışma, önemli bir adım olacaktır.

Tezin ana hedefleri şunlardır:

1. Mikroalg ekstralarının antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi: Farklı mikroalg türlerinden farklı ekstrakt yöntemleri ile elde edilen biyoaktif bileşenlerin antimikrobiyal potansiyelleri belirlenecektir.
2. Bitki Zararlıları Üzerindeki Etkilerin Araştırılması: Mikroalg kaynaklı biyoaktif bileşenler tarım patojenlerine karşı laboratuvar koşullarında test edilecek ve potansiyel biyopestisit olarak kullanılacak aktif ekstraların belirlenmesi ile tarla ve sera denemeleri için öncül araştırma olacaktır.
3. Sürdürülebilir Tarım Uygulamalarına Katkı Sağlama: Mikroalglerden elde edilen biyopestisitlerin tarım sektöründe kullanımının çevre ve tarımsal sürdürülebilirliğe

katkı sağlayabileceğinin belirlenmesi ve çevre dostu tarım uygulamalarının teşvik edilmesini sağlayacaktır.

## 1.2 Genel Bilgiler

Mikrobiyal aktivite, mikroorganizmaların (bakteri, virüs, mantar ve bazı protistler gibi) belirli bir ortamda gerçekleştirdikleri biyolojik işlevleri ifade eder. Bu terim, mikroorganizmaların büyüme, çoğalma, beslenme, metabolik işlevleri ve çevresel etkileri kapsamaktadır. Mikroorganizmalar buldukları ortamda çeşitli enzimler ve metabolitler üreterek hem çevrelerine hem de diğer canlılara etki ederler (Madigan, 2008).

Antimikrobiyal aktivite ise, mikroorganizmaların (bakteri, virüs, mantar), genellikle doğal bir maddenin araştırılmasında kullanılarak, kullanılan maddenin organizma üzerinde büyüme ve çoğalmasını inhibe etme veya öldürme yeteneğini ifade eder. Bu maddeler mikroorganizmanın hücre zarını bozma, protein veya DNA sentezini durdurma, organizmanın metabolik süreçlerini engelleme şeklinde etkili olmaktadır. Bu etki doğal bileşikler, kimyasal maddeler, biyolojik ajanlar kullanılarak sağlanır (Kayaş, 2019).

Kısaca mikrobiyal aktivite mikroorganizmaların kendi biyolojik aktivite süreçlerini ele alırken, antimikrobiyal aktivite onların büyüme veya ölme durumlarını etkileyen maddelere atıfta bulunur (Villa, 2014).

Antibakteriyel madde, bakterilere karşı etkili olan, onların büyümesini durduran (bakteriyostatik) ya da onları öldüren (bakterisidal) maddeleri ifade eder. Antifungal madde, mantarlar üzerinde etkili olan, onların büyümesini durduran (fungistatik) ya da onları öldüren (fungusidal) maddeleri ifade eder (Vanzolini, 2020).

Bu terimler, bir maddenin hangi tür mikroorganizmaya karşı etkili olduğunu ifade etmek için kullanılır. Bir maddenin antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu söyleyebilmek için hem antibakteriyel hem de antifungal etki göstermesi gerekmektedir.

Bu etkilerin görüldüğü maddeler, bazı bakteriler, mikroalgler (ikincil metabolitler) ve bitkilerin ürettiği (polifenoller, terpenoidler, flavonoidler) biyolojik bileşikler, antibiyotikler (enfeksiyon tedavilerinde kullanılan), antiviral ve antifungal ajanlar olarak sıralanabilir. İlaç, tarım ve gıda alanlarında mikroorganizmalara karşı etkili

olarak güvenliğin sağlanması ve yeni tedavilerin geliştirilmesine imkan sağlarlar (Cohen, 2002; Hannon ve diğ, 2010). Ayrıca, doğal antimikrobiyallerin kullanımı sadece tıp ile sınırlı değildir. Tarım, gıda koruma ve sanitasyon gibi alanlarda da yaygın kullanım alanlarına sahiptir. Tarımsal biyopestisit olarak, bu bileşikler bitkileri fitopatojenlerden koruyabilir, hasat sonrası kayıpların azaltılmasına ve sentetik kimyasallara ihtiyaç duyulmadan gıda güvenliğini sağlayabilirler. Çok yönlü avantajları, geniş spektrumlu aktivite, biyolojik olarak parçalanabilirlik ve düşük toksisite, sürdürülebilir tarım uygulamaları ile uyumludur (Cheung ve diğ, 2014).

Algal ekstraktlar, birçok farklı alg türünden elde edilmekte ve farklı biyoaktif bileşikleri içermektedir. Mikroalglerin ürettiği birincil ve ikincil metabolitler, indoller, terpenler, yağ asitleri, uçucu halojenli hidrokarbonlar (bromoform, kloroform, dibromometan), asetojeninler ve fenoller geniş etkili antimikrobiyal aktiviteye sahip bileşiklerdir (Butler ve Carter-Franklin, 2004; Cardozo ve diğ, 2007; Dembitsky ve Srebnik, 2002). Bu metabolitlerden alkaloidler, poliketidler, peptitler, polisakkaritler, florotaninler, diterpenler, steroller, kinonlar, lipidler, gliseroller, fenolikler ve yağ asitleri gibi bileşikler, patojenlerin metabolik yollarını bozarak hücre ölümlerini tetikleyebildikleri gibi, organizmanın hücre zarlarını bozma, protein ve DNA sentezlerini inhibe edebilme etkilerine sahiptirler (Parsaeimehr ve Lutz, 2016; Hernández-Carlos ve Gamboa-Angulo, 2011). Örneğin, belirli lipit türevleri zar geçirgenliğini değiştirirken, polisakkaritler ve fenolik bileşikler serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek koruyucu rol oynarlar. Ayrıca bazı metabolitler, mikroorganizmalar arasında sinyal moleküllerine hasar vererek biyofilm oluşumunu engeller (Asimakis ve diğ, 2022; Cheung ve diğ, 2014; Hamed ve diğ, 2018; Kulik, 1995; Encarnaçao ve diğ, 2015; Gonçaves, 2021). Bu mekanizmalar ile mikroalgler, biyopestisit olarak kullanım potansiyeli sağlarlar. Sürdürülebilir tarım ve çevresel korumaya katkıda bulunabilirler (Costa ve diğ, 2019).

Mikroalg ekstraksiyonu, mikroalglerden yağ, pigment, protein vb. bileşenlerin çıkarılması işlemidir. Mikroalglerden bu biyokimyasal bileşenlerin çıkarılmasında farklı yöntemler kullanılmaktadır, bu yöntemlerden yaygın olarak kullanılanları aşağıda maddeler halinde bahsedilmiştir (Elcik ve Çakmakçı, 2017).

- Soğuk Presleme: Bu yöntem, mikroalglerin içerdikleri yağları çıkarmak için kullanılır. Mikroalgler mekanik olarak sıkılarak yağlar elde edilir. Bu yöntem, düşük maliyetli ve basit bir yöntemdir.

- Ultrasonik Ekstraksiyon: Ultrasonik dalgalar, mikroalg hücrelerinin parçalanmasına yardımcı olur ve içerdikleri bileşenlerin çıkmasını kolaylaştırır. Bu yöntem hızlıdır ve yüksek verimli sonuçlar elde etmek için kullanılır.
- Süperkritik CO<sub>2</sub> Ekstraksiyonu: Bu yöntemde, CO<sub>2</sub> süperkritik bir sıvı haline getirilir ve mikroalglerle temas ettirilir. Bu süreç, yağların ve diğer bileşenlerin çıkarılmasını sağlar. Süperkritik CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu, kimyasal kalıntı bırakmaz ve yüksek saflıkta ürün elde edilmesine yardımcı olur.
- Organik Çözücü Ekstraksiyonu: Organik çözücüler (örneğin etanol) kullanarak mikroalglerin içerdikleri bileşenler çıkartılabilir. Bu yöntemlerle yağlar, pigmentler ve diğer bileşenler çıkartılabilir. Ancak, çözücülerin geri kazanılması ve atık yönetimi gibi sorunlara dikkat etmek gerekebilir. Soxhlet ekstraksiyonu, genellikle organik çözücülerle yapılan, ısıl işleme dayalı bir işlemdir ve doğal ürünlerin izolasyonunda, özellikle bitki özlerinin elde edilmesinde kullanılır.
- Mikrodalga Ekstraksiyonu: Mikrodalga enerjisi, mikroalglerin hücrelerini parçalamak ve içerdikleri bileşenleri çıkarmak için kullanılabilir. Bu yöntem hızlı ve etkilidir.
- Enzimatik Ekstraksiyon: Enzimler, mikroalg hücre duvarlarını parçalayarak içerdikleri bileşenlerin çıkarılmasına yardımcı olabilir. Bu yöntem, özellikle proteinlerin çıkartılması için kullanışlıdır.
- İyonik Sıvı Ekstraksiyonu: İyonik sıvılar, mikroalg bileşenlerini çıkarmak için kullanılabilir. Bu yöntem, özellikle pigmentlerin çıkartılması için uygundur.

Kullanılacak yöntem elde edilmesi istenilen bileşene, elde edilecek mikroalg türüne ve hangi alanda kullanılacağına göre değişkenlik göstermektedir. Ayrıca bu seçimlerde, laboratuvar imkanları, çevre ve ekonomik faktörler de etkilidir. En uygun yöntemin belirlenmesi için analizler yapılmalıdır.

Algal ekstraktların antimikrobiyal aktivitesi, farklı solventler kullanılarak elde edilen ekstraktlar için değişkenlik gösterebilir. Solvent seçimi, ekstrakt edilen örneğin çeşitliliğini ve miktarını etkileyebilir. Çoğu araştırmada, algal ekstraktların antimikrobiyal aktivitesi için etanol, metanol ve diğer alkoller, sıvı kloroform,

hidroklorik asit, aseton veya su gibi polar solventler kullanılmıştır. Kullanılan bu solventler, algal ekstraktların çeşitli bileşenlerini elde ederek antimikrobiyal aktivitenin tayin edilebilmesi için öne çıkar. Özellikle etanol ve metanol, algal ekstraktların protein, polisakkarit, fenolik ve terpenoid bileşiklerini elde etmek için kullanılmıştır. Bu bileşenlerin yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (Belwal ve diğ, 2020).

Algal ekstraktların biyopestisit olarak kullanımı, doğal ve güvenli bir alternatif olarak kabul edilmektedir. Etki ve uygulama yöntemlerinin daha iyi anlaşılabilmesi için bu alanda daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Tarımsal uygulamalarda, zararlılara karşı doğal ürünlerin kullanımı, biyolojik parçalanabilirliklerinin daha yüksek oluşu ve düşük kalıntı bırakma durumları çevre açısından güvenlidir. Ayrıca etki mekanizmaları mikrobiyal direnç oluşturma olasılığını düşürmektedir.

### **1.3 Literatür Araştırması**

Mikroalglerin tarımsal zararlılara karşı kullanılabilen biyolojik kaynaklar olduğu ve antimikrobiyal özelliklerinin gösterildiği çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Çeşitli biyolojik aktiviteye sahip olmaları içerdikleri zengin biyoaktif bileşikler ile mümkündür. (Matanjun ve diğ, 2008; Wijesekara ve diğ, 2010; Tuney ve diğ, 2007). Alglerden elde edilen ekstraktların, bakteri kökenli patojenlerin yanı sıra mantar ve virüsler üzerinde de etkili olduğu bilinmektedir (Bouhlal ve diğ, 2013; de Felício ve diğ, 2010). Ayrıca antibiyotik dirençli bakterilere karşı etkili olduğu bildirilmiştir. Antibiyotik direnci giderek ciddi bir sorun haline gelmekte ve mikroalgal biyopestisitler patojenlere karşı alternatif koruma sağlayarak antibiyotik kullanımını önemli ölçüde azaltılmasına imkan sağlamaktadır (Fayaz ve diğ, 2024). Mikroalgler birkaç yararlı ürünü sentezleyebilmesine rağmen, yeni antibiyotikler için arama hala başlangıç aşamasındadır.

Mikroalglerden antimikrobiyal aktiviteye yönelik en erken katkılar Pratt ve diğ. (1944) tarafından *Chlorella vulgaris* ve *Chlorella pyrenoidosa* türlerinde gerçekleştirdikleri çalışmaya dayanmaktadır. Bu türlerden elde edilen klorelinin olarak isimlendirilen antibakteriyel madde gram negatif ve pozitif bakterilerde inhibitör aktivite göstermiştir.

*Nostoc* ATCC 53789 suşunun metanolik özü, 12 mantardan 9'una (*Armillaria* sp., *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, *Penicillium expansum*, *Rosellinia* sp., *Phytophthora cambivora*, *Phytophthora cinnamomi*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, ve *Verticillium albo-atrum*) karşı aktivite göstermiş, büyümelerini inhibe etmiştir. Antibakteriyel aktiviteye rastlanmamıştır. *Sclerotinia sclerotiorum* bitki patojenine karşı güçlü antifungal etkisi göstermesi nedeniyle domates üzerinde denemeler yapılmıştır. Sonuçlar siyanobakterinin biyopestisit olarak uygulanabileceğini gösterirken, bitki ve hedef dışı organizmalarda toksik etkilerinin azaltılması gerektiği öne çıkmıştır (Biondi ve diğ., 2004).

Güney Kore pirinç tarlalarından on farklı lokasyondan izole edilen 142 siyanobakteri suşundan (14 farklı cins) su, metanol ve petrol eteri kullanılarak ekstraktlar hazırlanmıştır. Bu ekstraktlar acı biberde (*Capsicum annuum* L) hastalıklara neden olan yedi fitopatogenik mantara karşı antifungal özellikler açısından agar difüzyon testi kullanılarak test edilmiştir. Test edilen siyanobakteriler içerisinde sadece dokuz suş (%6,34) antifungal etki göstermiştir (iki *Oscillatoria* türü, iki *Anabaena*, üç *Nostoc*, bir *Nodularia* ve bir *Calothrix*). *Alternaria alternata* dokuz ve *Botrytis cinerea* ise sekiz siyanobakteri türü tarafından inhibe edilmiştir. Sadece *Nostoc commune* FK-103'ün metanol ile ekstraktı *Rhizopus stolonifer*'in büyümesini inhibe etmiştir. Antifungal aktiviteleri, diğer parametrelerin yanı sıra (biyokütle, klorofil-a konsantrasyonu), geç eksponansiyel büyüme fazında büyüme sıcaklığı ile ilişkilendirilmiştir. İnhibasyon seviyeleri *N. commune* FK-103 22,5 mm ve *O. tenuis* FK-109 31,8 mm'dir. (Kim, 2006).

Basınçlı sıvı ekstraksiyonu (PLE) kullanılarak *Dunaliella salina* ile farklı çözücüler (hekzan, petrol eteri, etanol ve su) ve farklı sıcaklıklar (40°C, 100°C ve 160°C) kullanılarak elde edilen ekstraktlar *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* bakterileri ve *Candida albicans* ve *Aspergillus niger* mantarları üzerinde test edilmiştir. En etkili sonuç hekzan ve etanol ile 160°C'de elde edilmiştir. Antimikrobiyal aktiviteden, palmitik asit,  $\alpha$ -linolenik asit ve oleik asit yağ asitleri,  $\beta$ -siklositral,  $\alpha$ - ve  $\beta$ -ionon, neofitadien ve fitol gibi uçucu bileşiklerin etkili olduğu belirlenmiştir. Yanı sıra 15 farklı uçucu bileşik tespit edilmiştir. Bu bileşiklerin tamamının daha önce antimikrobiyal ajanlar olarak tanımlandığı ve mikroorganizmalara karşı etkili oldukları belirlenmiştir (Herrero ve diğ., 2006).

*Himantalia elongata* ve *Synechocystis* sp. türlerinin biyoaktif bileşikleri, antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri incelemiştir. Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu (PLE) yöntemi ile hekzan, etanol, su kullanılarak ekstraktlar hazırlanmıştır. *Synechocystis* sp.'un etanol ile hazırlanan ekstraksiyonu *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 üzerinde etkili olduğu, fakat *Candida albicans* ATCC 60193 ve *Aspergillus niger* ATCC 16404'a karşı etkisinin düşük olduğu tespit edilmiştir. Türün doymamış yağ asitleri (oleik asit ve palmitoleik asit) ve uçucu bileşikleri antimikrobiyal etkinliğini artırdığı öne sürülmüştür (Plaza ve diğ, 2010).

Mikroalg *Tetraselmis suecica*'den elde edilen antimikrobiyal peptitler (AMP), gram negatif ve gram pozitif patojenik bakteriler üzerinde test edilmiştir. Tanımlanmış 24 peptit içerisinde 3 tanesi önemli seviyede antibakteriyel aktivite göstermiştir. En etkili olan peptit AQ-1766'dır (Guzmán ve diğ, 2019).

Mikroalg *Dunaliella salina*'nın farklı polaritelerde çözücüler ile basınçlı sıvı ekstraksiyon ile elde edilen ekstraktlarının antibakteriyel aktiviteleri test edilmiştir. En yüksek verim kloroform ile ( $170 \text{ mg g}^{-1}$ ) ile yapılan ekstraksiyonda elde edilmiştir. Ardından etanol ( $88 \text{ mg g}^{-1}$ ) ve hekzan ( $61 \text{ mg g}^{-1}$ ) çözücülerini gelmektedir. Hekzan ekstraktları test edilen tüm bakterilere (*Bacillus subtilis*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* ve *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) karşı antibakteriyel etki göstermiştir. Disk difüzyon testinde *B. subtilis*'e karşı 20 mm çapında inhibitör etki göstermiştir. Bu durum daha yüksek miktarda  $\beta$ -karoten içeriğine sahip olmasına bağlanmıştır. İn vivo çalışmalarda genç domates, domates ve kabak bitkileri kullanılmıştır. *D. salina* ekstraktları, genç domates bitkilerinde, bakteriyel leke hastalığının görülme sıklığı ve şiddetini azaltmıştır. Bu doğrultuda *D. salina* ekstraktlarının potansiyel bir biyopestisit olarak değerlendirilebileceği gösterilmiştir (Ambrico ve diğ, 2020).

*Chlorella* sp. BR2, *Chlorella* sp. FN1, *C.vulgaris*, *D. tertiolecta*, *H. pluvialis*, *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis* sp. BR2, *Scenedesmus* sp. NT8c, *T. astigmatica*, *T. chuii* ve *T. suecica*) ve 2 siyanobakteri (*Limnothrix* sp. ve *Spirulina* sp.) türünün antimikrobiyal bileşik üretme potansiyeli incelenmiştir. Etil asetat, asetonitril, aseton, kloroform, metanol, etanol, diklorometan, dimetil sülfoksit (DMSO), n-hekzan, su, kloroform: metanol (2:1) ve su: metanol (1:3) çözücülerini ile ekstraktlar hazırlanarak, antimikrobiyal etkinlikleri test edilmiştir. Antimikrobiyal

aktiviteyi doğrulamak için disk difüzyonu ve kuyu difüzyon analizleri yapılmıştır. Ekstraktların gücünü ölçmek için ise minimum inhibisyon konsantrasyonları (MIK) ölçülmüştür. *Chlorella* sp. FN1, *Isochrysis galbana* ve *Scenedesmus* sp. NT8c gram pozitif bakterilere karşı inhibitör aktivite göstermiş ve ekstraktlarda tanımlanan bileşikler linoleik asit, oleik asit, dokosaheksaenoik asit (DHA) ve eikosapentaenoik asittir (EPA) (Alsenani ve diğ, 2020).

Farklı su ortamlarından izole edilen 28 siyanobakterinin biyostimülan etkileri ile ilişkili maddeler Toribio ve diğ. (2020) tarafından incelenmiştir. Salisilik asit, sitokininler, sideroforlar ve fosfat çözünürlükleri analiz edilmiştir. *Calothrix* SAB-B797, *Nostoc* SAB-B1300 ve *Nostoc* SAB-M612 suşları için salisilik asit üretimi, *Nostoc* SAB-M251 ve *Trichormus* SAB-M304 sitokinin üretimi açısından öne çıkan suşlar olmuştur. Salatalık fidelerinde, *Nostoc* SAB-M612 kök ve toprak üstü büyümesini teşvik etmiştir.

*Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*'in domateste oluşturduğu bakteriyel kanserin kontrol edilmesinde *Leptolyngbya* sp. (1 suş), *Nostoc* sp. (2 suş), *Chlorella* sp. (4 suş) ve *Scenedesmus* sp. (1 suş) türlerinden ekstraktlar kullanılmıştır. Örnekler (100 mg) liyofilize edilerek su ile sonikasyon kullanılarak ekstrakt edilmiş, seyreltilerek kuyucuk difüzyon metodu kullanılmıştır. İn vitro büyümesini inhibe etme kapasitesi ile sitokinin ve salisilik asit üretme kapasiteleri test edilmiştir. *Scenedesmus-677* kök uygulamasında hastalık kontrolünde etkili olurken, *Leptolyngbya-1267* salisilik asit yoluyla bitki savunma mekanizmalarını güçlendirmiştir (Toribio ve diğ, 2021).

Mikroalg ve siyanobakterilerden (*Dunaliella salina* MS002, *Phaeodactylum tricornutum* MS023, *Porphyridium* sp. MS081, *Desmodesmus* sp., *Dunaliella salina* MS067 ve *Arthrospira platensis* MS001) elde edilen polisakkaritler, domates bitkisi üzerinde test edilmiştir. Biyokimyasal ve metabolomik etkiler belirlenmiştir. *Porphyridium* sp., *Dunaliella salina* ve *Arthrospira platensis* türlerinden izole edilen polisakkaritler, domates yapraklarına verilmiş ve bitkilerin biyotik strese karşı savunma tepkilerinde önemli göreve sahip fenilalanin amonyak liyaz (PAL), kitinaz ve peroksidaz (POX) gibi enzimlerin aktivitelerinin arttığı gözlenmiştir. PAL aktivitesinde en yüksek artış *P.tricornutum*'da (%238,26) görülmüştür. Kitinaz aktivitesi *Desmodesmus* sp. polisakkaritleri ile %19,95 artış, POX aktivitesi *Porphyridium* sp. ile %47,28 artış sağlamıştır. *Porphyridium* sp. polisakkaritleri

karotenoid içeriğini %400 ve NAD-GDH (NAD-Glutamat Dehidrogenaz) aktivitesini %200, *A. platensis* klorofil-a, klorofil-b ve NR (Nitrat Redüktaz) aktivitesini artırmıştır. *D. salina* ise protein içeriğini %88,3 artırmıştır. GC-MS analizi ile domates yapraklarına uygulanan polisakkaritlerin yaprak metabolit profilini değiştirdiği belirlenmiştir. Yağ asitleri oksipilin biyosentezini, C18 ve azelaik asit ise salisilik asit aracılı SAR (sistemik edinilmiş direnç) ilişkili metabolitlerin birikimini teşvik ettiği belirlenmiştir. Ayrıca lipit, sterol ve alkan profillerinde değişiklikler gözlenmiş, özellikle sterol biyosentezine işaret eden bazı öncü moleküllerde artış görülmüştür. Mikroalg polisakkaritleri sürdürülebilir tarım uygulamaları için yenilikçi çözümler sunabilir (Rachidi ve diğ, 2020, 2021).

*Tetrademus obliquus*, *Chlorella protothecoides*, *Chlorella vulgaris* gibi mikroalg ve *Synechocystis* sp. siyanobakteri türleri domuz çiftliklerinde atık su arıtımında kullanılarak elde edilen biyokütle bitki çimlenme ve büyümesinde kullanılmıştır. Ve çimlenme ve büyüme oranlarını artırmıştır. Özellikle salatalık tohumları üzerinde yapılan deneylerde, kök ve sürgün gelişiminde önemli artışlar elde edilmesini sağlamıştır. Kullanılan mikroalg biyokütlesinin mantar patojeni *Fusarium oxysporum*'a karşı biyopestisit olarak etkili olduğu bulunmuş; en yüksek inhibitör etki de *T. obliquus* ve *C. vulgaris* türlerinde gözlemlenmiştir (Ferreira ve diğ, 2021).

*Chlorella vulgaris* MACC-1 suşu, atık su ve BG-11 ortamında yetiştirilerek büyüme, antimikrobiyal aktivite, biyostimülan ve biyopestisit özellikleri kıyaslanmıştır. Atık suda yetiştirilen örneklerde iyi büyüme gözlemlenerek biyokütle üretim oranları artarken, biyostimülan etkiler (oksin ve sitokin benzeri aktiviteler) sınırlanmıştır. Bu durum bazı inhibitörlerin varlığına bağlanmıştır. Ancak antimikrobiyal aktivite artmıştır. Bu durumda atık su içerisinde bulunan mikroorganizmaların, antimikrobiyal bileşiklerin üretimini teşvik etmiş olabileceğine bağlanmıştır. Ve atık suda yetiştirilen *C. vulgaris*'in antifungal aktivitesinin, antibakteriyel aktiviteden yaklaşık iki kat daha yüksek olduğu bulunmuştur (Ranglová ve diğ, 2021).

*Nannochloropsis* sp.'den elde edilen lipitlerden oluşan nanovektörler üretilmiş ve timol ile yüklenmiştir. Üretilen nanovektörlerin, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* bitki patojenine karşı antibakteriyel etkinliği test edilmiştir. İn vitro testlerde 250 ppm konsantrasyonda biyosidal etki belirgin şekilde tespit edilmiştir. Bu çalışma ile mikroalg içerikli nanoformülasyonların, sürdürülebilir tarım sistemlerinde kullanım potansiyelleri desteklenmektedir (Menicucci ve diğ, 2021).

On beş farklı mikroalg türünün (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella* sp., *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana*, *Coelastrum* sp., *Haematococcus lacustris*, *Tetradismus obliquus*, *Selenastrum* sp., *Klebsormidium flaccidum*, *Tribonema* sp., *Scenedesmus* sp., *Monoraphidium contortum*, *Haematococcus lacustris*, *Porphyridium purpureum*, *Tetraselmis subcordiformis*), yedi tarım patojenine (*Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum*, *Verticillium albo-atrum*, *Phytophthora cactorum*, *Pythium ultimum*) karşı antimikrobiyal aktiviteleri test edilmiş, beş mikroalg (*Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana*, *Tetraselmis subcordiformis*, *Coelastrum* sp. ve *Haematococcus lacustris*) yedi bitki patojenine karşı antimikrobiyal etki göstermiştir. En iyi sonuç olarak *C. sorokiniana* özütünün *P. cactorum*'un büyümesini inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Ayrıca ekstraksiyon metodu optimize edilerek kısa süreli dondurup-çözme döngüsü uygulanmış, bakteriyel kontaminasyonun engellenmesi için ekstraktlara ve negatif kontrole kloramfenikol eklemesi yapılmıştır. Yayma yöntemi ile petrilere antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. En iyi *C. sorokiniana* ekstraktı, *P. cactorum* zararlısı ile enfekte olmuş çilek yapraklarına uygulanmış ve biyopestisit uygulaması için potansiyel oluşturduğu gözlemlenmiştir (Jokel ve diğ., 2023).

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1 Mikroalg Suşları ve Kültür Ortamları

Bu tez çalışmasında Bursa Teknik Üniversitesinde Alg ve Siyanobakteri Kültür Koleksiyonunda yer alan ve yeni izolasyonları yapılan, toplam 32 mikroalg suşu kullanılmıştır. Mikroalg izolasyonları farklı bölgelerden (tatlısu, deniz ve yüksek tuzlu ortamlardan) alınan örneklerden seri dilüsyonlar ve tek hücre/filament izolasyonları ile 96 kuyucuklu plakalar kullanılarak yapılmıştır (Şekil 2.1). Tek hücre izolasyonu yöntemi ile *Scenedesmus* sp. AQUAMEB-57 (Akvaryum), *Spirulina* sp. AQUAMEB-56 türleri izole edilmiştir. İzole edilen bazı türlerin mikroskop resimleri ise Şekil 2.2 de verilmiştir. Tek hücre izolasyonu, temiz bir lam üzerine izolasyonu yapılacak örnekten alındı. Örneğin bulunduğu ortamın tuzluluk, pH gibi parametreler kontrol edilerek uygun bir büyüme ortamı seçildi. Lam üzerinde örneğin ortam ile seyreltmeleri yapıldı. Pipet eğik bir açı ile tutularak mikroskopta 10X büyütmede hücrelerin çekimi yapıldı. Steril plaka içerisine ortam konularak çekilen örnek plaka üzerindeki kuyuya aktarılır. Uygun büyüme koşulları (sıcaklık, ışık vb.) sağlanarak büyüyüp, çoğalması sağlandı (Andersen, 2005).

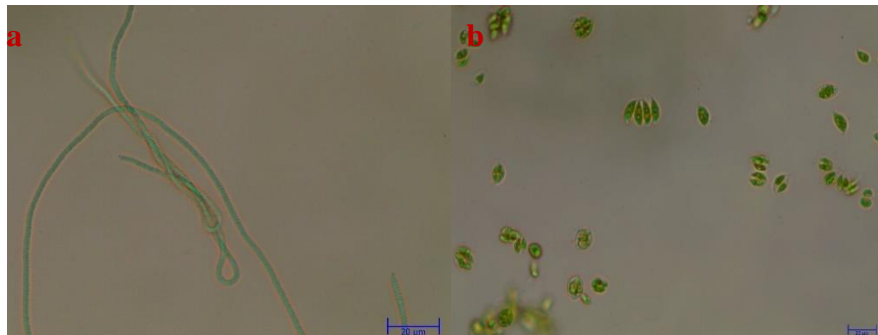


Şekil 0.1 : Tek hücre izolasyonlarında kullanılan 96 kuyucuklu plateler.

Daha önceden izole edilerek Bursa Teknik Üniversitesi AQUAMEB Kültür Koleksiyonunda bulunan (<https://www.aquameb.org/shop>) türler de çalışmaya dahil edilmiştir. Türlerin listesi ve büyüdüğü ortamlar Çizelge 2.1’de verilmiştir.

**Çizelge 0.1** : Seçilen türler ve büyüdüğü ortamlar.

Tür Adı	Büyüdüğü Ortam
<i>Calothrix</i> sp. P13E3	BG11-N
<i>Calothrix</i> sp. P17A4	BG11-N
<i>Cylindrospermopsis</i> sp. P17C5	BG11-N
<i>Cylindrospermopsis</i> sp. P12C6	BG11-N
<i>Nostoc</i> sp. AQUAMEB-60 P13A6	BG11-N
<i>Cylindrospermopsis</i> sp. P12C5	BG11-N
<i>Calothrix</i> sp. P12E7	BG11-N
İzolasyon 1 <i>Merismopedia</i> sp.	BG11+N
<i>Spirulina</i> sp. AQUAMEB-56	Spirulina
<i>Chlorophyta</i> AQUAMEB-59 (Yonca)	BG11+N
<i>Scenedesmus</i> sp. AQUAMEB-57 (Akvaryum)	BG11+N
<i>Kirchneriella</i> sp. AQUAMEB-55	BG11+N
Mete Kültür # 10	BG11+N
Mete Kültür #20	BG11+N
<i>Aliinostoc</i> sp. AQUAMEB-58	BG11-N
<i>Eualothece/Halothece</i> sp. AQUAMEB-3	60 ppt PES
<i>Dunaliella</i> sp. AQUAMEB-4	60 ppt J1
<i>Dunaliella</i> sp. AQUAMEB-5(1)	165 ppt J1
<i>Dunaliella</i> sp. AQUAMEB-8	175 ppt J1
<i>Dunaliella</i> sp. AQUAMEB-15	75 ppt J1
<i>Tetraselmis</i> sp. AQUAMEB-17	75 ppt J1
<i>Phormidium</i> sp. AQUAMEB-19	75 ppt J1
<i>Dunaliella</i> sp. AQUAMEB-21	120 ppt J1
<i>Aphanizomenon (Cuspidothrix)</i> AQUAMEB-26	BG11-N
<i>Limnothrix</i> sp. AQUAMEB-27	BG11+N
<i>Calothrix</i> sp. AQUAMEB-29	BG11-N
<i>Sphaerospermopsis</i> sp. AQUAMEB-30	BG11+N
<i>Calothrix</i> sp. AQUAMEB-31	BG11+N
<i>Synechococcaceae</i> sp. AQUAMEB-32	BG11+N
<i>Ankistrodesmus</i> sp. AQUAMEB-33	BG11+N
<i>Pseudoanabaena</i> sp. AQUAMEB-36	BG11+N
<i>Chlamydomonas</i> CC124 mt	TAP



**Şekil 0.2** : İzole edilen türlerin mikroskop görüntüleri.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> a) AQUAMEB-56 *Spirulina* sp, b) AQUAMEB-57 *Scenedesmus* sp. (Akvaryum).

**Çizelge 0.2 : BG11+N Ortamı.**

Stok	gr/100ml H <sub>2</sub> O
Stok 1 NaNO <sub>3</sub>	15gr
Stok 2 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4 gr
Stok 3 MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,75 gr
Stok 4 CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,36 gr
Citric Acid. H <sub>2</sub> O	0,06 gr
Ferric Amonium Citrate	0,06 gr
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	0,01 gr
Stok 5 Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,02 gr
Stok 6 Trace Metal Mix	gr/500 ml dH <sub>2</sub> O
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,43 mg
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,905 gr
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,11 gr
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,195 gr
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0395 gr
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,02 gr

Stok 1, 2, 3, 4 ve 5'den 10 ml, Stok 6'dan 1 ml kullanılarak hazırlanmıştır. Stoklar distile su ile hazırlanarak 121°C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. 900 ml saf su içerisine Stok 1, 2, 3, 5 ve 6 eklenerek pH 7,5'e ayarlanmıştır. Hacim 990 ml'e tamamlanarak tekrar otoklavlanmıştır; soğuduktan sonra Stok 4 biyogüvenlik kabininde eklenmiştir. BG11-N ortamı içerisine ise Stok1 eklenmemiştir.

**Çizelge 0.3 : TAP (Tris-Acetate-Phosphate) Ortamı.**

Stok	g/L
Fosfat Solüsyonu	gr /100 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	28,8 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14,4 gr
TAP-salts	gr /100 ml
NH <sub>4</sub> Cl	1,5 gr
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,4 gr
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,2 gr
Eser Element Solüsyonu	gr /100 ml
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	5 gr
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,2 gr
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.14 gr
MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	0,5 gr
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 gr
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,16 gr
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,16 gr
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MoO <sub>3</sub>	0,11gr

Öncelikli olarak Eser element solüsyonu hazırlanmıştır. Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O 60-80 °C'de ısıtılarak çözdürülmüş, %20'lik KOH ile pH 6,8'e ayarlanarak diğer kimyasallar eklenmiştir. Manyetik karıştırıcıda 1 hafta boyunca karıştırılarak

tamamen çözdürülmüştür. Filtre edilerek -20 °C’de saklanmıştır. 850 ml ddH<sub>2</sub>O’da 2,42 gr Tris base (H<sub>2</sub>NC(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>) çözdürülmüş, ardından 25 ml TAP salts, 1ml Fosfat solüsyonu, 1ml Eser element solüsyonu, 1ml Asetik asit eklenmiş ve 1L’e tamamlanarak 121°C’de 20 dakika otoklavlanmıştır.

**Çizelge 0.4 : Modifiye Johnsons J/1 Ortamı (Borowitzka, 1988).**

Stok	g/L
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,5 gr
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 gr
KCl	0,2 gr
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,2 gr
KNO <sub>3</sub>	1 gr
NaHCO <sub>3</sub>	0,043 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,035 gr
Fe Solüsyonu	10 ml
Trace Element Solüsyonu	10 ml
Fe Solüsyonu	g/L
Na <sub>2</sub> EDTA	189 mg
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	244 mg
dH <sub>2</sub> O	1000 ml
Eser Element Solüsyonu	g/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61 mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	38 mg
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	6 mg
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	5,1 mg
ZnCl <sub>2</sub>	4,1 mg
MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	4,1 mg
dH <sub>2</sub> O	1000 ml
	/1000 ml
NaCl (4 M) (Stok)	236,48 gr

Fe solüsyonu ve Eser element solüsyonları, diğer besin elementleri ve NaCl stoğu ayrı ayrı hazırlanarak 121°C’de 15 dakika otoklavlanmıştır. pH değeri 7,5’e ayarlanmıştır. Otoklav sonrası tüm stokların birleştirme işlemi kabinde gerçekleştirilmiştir. Kullanılacak olan tuzluluk değerine göre NaCl stoğu belirlenerek ortam içerisine ekleme yapılmıştır.

**Çizelge 0.5 : Plymouth Erdschreiber Ortamı (PES), (J.S. Erdschreiber, 1970).**

Stok	g/L
	gr/50 ml dH <sub>2</sub> O
Stok 1 NaNO <sub>3</sub>	10 gr
Stok 2 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,497 gr
Stok 3 NaCl	
Stok 4 Toprak Ekstraktı	
Stok 5 Filtre Deniz suyu	

Stoklar ayrı ayrı hazırlanarak 121°C’de 15 dakika otoklavlanmıştır. Stok 4, toprak ekstraktı 2:1 saf su:toprak olarak hazırlanmış; otoklav sonrası kaba membran filtre ve 0,22 µm selüloz ince filtrelerden süzülmüştür. Litre başına 50 ml kullanılır. Deniz suyu alındıktan hemen sonra kaba membran filtre ve 0,22 µm selüloz ince filtrelerden süzülmüştür. Deniz suyunun tuzluluğuna göre miktar hesaplamaları yapılarak, deniz suyu ve NaCl stoğundan kullanılacak miktar belirlenmiştir (Dökümcüoğlu, 2018).

**Çizelge 0.6 : *Spirulina* Ortamı.**

Stok	g/L
Solüsyon 1	gr/500 ml dH <sub>2</sub> O
NaHCO <sub>3</sub>	13,61 gr
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	4,03 gr
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,50 gr
Solüsyon 2	gr/500 ml dH <sub>2</sub> O
NaNO <sub>3</sub>	2,5 gr
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 gr
NaCl	1 gr
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 gr
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,04 gr
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01 gr
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	0,08 gr
Eser metal solüsyonu	5ml
Vitamin solüsyonu	1 ml
Eser Metal Solüsyonu	gr/1000 ml dH <sub>2</sub> O
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	0,5 gr
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,7 gr
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1 gr
MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2 gr
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10 gr
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1 gr
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1 gr
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,005 gr
Vitamin Solüsyonu	/1000 ml dH <sub>2</sub> O
Siyanokobalamin (vit. B12)	5mg

Solüsyon 1 ve 2 hazırlanarak 121°C’de 15 dakika otoklavlanmıştır. Soğuduktan sonra steril kabinde birleştirilerek 1ml vitamin solüsyonundan eklenmiştir.

Kültürlerin ilk olarak 1 L hacimde küçük ölçekte büyümeleri gerçekleştirilmiştir. Küçük ölçekte büyütülen türlerin erlen içerisindeki görünümleri Şekil 2.3’de verilmiştir. Küçük ölçekte büyütülen kültürler öncelikli olarak 4500 rpm’de 15 dakika santrifüjlenerek üzerindeki ortam uzaklaştırılarak hasat edilmiştir. Peletler -20/-80 °C’de dondurulmuş, ardından liyofilizasyon ile kurumaları sağlanmıştır. Bu

işlemler öncesi OD ölçümleri yapılarak büyüme grafikleri elde edilmeye çalışılmış fakat suşlar çok farklı özellikler göstermesi (topaklaşma, yapışma, farklı pigment üretimleri) nedeniyle grafiklerde optimizasyon sağlanamamıştır.

Normalde kültür büyüme evreleri takip edilerek, ikincil metabolit üretimini etkileyebildiği bilinen logaritmik ve durgun fazlarda kültürün hasadının gerçekleştirilmesi amaçlanmakta iken grafiklerin elde edilememesi nedeniyle kültür yoğunluk, renk durumuna bakılarak hasatlama işlemi gerçekleştirilmiştir (Stolte ve diğ., 2002). Kültürlerden elde edilen biyokütleler hassas terazi ile tartılarak miktarları not edilmiştir.

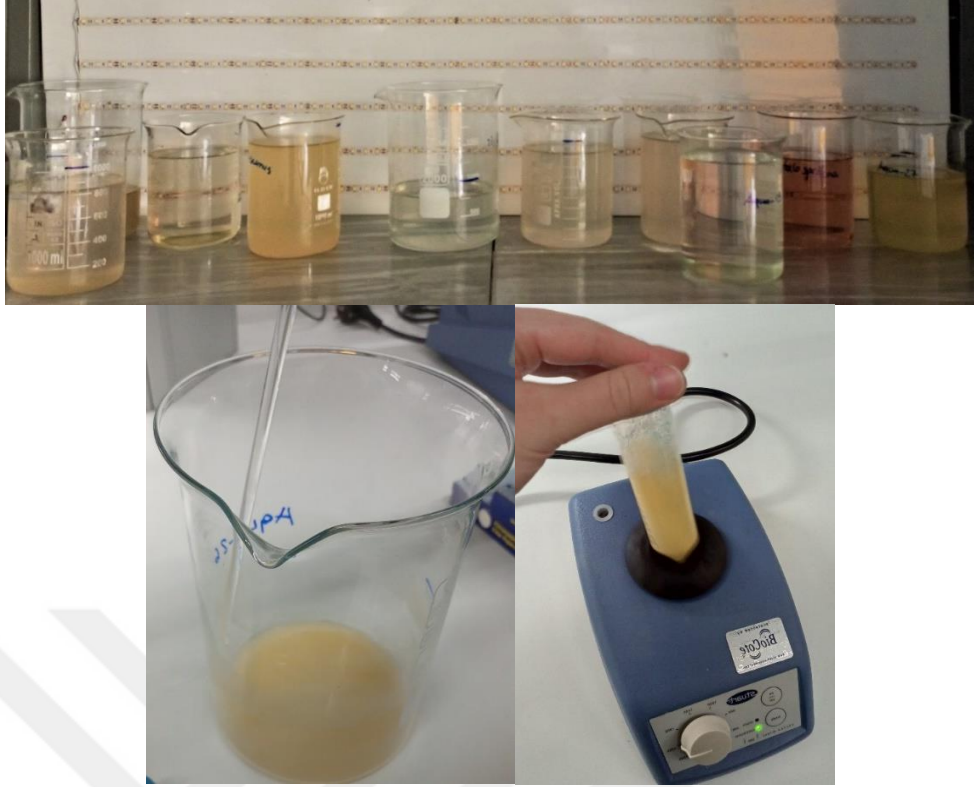
Hücre dışı sıvılar da deneylerde kullanılmıştır bu nedenle süpernatanttan 50 ml alınarak -20 °C'de saklanmıştır . Kalan süpernatantlar beherlere alınarak 40 °C etüvde bekletilmiştir (Bu işlem daha az solvent kullanımı için yapılmıştır). Bir kısmı uçurulup yoğunlaştırıldıktan sonra üzerine 1:1 oranında soğuk etil alkol eklenerek kısa bir süre vortekslenmiştir. Bir gece +4 °C'de bekletilmiş ve ertesi gün 4500 rpm de 10 dk santrifüj edilerek ekzopolisakkarit (EPS) eldesi gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.4). Pelet kısmı liyofilizasyon ile kurutularak miktarları not edilmiştir. Liyofilizasyon işlemi TÜBİTAK-BUTAL bünyesinde gerçekleştirilmiştir.

Tuz miktarı fazla olan örnekler (AQUAMEB-3 ve AQUAMEB-19) EPS eldesinden hemen sonra (liyofilize edilmeden) diyaliz işlemi yapılarak fazla olan tuz uzaklaştırılmıştır. EPS, 2 hacim %95 soğuk etanol eklenerek çöktürülmüştür. EPS'nin toplu yapısı metal bir filtre kullanılarak toplanmış ve ardından 14 kDa moleküler ağırlık kesme değerine sahip bir diyaliz membrana aktarılmıştır (Sigma Aldrich, ABD). Diyalizde, sürekli karıştırma ile 0.5 M EDTA'nın (24 saat) ardından distile suyun (24 saat) en az 10 kat hacmi kullanılmıştır. Diyalizden sonra örnek dondurularak kurutulmuştur (Tiwari,2020). İşlemlere ait birkaç basamak Şekil 2.5'de verilmiştir.



Şekil 0.3 : Türler ve büyüdüğü ortamlar .<sup>2</sup>

<sup>2</sup> a)BG11+N Ortamı b)BG11-N Ortamı c)BG11+N+Si Ortamı, d)PES Ortamı, e)Spirulina Ortamı tür f) J/1 Ortamı.



**Şekil 0.4** : EPS elde edilme aşamaları, örnek yoğunlaştırma, etanol eklenerek karıştırılması.

Ardından iyi büyüme gösteren suşlar; *Cylindrospermopsis* sp. P12C5, *Cylindrospermopsis* sp. P12C6 , *Calothrix* sp. P12E7, *Nostoc* sp. AQUAMEB-60 P13A6, *Calothrix* sp. P13E3, *Calothrix* sp. P17A4, *Cylindrospermopsis* sp. P17C5, *Aliinostoc* sp. AQUAMEB-58, *Kirchneriella* sp. AQUAMEB-55, *Euhalothece/Halothece* sp. AQUAMEB-3, *Limnothrix* sp. AQUAMEB-27, *Calothrix* sp. AQUAMEB-29, *Sphaerospermopsis* sp. AQUAMEB-30, *Synechococcaceae* sp. AQUAMEB-32, *Ankistrodesmus* sp. AQUAMEB-33., *Pseudoanabaena* sp. AQUAMEB-36, *Chlorophyta* AQUAMEB-59 (Yonca), *Scenedesmus* sp. AQUAMEB-57 (Akvaryum), *Spirulina* sp. AQUAMEB-56 , *Chlamydomonas* CC124 mt 5 L'lik erlenlere alınmış ve bazı kültürlerle hava verilerek, oda sıcaklığında,  $120 \mu\text{mol. foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ışık verilerek büyütülmüştür (Şekil 2.6).

Büyük hacimde büyütülen kültürler (5L'lik şişelerde) santrifüj ve filtrasyon sistemi yardımıyla hasat edilmiştir. Santrifüj ile hasat için 4500 rpm'de genel olarak 15 dk, çökme olmayan kültürlerde ise süre uzatılarak biyokütle ile ortamın ayrılması sağlanmıştır. Filtrasyon sistemi ile hasat işleminde farklı boyutlarda 2  $\mu\text{m}$ , 8-10  $\mu\text{m}$  ve 20  $\mu\text{m}$  membran filtre kullanılmıştır. Şekil 2.7'de ise vakum sistemi ile hasatlama ve santrifüj sonrası kalan peletler gösterilmiştir. Falkonlarda biriktirilen kültürlerin

peletleri 2-3 gün boyunca liyofilizatör ile kurutulmuştur. Elde edilen biyoküteller hassas terazi ile tartımları yapılarak değerler not edilmiştir.



Şekil 0.5 : Diyaliz yöntemi ile tuzların uzaklaştırılması.



Şekil 0.6 : Büyük hacimde büyütülen kültürlerin şişelerdeki görüntüsü.



**Şekil 0.7 :** Hasatta kullanılan filtrasyon sistemi ve santrifüj sonunda elde edilen peletler.

## 2.2 Solventlerin Mikroorganizmalar Üzerindeki Toksik Etkisinin Belirlenmesi

Ekstraksiyon için kullanılan solventlerin (aseton, hekzan, metanol, etanol, DMSO) bakteri ve mantarlar üzerinde toksik etkilerinin olup olmadığını gözlemlemek amacıyla solventlerden su ile seyreltmeler yapılarak (%100, %50, %25, %12.5) agar kuyucuk yöntemi ile kuyucuklara 60 µl konularak, bakteriler için 37 °C’de 18-20 saat, mantarlar için 30 °C’de 3-4 gün inkübe edilmiş ve petrilerde zon oluşumları gözlemlenerek not edilmiştir.

## 2.3 Mikroalg Ekstraksiyon Yöntemleri

Kurutulmuş mikroalg kültürleri toz homojen hale getirilerek (freze dryer sonrası) farklı polaritelerdeki çözücüler ve çözücülerin belirli oranlarda karışımı (su, metanol, etanol, hekzan, dmsu ve metanol:su (7:3) vb.) ile ekstrakte edilmiştir. Farklı ekstraksiyon yöntemleri; soxhlet, sonikasyon, ultrasonik banyo, prob sonikasyon ve cam boncuk kullanılmıştır.

### 2.3.1 Soxhlet aparatı ile ekstraksiyon

Kurutulmuş mikroalg kültürleri 60 mg tartılarak soxhlet kartuşu içerisine koyulmuş, balon içerisine ise 150 ml MetOH konularak, balon cepli ısıtıcıya yerleştirilmiş ve ısıtıcı düşük ayarda açılarak ekstraksiyon işlemi başlatılmıştır. Ekstraksiyon işlemi 4-5 sifonlama ve yaklaşık dört saat sonunda tamamlanmıştır. Bu işleme solvent rengi

ekstraktörde belirgin olarak (berrak renkte) görülene kadar devam edilmiştir. Şekil 2.8'de soxhlet düzeneği ile ekstraksiyon ve rotary-evaporatör ile çözücünün uçurulması gösterilmiştir.

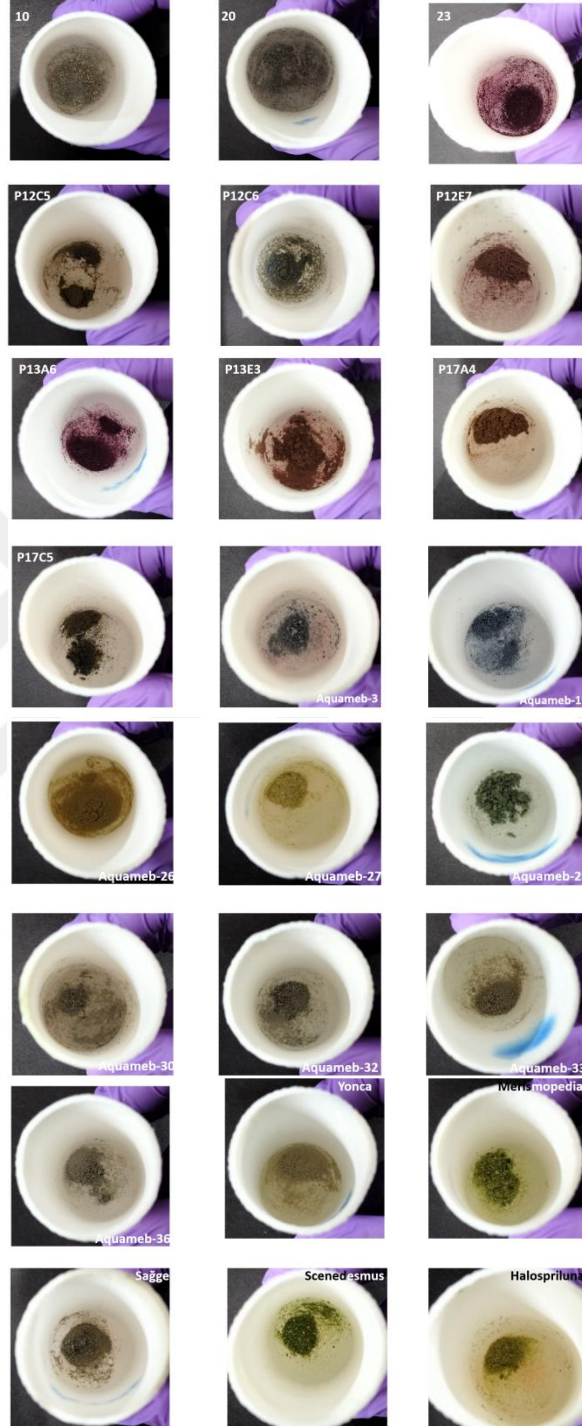


**Şekil 0.8 :** Soxhlet düzeneği ve rotary-evaporatör.

Soxhlet düzeneğinden alınan ekstrakt termometre ile ölçülmüş ve 60 °C olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle rotary-evaporatörde çözücü (methanol) ekstraktan, 60 °C, 337 mbar vakum koşullarında uzaklaştırılmıştır. Balonun boş olarak tartımı ile balonda çözücünün uzaklaştırılarak ekstraktın kaldığı halinin tartımı yapılmış, aradaki fark hesaplanarak ekstrakt miktarı belirlenmiştir. Kartuş içerisinde kalan kütle Şekil 2.9'da gösterilmiştir. Bazı suşlarda ekstraksiyon sonrası renk değişimleri gözlemlenmiştir.

Biyorafineri yaklaşımı ile değerlendirilme potansiyeli olması nedeniyle başka deneylerde kullanımı için soxhlet sonrası kalan biyokütle ependorflara alınarak -20 °C'de muhafaza edilmek üzere kaldırılmıştır.

Ekstraktlar, 1 ml EtOH içerisinde çözdürülerek ışıktan etkilenmemesi için amber viallere konulmuştur. Testlerin yapılacağı zamana kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 0.9 : Soxhlet işlemi sonrası kartuş içerisinde kalan biyokütle.

### 2.3.2 Prob sonikatör ile ekstraksiyon

Kurutulmuş mikroalg kültürlerinden 10'ar mg tartılarak ependorflara koyulmuş ve üzerine 1 ml otoklavlanmış saf su eklenmiştir. Sonikasyon ile 20/10 (20 saniye ultrasonik dalga, 10 saniye pause), amplitüben %20, sıcaklık kullanılmayarak 1 dk boyunca işleme tabi tutularak ekstrakte edilmiştir. Sonikasyon işleminin düzeneği Şekil 2.10'da gösterilmiştir. Bazı örneklerde suda çözünen pigmentler açığa çıkmış ve bunların da hangi pigmentler olduğunun anlaşılabilmesi adına Epoch BioTek ile spektral scanning ile her ekstraktın grafiği elde edilmiştir.

Su içerisinde homojen bir çözünme göstermeyen EPS örnekleri (%1'lik) de 10 mg EPS, 1ml otoklavlanmış saf su içerisinde aynı koşullarda sonikasyon ile homojen hale getirilmiştir.



Şekil 0.10 : Sonikasyon işlemi ile ekstraktların hazırlanması ve EPS'lerin homojen hale getirilmesi.

### 2.3.3 Cam boncuk ile ekstraksiyon

Ekstraksiyon solventleri olarak hekzan, aseton, metanol, etanol ve su kullanılmıştır. Kuru örneklerden 15'lik falkon tüplere 20 mg alınarak üzerlerine solventlerden 1 ml eklenerek vorteks ardından buzda bekletme (soğuk inkübasyonu) ve santrifüj işlemleri yapılarak süpernatant başka bir tüpe alınmıştır. Bu işlemlere pelet renksizleşene kadar devam edilmiştir. İşlemler kaç döngü yapıldıysa not alınmıştır. Toplanan süpernatanttan solventler, rotary-evaporatörde çözücülerin sıcaklık ve vakum değerlerine uygun olacak şekilde ekstraktan uzaklaştırılmıştır. Şekil 2.11'de

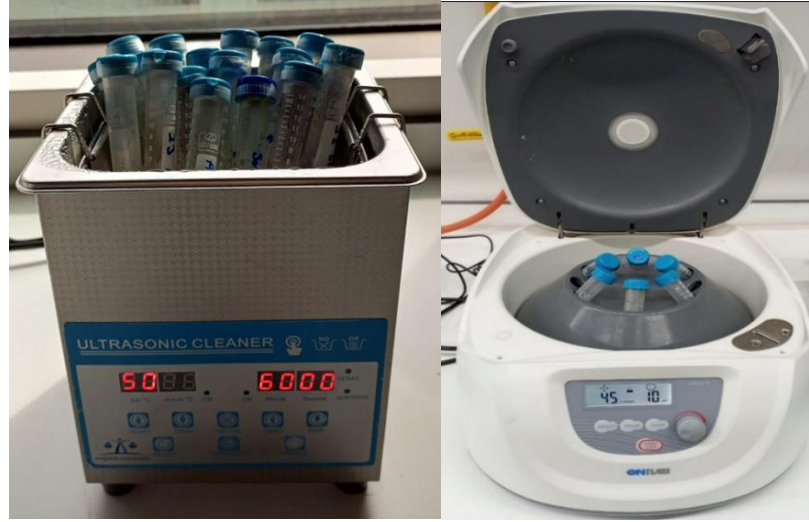
cam boncuk, ekstrakte edilen örneklerin görüntüsü ve rotary-evaporatör sonrası uçurularak, tartımları alınan balon içerisinde örnekler gösterilmiştir. Ekstraktlar 1 ml 7:3 metanol:su karışımı ile çözdürülerek testlerde kullanılmak üzere -20 °C’de muhafaza edilmiştir.



Şekil 0.11 : Cam boncuklar ile ekstraksiyon.

#### 2.3.4 Ultrasonik banyo ile ekstraksiyon

Örnekler 15 ml’lik falkonlara 60 mg biyoküle, 600 µl 7:3 metanol:su karışımı konularak hazırlanmış ve vorteks yardımıyla iyice karışması sağlanmıştır. Her örnekten yüksek miktarda biyokütle eldesi gerçekleştirilemediği için en az biyokütle için belirlenen miktar olarak kabul edilmiş daha fazla elde edilenler için bu değerlerin katları olacak şekilde (örn; 120 mg örnek, 1200 µl 7:3 metanol:su olacak şekilde) ekstraktlar hazırlanmıştır. Ardından 50° C, de 1 saat 120 W, 40 kHz ultrasonik banyoda ekstrakte edilmiştir. Süre sonunda falkonlar yüksek hızda 10 dk santrifüjlenerak üzerinde kalan süpernatant ependorflara alınmıştır. Ardından ependorflarda da tortu kalıntısı önlenmesi amacıyla tekrar 16000 xg 5 dk santrifüjlenerak tortu kısımlar uzaklaştırılmıştır. Ultrasonik banyo koşulları, örneklerin yerleşimi ve işlem sonrası santrifüjleme basamakları Şekil 2.12’de verilmiştir. Elde edilen ekstraktlar testlerde kullanılmak üzere -20 °C’de muhafaza edilmiştir.



**Şekil 0.12 :** Ultrasonik banyo ile ekstraksiyon ve örneklerin santrifüjlenme aşaması.

## 2.4 Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Mikroalg özütlerinin antibakteriyel aktiviteleri farklı bakteriler ve mantarlar kullanarak in vitro olarak incelenmiştir. Antibakteriyel aktivitelerin belirlenmesi için difüzyon (agar disk difüzyon, agar kuyu difüzyon yöntemi), dilüsyon (Broth Mikrodilüsyon metodu) yöntemleri kullanılmıştır. Metodlar Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) tarafından belirlenen esaslara göre gerçekleştirilmiştir (Amsterdam, 1996). Antifungal madde standardı olarak amfoterisin B ve nystatin, antimikrobiyal madde olarak gram negatif bakteriler için ampisilin, gram pozitif bakteriler için ise kanamisin kullanılmıştır. Kullanılan bu standartlar Bioanalyse (Ankara,1983) firmasından hazır olarak tedarik edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite analizinde kullanılan bütün analizler iki bağımsız testte iki kez tekrarlanacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Kullanılan bakteri, mantarların listesi ve suş kodları Çizelge 2.7 ve 2.8’de verilmiştir.

**Çizelge 0.7 :** Testlerde kullanılan bakteri ve kodları.

Tür Adı	Kodu
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Clavibacter michiganensis</i>	
<i>Pseudomonas syringae pv. Tomato</i>	

Bakteriler için besiyeri olarak Nutrient Agar (NA) (Merck, Darmstadt, Almanya) ve Nutrient Broth (NB) (Merck, Darmstadt, Almanya), mantarlar içinse Patates

Dekstroz Agar (PDA) (Merck, Darmstadt, Almanya) ve Patates Dekstroz Broth (PDB) (Sigma- Aldrich, Missouri, ABD) kullanılmıştır. NA, 1L distile su içerisine 20 g tartılarak eklenmiş ve ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda kaynayana kadar karıştırılarak çözünmesi sağlanmıştır. NB, 8g tartılarak 1L su içerisinde çözdürülmüştür. PDA, 1L içerisine 39 g tartılarak aynı şekilde ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda kaynayana kadar karıştırılarak çözünmesi sağlanmıştır. PDB, 24 g tartılarak 1L su içerisinde çözdürülmüştür. Tüm besiyerleri 121 °C’de 15 dk otoklavlanmıştır. Katı besiyerleri 45-50 °C dereceye gelince petri plaklarına dökülmüştür. 85 mm çapındaki plaklara 20 ml besiyeri dökülmüştür. Agar kalınlığı 4mm ± 0.5mm’dir. İşlemler steril kabinde ve alev yanında gerçekleştirilmiştir. Petriler iyice kurutulmuş ve korunaklı (hava almayacak şekilde) bir şekilde torbalara konularak bir gece 37 °C’de inkübe edilmiştir. Kullanılana kadar +4 ile +8 °C dereceleri arasında saklanmış, kullanılacağı zaman ıslaklık ve damlacıkları uzaklaştırmak amacıyla 30 dk etüv ya da 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir.

**Çizelge 0.8 :** Testlerde kullanılan mantar ve kodları.

Tür Adı	Kodu
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 16404
<i>Penicilium</i>	

Bakteriler öncelikli olarak petrilere (katı agar ortamından) eküvyon çubuğu/öze yardımıyla alınarak cam tüplere (sıvı broth ortamına) ekim yapılmıştır. Büyümeleri için 18 ila 24 saat 37 °C’de etüvde inkübe edilmiştir. Büyüyen bakteriler densitometre yardımıyla bulanıklık değerleri ölçülerek deneylerde kullanılmak üzere 0.5 McFarland değerine ayarlanmıştır, 0.5 McFarland’tan yüksek olan değerler sıvı besiyeri (Nutrient Broth) ile seyreltilmiştir. İşlem basamaklarından bazıları Şekil 2.13’de gösterilmiştir.

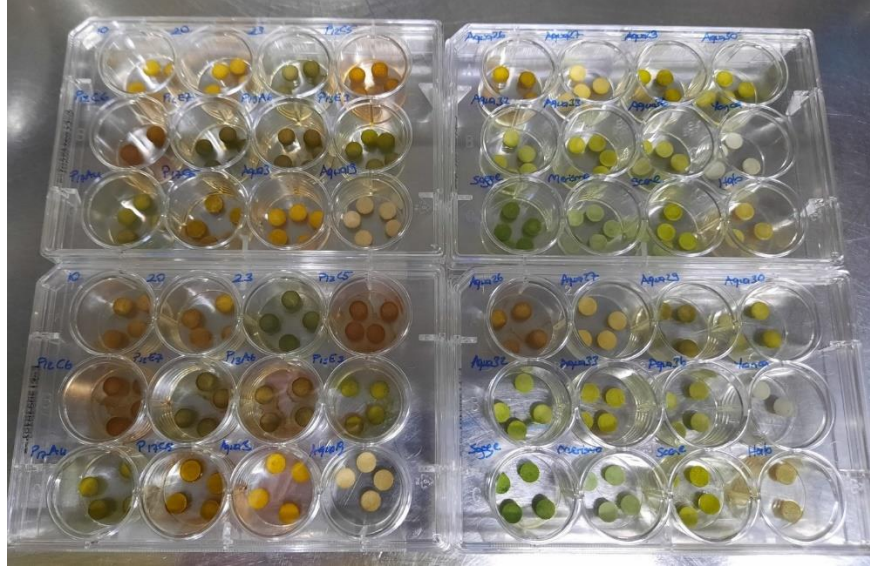


**Şekil 0.13 :** Bakterilerin katı ve sıvı besiyerlerine öze yardımıyla ekimi.

#### **2.4.1 Agar disk difüzyon yöntemi**

Densitometre ile 0.5 McFarland yoğunluğa ayarlanan bakteriler cam tüplerden alınarak yine sıvı besiyeri ile 10 kat seyreltme yapılmıştır. Seyreltilmiş örnekten 100 µl alınarak drigalski yardımıyla petrilere ekim yapılmıştır. Mantarlar 2-3 conidia alınarak ekim yapılmıştır. On iki kuyucuklu plateler içerisinde blank diskler (6mm) konularak, elde edilen ekstraktlardan 20 µl emdirilmiştir (Şekil 2.14). Soxhlet ile yapılan ekstraksiyonda ekstraktlar ethanolde çözdürülmüş ve bu örnekler disklere emdirildikten sonra etil alkolün uçması için 1 saat 60 °C’de inkübe edilmiştir.

Pozitif kontrol (antibiyotik diskler), negatif kontrol (numunenin hazırlandığı çözücü) de disklere emdirilerek petrilere yerleştirilmiştir (Şekil 2.15). Petrilere bakteriler için 37 °C’de 18 ila 24 saat, mantarlar için 30 °C’de 3-4 gün inkübe edilmiştir. Oluşan zon çapları dijital kumpas ile ölçülmüştür.



Şekil 0.14 : Ekstraktların platelerde disklerle emdirilmesi ve etanol uçurulması.

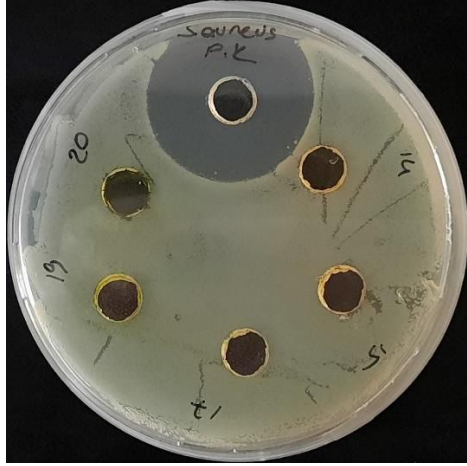


Şekil 0.15 : Diske emdirilmiş ekstrakt örnekleri ve pozitif kontrolün petri üzerinde görünümü.

#### 2.4.2 Agar kuyu difüzyon yöntemi

Densitometre ile 0.5 McFarland yoğunluğa ayarlanan bakteriler cam tüplerden alınarak yine sıvı besiyeri ile 10 kat seyreltme yapılmıştır. Seyreltilmiş örnekten 100 µl alınarak drigalski yardımıyla petrilere ekim yapılmıştır. Mantarlar 2-3 conidia alınarak ekim yapılmıştır. Petrilere 1000 µl'lik pipet ucu kullanılarak kuyular açılmıştır (Şekil 2.16). Kuyucuk çapı 7 mm olarak ölçülmüştür. Denemeler sonucunda kuyulara 80 µl konulması uygun görülmüş (kuyulardan konulan örneklerin taşma yapmaması, birbirine karışmaması için) ve hazırlanan ekstraktlardan, pozitif ve negatif kontrolden 80 µl koyulmuştur. Petrilere bakteriler

için 37 °C’de 18 ila 24 saat, mantarlar için 30 °C’de 3-4 gün inkübe edilmiştir. Oluşan zon çapları dijital kumpas ile ölçülmüştür.



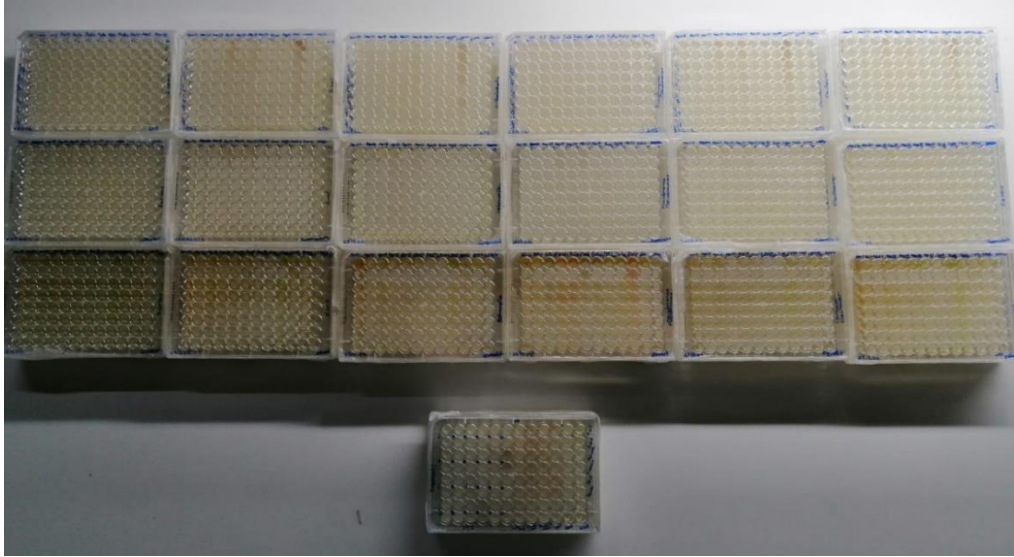
Şekil 0.16 : Kuyu difüzyon yöntemi, pipet ucuyla açılan kuyucuklar.

### 2.4.3 Broth mikrodilüsyon yöntemi

Bu yöntem seri dilüsyon yapılarak 96 kuyucuklu mikropalakalarda gerçekleştirilmektedir. Çok kanallı mikropipet ile antimikrobiyal etkisi incelenecek olan örnek mikropalakalara en yüksek dozdan aza doğru olacak şekilde yerleştirilmiştir (Şekil 2.17). Daha sonra diğer kuyucuklara aynı örneğin iki kat seri dilüsyonları yapılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde, mikropalakadaki büyümeler gözle (klorimetrik olarak) ve mikropalaka okuyucu özelliği olan spektrofotometrede (BioTek cihazı) ölçülmüştür. Pozitif kontrolde üreme olmaması ya da negatif kontrolde üreme olması durumunda deney tekrar edilmiştir.

EPS için -20°C’deki süpernatantlar çözdürülerek (1, 1/2, 1/4, 1/8 oranlarında) otoklavlanmış saf su ile seyreltmeleri yapılmıştır. EPS’ler %1’lik olarak (10mg, 1ml) otoklavlanmış saf su içerisinde tam çözünmenin olabilmesi için sonikasyon işlemi ile çözdürülmüştür. Yine saf su ile 1, 1/2, 1/4, 1/8 oranlarında seyreltmeler yapılmıştır. İşlemler iki tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

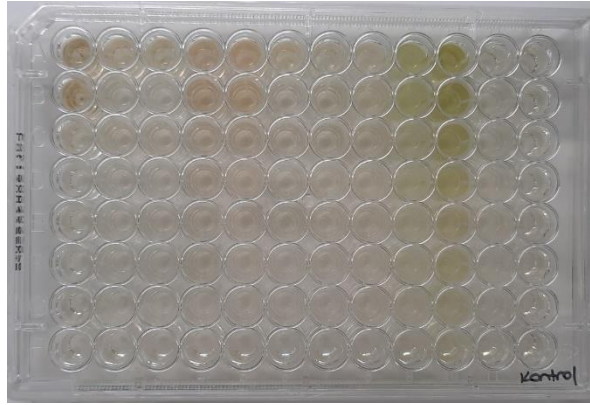
96 kuyucuklu plakalar hazırlanırken her bir kuyucuğa 150 µL Nutrient Broth (NB) eklenmiştir. Daha sonra, örneklerden 20 µL ve bakterilerden 30 µL kuyucuklara ilave edilmiştir. Kontrollerde ise farklı kombinasyonlar kullanılmıştır: 170 µL NB ve 30 µL bakteri; 180 µL NB ile birlikte 20 µL süpernatant, EPS veya ekstrakt (en yoğun halleri); 180 µL NB ve 20 µL saf su; 180 µL NB ve 20 µL etil alkol; ve son olarak 180 µL NB ile 20 µL metanol:su karışımı (7:3) kontrol gruplarını oluşturmuştur.



**Şekil 0.17** : Platelerde (96 kuyucuklu) Broth mikrodilüsyon testi.

#### **2.4.3.1 OD ölçümü ile antibakteriyel MİK tayini**

Etüvde 37°C’de 18 ila 24 saat inkübe edilmiştir ve süre sonunda Biotek mikropilaka okuyucuda 600 nm dalga boyunda her kuyudan 3 okuma alınmıştır. Her okuma öncesi mikropilaka çalkalayıcısında 300 rpm’da plaka içerisindeki örneklerin karışması sağlanmış, çökme nedenli oluşabilecek okuma hataları önlenmeye çalışılmıştır (Şekil 2.18).

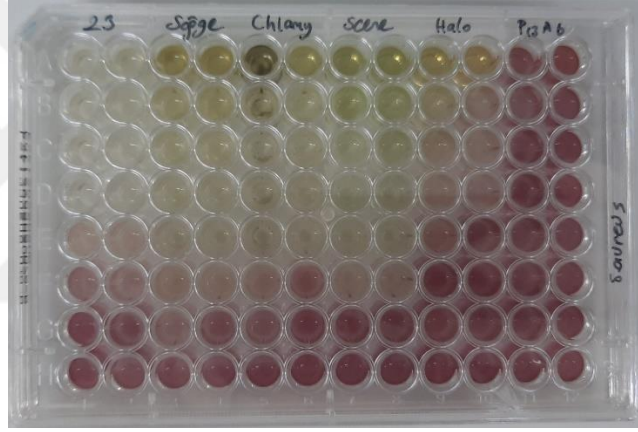


**Şekil 0.18** : Plaka (96 kuyucuklu) MİK testi görünüm örneği.

#### **2.4.3.2 INT kullanılarak antibakteriyel MİK tayini**

Büyüme göstergesi olarak 2-(4-İyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazolyum klorür (INT) uygulandı. Boya 0,2 mg/ml hazırlanarak iyice çözünmesi için birkaç dakika ultrasonik banyo içerisinde 40 °C’de 10 dk inkübe edilmiştir. Çözünen boya açık sarı renktedir (Ejidike, 2018). Plakalar içerisine 40 µl hazırlanan INT eklenmiştir. Çalkalayıcı yardımıyla örnekler ile karışması sağlanmıştır. Etüvde

plakalar 37 °C’de 30 dk inkübe edilmiştir (Štumpf, 2020). Iodonitrotetrazolium, tam adıyla 2-(4-İyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazolyum klorür (Sigma-Aldrich), solunum aktivitesinin varlığında çözünür INT'nin çözünmez mor formazan boyasına indirgenmesini sağlar. Bu reaksiyon sonucunda, mikroorganizma büyümesinin olduğu kuyucuklarda mor renk oluşumu gözlemlenir. İnkübasyon sonunda çalkalayıcı ile karışması sağlandıktan sonra görsel olarak renk değişimi olan kuyular saptanarak MİK değeri belirlenmiştir (Şekil 2.19). Renk değişimi hızlıdır ve INT'den oluşan formazan stabildir, böylece renk solmaz. MBK (Minimum Bakterisidal Konsanrasyon) belirlemek amacıyla renk değişimi olmayan kuyulardan 100 µl alınarak petrilere aktarılmış ve eküvyon çubuğu yardımıyla ekim yapılmıştır. 37 °C’de 1 gün inkübe edilerek büyüme olup olmadığı gözlenmiştir. Koloni oluşumları gözlemlenerek koloni sayımları yapılmıştır.



**Şekil 0.19** : INT ile MIC değerlerinin kolorimetrik olarak belirlenmesi.

### 3. ARAŞTIRMA BULGULARI

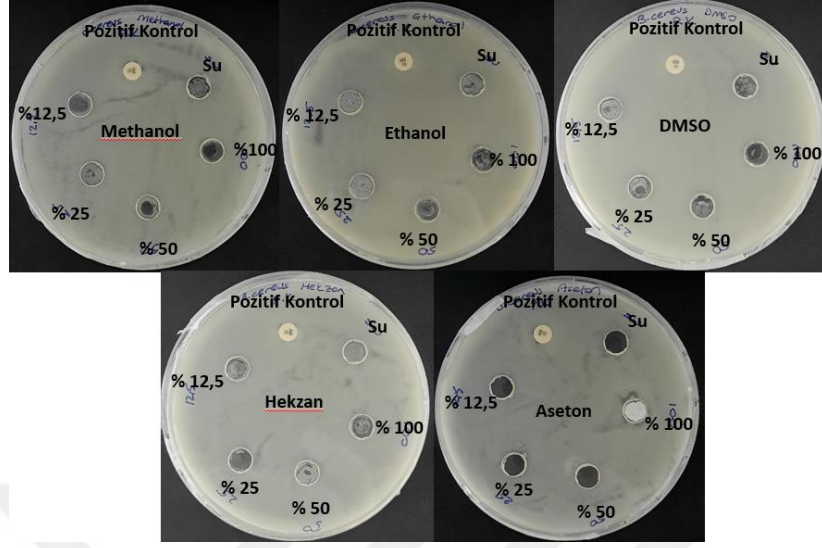
#### 3.1 Solvent Toksikite Denemesi

Ekstraksiyon aşamalarında kullanılan solventlerin bakteriler ve mantarlarda büyümelerini engelleyici durum varlığının anlaşılması amacıyla yapılan denemede gram negatif bakteriler *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Pseudomonas syringae pv. Tomato* ve gram pozitif *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Clavibacter michiganensis*, bakterileri ve *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Candida albicans* ATCC 10231, *Penicilium* sp. mantarları kullanılarak; aseton, hekzan, DMSO, etanol, metanol solventleri agar kuyucuk yöntemi ile test edilmiştir. Ayrıca solventlerin %100, %50, %25 ve %12,5'lük su ile seyreltmeleri denenerak hangi oranda kullanıldığında bakteri ve mantarlar üzerinde toksik etki yaratarak zon oluşumu gözlemlendiği belirlenmiştir.

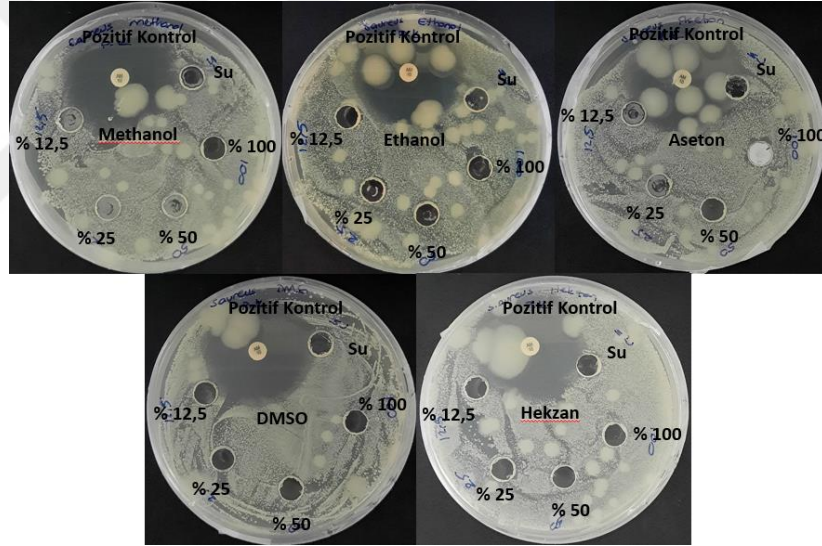
Solventlerin %100'lük formları haricinde zon oluşumu gözlemlenmeyip sadece seyreltilmeden kullanılan solventlerin toksik etki göstererek türlerin büyümesini engellediği oluşan zonlar ile görülmüştür. Bu solventler metanol, etanol ve aseton'dur. Hekzan, DMSO'da hiçbir konsantrasyonu için zon oluşumuna rastlanmamış ve toksik etki göstermediği görülmüştür. Oluşan zon çapları kumpas ile ölçülmüş, Çizelge 3.1'de verilmiştir.

%100 metanolün toksik etki gösterdiği bakteri ve mantarlar; *Escherichia coli* zon çapı 11,5mm, *Salmonella typhimurium* zon çapı 10,1mm, *Staphylococcus aureus* zon çapı 8,2mm, *Pseudomonas syringae pv. Tomato* zon çapı 9,3mm; *Candida albicans* zon çapı 9,4mm, *Penicilium* sp. zon çapı 9,1mm'dir. %100 etanolün toksik etki gösterdiği bakteri ve mantarlar; *Salmonella typhimurium* zon çapı 18,4mm, *Staphylococcus aureus* zon çapı 18,4mm; *Candida albicans* zon çapı 9mm, *Penicilium* sp. zon çapı 8,6mm'dir. %100 asetonun toksik etki gösterdiği bakteri ve mantarlar; *Escherichia coli* zon çapı 18,5mm, *Bacillus cereus* zon çapı 12,2mm, *Salmonella typhimurium* zon çapı 10mm, *Staphylococcus aureus* zon çapı 10,9mm;

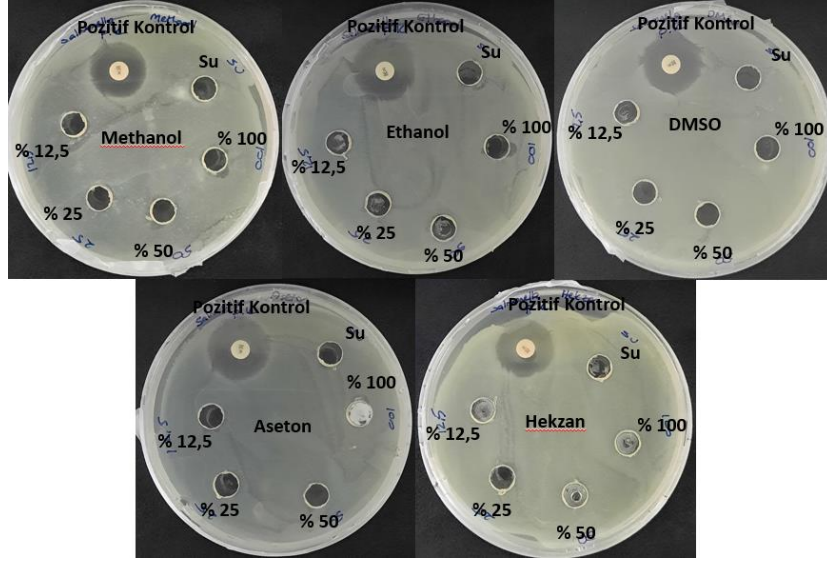
*Candida albicans* zon çapı 9,1mm, *Penicilium* sp. zon çapı 13,1mm'dir. Oluşan zon görüntüleri ise Şekil 3.1 ile 3.8 arasında verilmiştir.



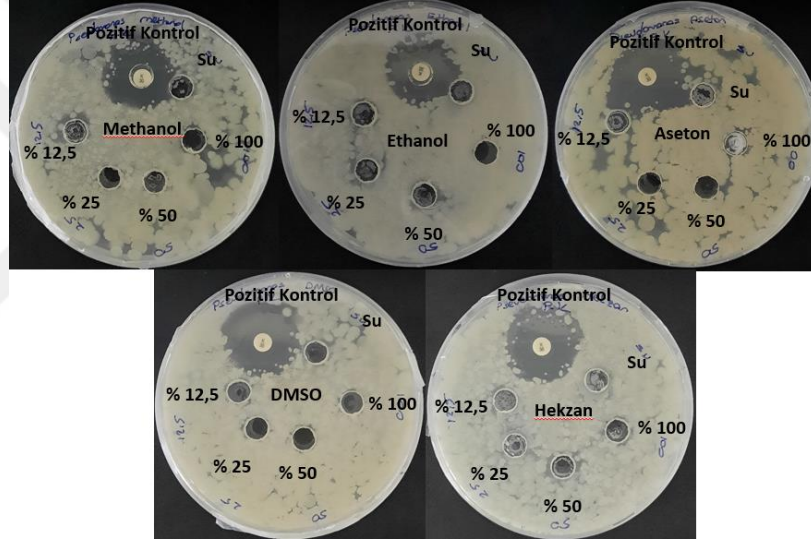
Şekil 0.20 : *Bacillus cereus* ATCC 10876 solvent toksisite denemesi.



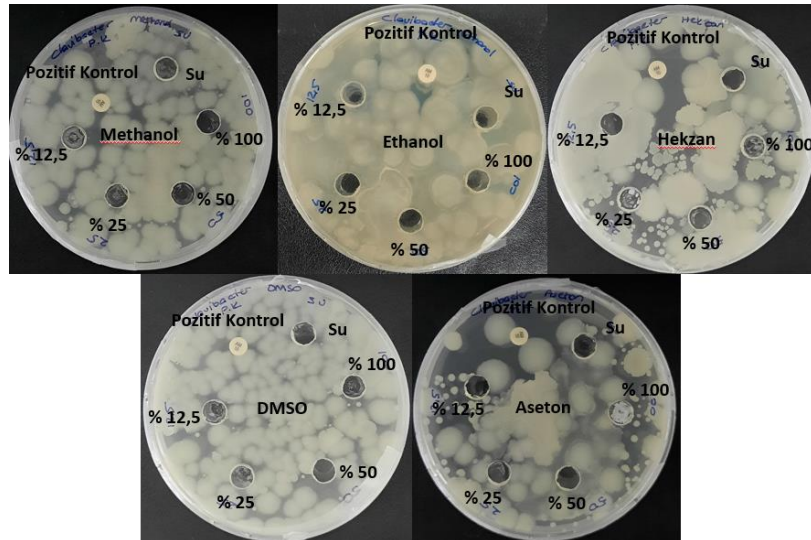
Şekil 0.21 : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 solvent toksisite denemesi.



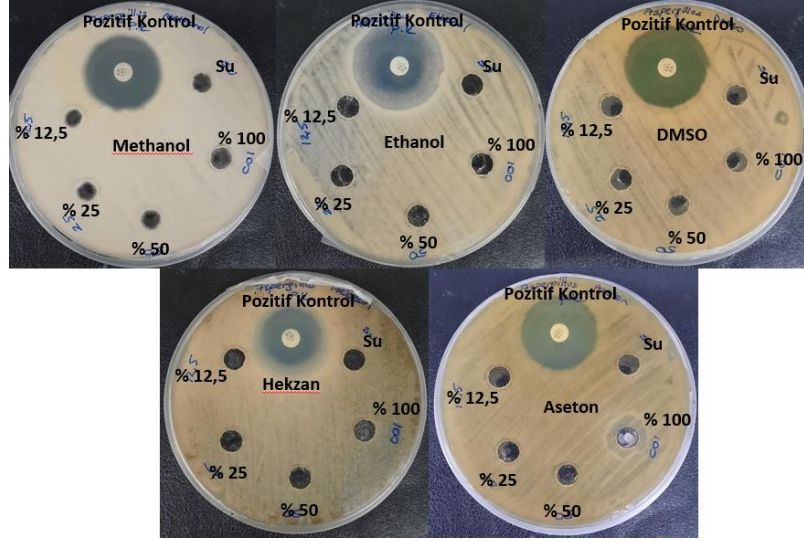
Şekil 0.22 : *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 solvent toksisite denemesi.



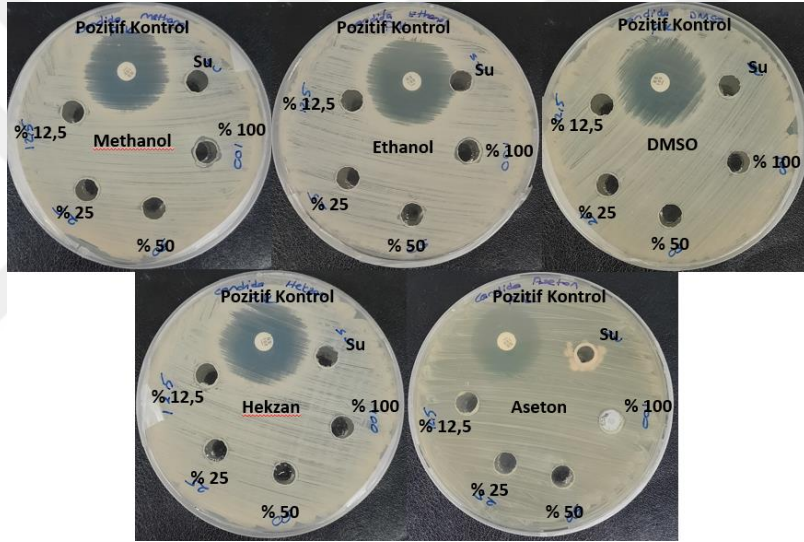
Şekil 0.23 : *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* solvent toksisite denemesi.



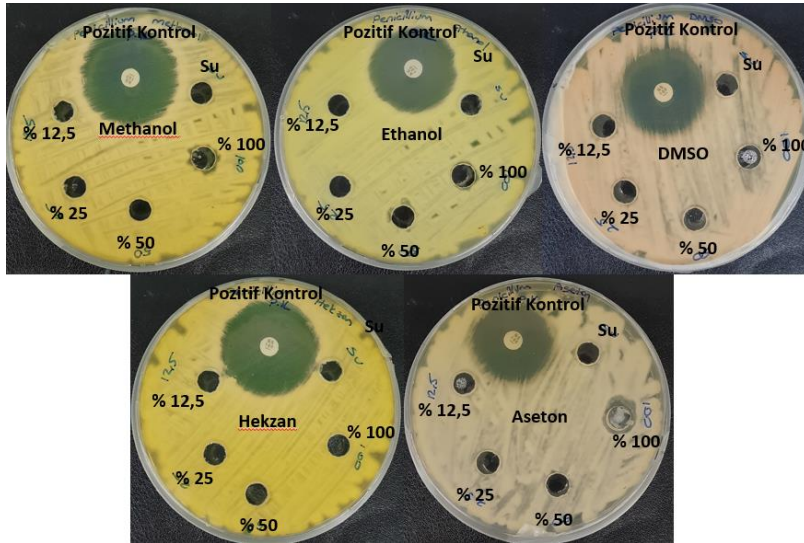
Şekil 0.24 : *Clavibacter michiganensis* solvent toksisite denemesi.



Şekil 0.25 : *Aspergillus niger* ATCC 16404 solvent toksisite denemesi.



Şekil 0.26 : *Candida albicans* ATCC 10231 solvent toksisite denemesi.



Şekil 0.27 : *Penicilium* sp. solvent toksisite denemesi.

**Çizelge 0.9** : Bakteri ve mantarlarda, solventlerin (%100'lük) toksisite denemesinde oluşan zon çapları (mm).

Bakteri ve Mantarlar	Metanol	Etanol	Aseton	Hekzan	DMSO
<i>Escherichia coli</i>	11,5	-	18,5	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	8,2	18,4	10,9	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	12,2	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	10,1	18,4	10	-	-
<i>Pseudomonas syringae pv. Tomato</i>	9,3	-	-	-	-
<i>Clavibacter michiganensis</i>	-	-	-	-	-
<i>Penicilium sp.</i>	9,1	8,6	13,1	-	-
<i>Candida albicans</i>	9,4	9	9,1	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-	-

### 3.2 Soxhlet Aparatı ile Ekstraksiyonu

Kurutulmuş mikroalg örneklerinden (*Calothrix sp.* P13E3, *Calothrix sp.* P17A4, *Cylindrospermopsis sp.* P17C5, *Cylindrospermopsis sp.* P12C6 , *Nostoc sp.* AQUAMEB-60 P13A6, *Cylindrospermopsis sp.* P12C5, *Calothrix sp.* P12E7, İzolasyon 1 *Merismopedia* , *Spirulina sp.* AQUAMEB-56 , *Chlorophyta* AQUAMEB-59 (Yonca), *Scenedesmus sp.* AQUAMEB-57 (Akvaryum), *Kirchneriella sp.* AQUAMEB-55, Mete Kültür # 10, Mete Kültür #20, *Aliinostoc sp.* AQUAMEB-58, *Euhalothece/Halothece sp.* AQUAMEB-3, *Phormidium sp.* AQUAMEB-19, *Aphanizomenon sp. (Cuspidothrix)* AQUAMEB-26, *Limnothrix sp.* AQUAMEB-27., *Calothrix sp.* AQUAMEB-29, *Sphaerospermopsis sp.* AQUAMEB-30, *Synechococcaceae sp.* AQUAMEB-32, *Ankistrodesmus sp.* AQUAMEB-33, *Pseudoanabaena sp.* AQUAMEB-36) metanol kullanılarak soxhlet aparatı ile elde edilen ekstraktların disk difüzyon metodu ile antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir.

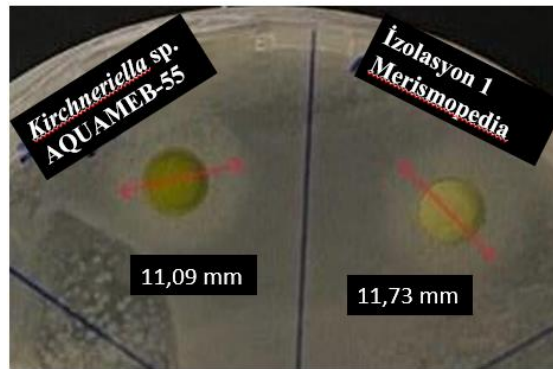
Metanol kullanılarak soxhlet aparatı ile yapılan ekstraksiyonda örneklerin miktarları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çalışmada kullanılan suşlar *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Clavibacter michiganensis*, *Pseudomonas syringae pv. Tomato*, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Penicilium*'dur. Antimikrobiyal aktivite sonuçlarında zon oluşumu gözlenmemiştir. *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 bakterisinde, İzolasyon 1 *Merismopedia* ve *Kirchneriella sp.* AQUAMEB-55 örnek ekstraktlarında beyaz renkli halo şeklinde zon oluşumu göstermiştir.

Örneklerin halo şeklindeki zon çapları İzolasyon 1 *Merismopedia* için 11,73 mm, *Kirchneriella* sp. AQUAMEB-55 11,09 mm olarak kumpas ve Image J programı kullanılarak ölçüm yapılmıştır. Petri üzerinde görünüşleri ise Şekil 3.9’de verilmiştir.

**Çizelge 0.10** : Metanol kullanılarak soxhlet aparatı ile gerçekleştirilen ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstrakt miktarları.

Kültür Adı	Miktar (mg/ml)
<i>Calothrix</i> sp. P13E3	8,9
<i>Calothrix</i> sp. P17A4	9
<i>Cylindrospermopsis</i> sp. P17C5	14,2
<i>Cylindrospermopsis</i> sp. P12C6	18
<i>Nostoc</i> sp. AQUAMEB-60 P13A6	7,1
<i>Cylindrospermopsis</i> sp. P12C5	22,3
<i>Calothrix</i> sp. P12E7	9,7
İzolasyon 1 <i>Merismopedia</i>	9,2
<i>Spirulina</i> sp. AQUAMEB-56	38,4
<i>Chlorophyta</i> AQUAMEB-59 (Yonca)	17,9
<i>Scenedesmus</i> sp. AQUAMEB-57 (Akvaryum)	8,4
<i>Kirchneriella</i> sp. AQUAMEB-55	21,5
Mete Kültür # 10	9,4
Mete Kültür #20	9,8
<i>Aliinostoc</i> sp. AQUAMEB-58	18
<i>Euhalothece/Halothece</i> sp. AQUAMEB-3	16,6
<i>Phormidium</i> sp. AQUAMEB-19	41,9
<i>Aphanizomenon</i> ( <i>Cuspidothrix</i> ) AQUAMEB-26	6,1
<i>Limnothrix</i> sp. AQUAMEB-27	24,9
<i>Calothrix</i> sp. AQUAMEB-29	9,9
<i>Sphaerospermopsis</i> sp. AQUAMEB-30	10,9
<i>Synechococcaceae</i> sp. AQUAMEB-32	13,5
<i>Ankistrodesmus</i> sp. AQUAMEB-33	6,6
<i>Pseudoanabaena</i> sp. AQUAMEB-36	9,4



**Şekil 0.28** : Soxhlet aparatı ile ekstraksiyon, *Salmonella typhimurium* bakterisinde oluşan halo zonlar.

### 3.3 Ultrasonik Banyo ile Ekstraksiyon

Kurutulmuş mikroalg örneklerinden elde edilen ekstraktların antimikrobiyal aktiviteleri agar kuyucuk ve MIK yöntemleri ile belirlenmiştir.

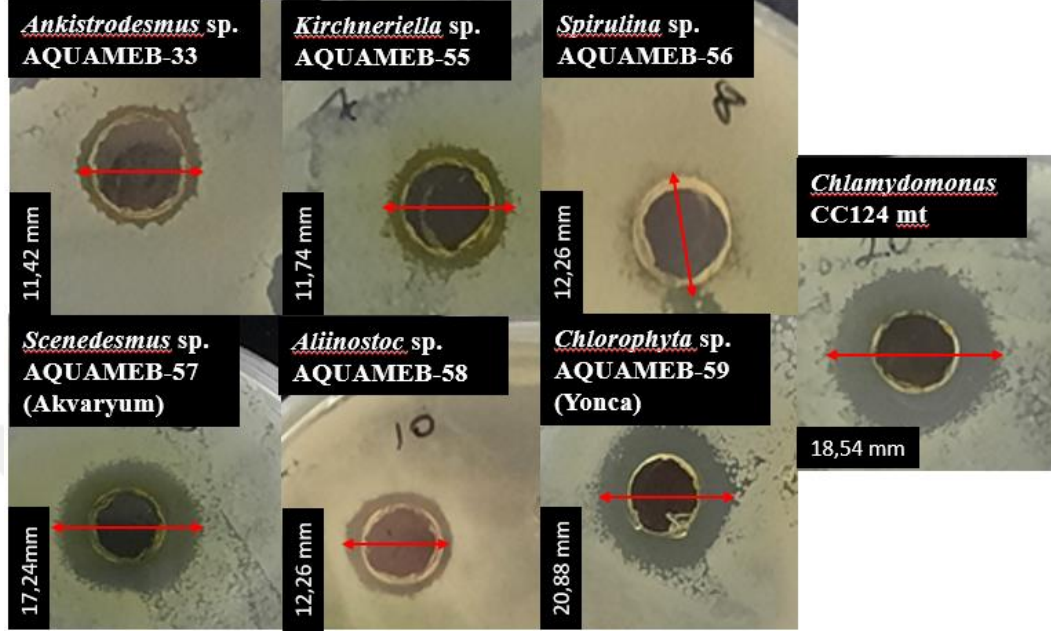
### 3.3.1 Agar kuyu difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivite

Kurutulmuş mikroalg örnekleri (*Calothrix* sp. P13E3, *Calothrix* sp. P17A4, *Cylindrospermopsis* sp. P17C5, *Cylindrospermopsis* sp. P12C6, *Nostoc* sp. AQUAMEB-60 P13A6, *Calothrix* sp. P12E7, *Spirulina* sp. AQUAMEB-56, *Chlorophyta* AQUAMEB-59 (Yonca), *Scenedesmus* sp. AQUAMEB-57 (Akvaryum), *Kirchneriella* sp. AQUAMEB-55, *Aliinostoc* sp. AQUAMEB-58, *Euhalotheca/Halotheca* sp. AQUAMEB-3, *Dunaliella* sp. AQUAMEB-4, *Dunaliella* sp. AQUAMEB-5(1), *Dunaliella* sp. AQUAMEB-8, *Dunaliella* sp. AQUAMEB-15, *Tetraselmis* sp. AQUAMEB-17, *Dunaliella* sp. AQUAMEB-21, *Aphanizomenon* (*Cuspidothrix*) AQUAMEB-26, *Limnothrix* sp. AQUAMEB-27, *Calothrix* sp. AQUAMEB-29, *Calothrix* sp. AQUAMEB-31, *Synechococcaceae* sp. AQUAMEB-32, *Ankistrodesmus* sp. AQUAMEB-33, *Pseudoanabaena* sp. AQUAMEB-36, *Chlamydomonas* CC124 mt) %70 Metanol kullanılarak ultrasonik banyo muamelesi ile elde edilen ekstraktlar (özüt derişimleri 100 mg/ml) kuyularda oluşturdukları zon çapları belirlenmiş kumpas ve ImageJ programı ile ölçümleri yapılmıştır. Belirlenen zon çapları Çizelge 3.4 ve 3.5’de verilmiştir.

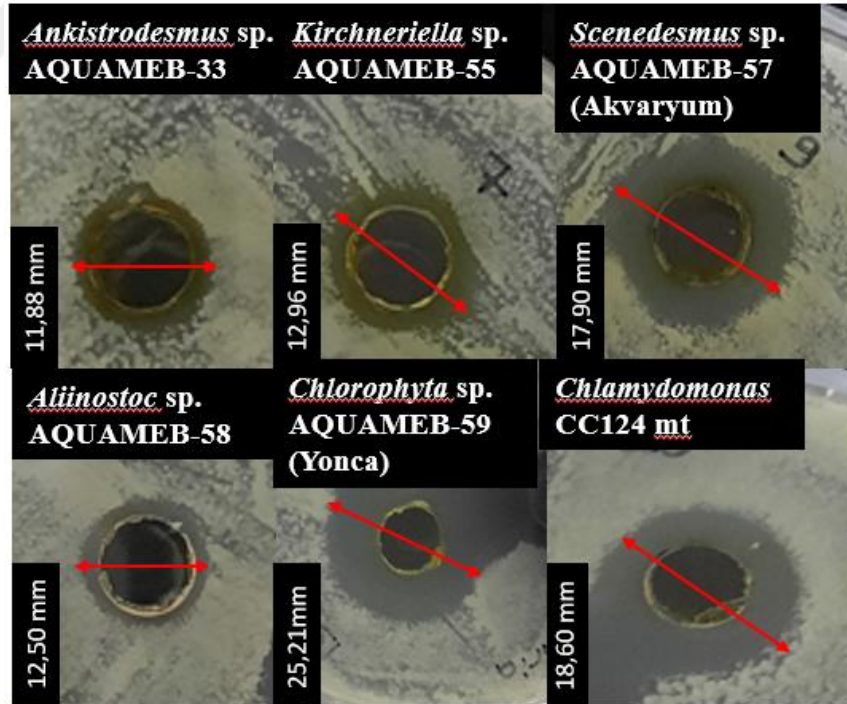
Gram negatif bakterilerden *Escherichia coli* ATCC 25922 için zon çapları: *Spirulina* sp. AQUAMEB-56 12,26 mm, *Chlorophyta* AQUAMEB-59 (Yonca) 20,88 mm, *Scenedesmus* sp. AQUAMEB-57 (Akvaryum) 17,24 mm, *Kirchneriella* sp. AQUAMEB-55 11,74 mm, *Aliinostoc* sp. AQUAMEB-58 12,26 mm, *Ankistrodesmus* sp. AQUAMEB-33 11,42 mm, *Chlamydomonas* CC124 mt 18,54 mm ölçülmüştür. Zon çaplarının ölçümleri ve görüntüleri Şekil 3.10’da verilmiştir. *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 için zon çapları: *Chlorophyta* AQUAMEB-59 (Yonca) 25,21 mm, *Scenedesmus* sp. AQUAMEB-57 (Akvaryum) 17,90 mm, *Kirchneriella* sp. AQUAMEB-55 12,96 mm, *Aliinostoc* sp. AQUAMEB-58 12,50 mm, *Ankistrodesmus* sp. AQUAMEB-33 11,88 mm, *Chlamydomonas* CC124 mt 18,60 mm ölçülmüştür. Zon çaplarının ölçümleri ve görüntüleri Şekil 3.11’de verilmiştir. *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* bakterisinde ise hiçbir zon oluşumuna rastlanılmamıştır.

Gram pozitif bakterilerden, *Bacillus cereus* ATCC 10876 bakterisinde zon çapları: *Spirulina* sp. AQUAMEB-56 11,68 mm, *Chlorophyta* AQUAMEB-59 (Yonca) 14,29 mm, *Scenedesmus* sp. AQUAMEB-57 (Akvaryum) 15,52 mm, *Kirchneriella* sp. AQUAMEB-55 11,87 mm, *Aliinostoc* sp. AQUAMEB-58 12,26 mm, *Dunaliella*

sp. AQUAMEB-15 4,98 mm (zon yarıçapı), *Ankistrodesmus* sp. AQUAMEB-33 11,89 mm, *Pseudoanabaena* sp. AQUAMEB-36 11,13 mm ölçülmüştür. Zon çaplarının ölçümleri ve görüntüleri Şekil 3.12’de verilmiştir.



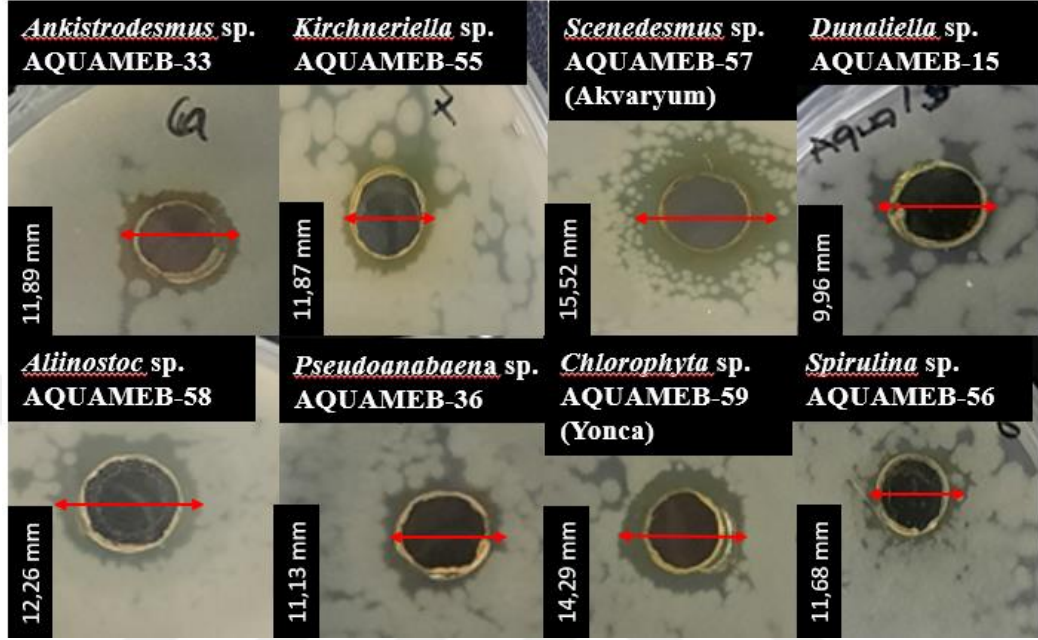
Şekil 0.29 : *Escherichia coli* bakterisinde zon çapları ölçüm ve görünümüleri.



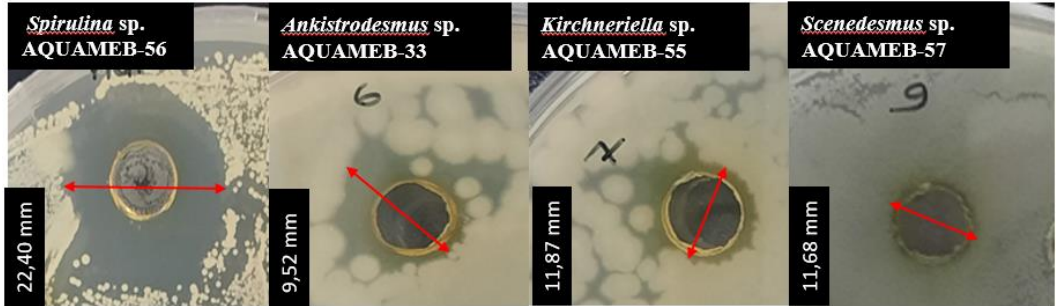
Şekil 0.30 : *Salmonella typhimurium* bakterisinde zon çapları ölçüm ve görünümüleri.

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 için zon çapları: *Spirulina* sp. AQUAMEB-56 11,68 mm, *Scenedesmus* sp. AQUAMEB-57 (Akvaryum) 12,92 mm, *Kirchneriella* sp. AQUAMEB-55 11,61 mm, *Ankistrodesmus* sp. AQUAMEB-33 11,55 mm

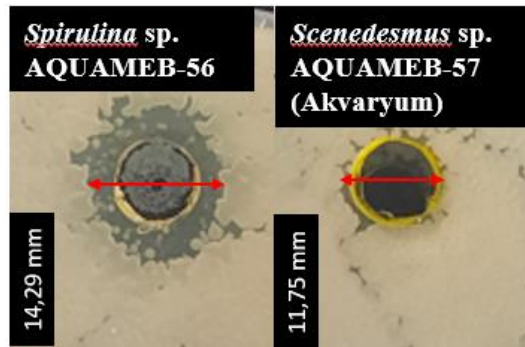
ölçülmüştür. Zon çaplarının ölçümleri ve görüntüleri Şekil 3.13'te verilmiştir. *Clavibacter michiganensis* bakterisinde ise *Spirulina* sp. AQUAMEB-56 14,29 mm, *Scenedesmus* sp. AQUAMEB-57 (Akvaryum) 11,75mm olarak ölçülmüştür. Zon çaplarının ölçümleri ve görüntüleri Şekil 3.14'de verilmiştir.



Şekil 0.31 : *Bacillus cereus* bakterisinde zon çapları ölçüm ve görünümü.



Şekil 0.32 : *Staphylococcus aureus* bakterisi zon çapları ölçüm ve görünümü.



Şekil 0.33 : *Clavibacter michiganensis* bakterisinde zon çapları ölçüm ve görünümü.

Mantarlarda *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Penicilium* da zon oluşumuna rastlanılmamıştır.

### 3.3.2 Broth mikrodilüsyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivite

Kurutulmuş mikroalg örnekleri %70 Metanol kullanılarak ultrasonik banyo muamelesi ile elde edilen ekstraktlar (özüt derişimleri 100 mg/ml) 96 kuyulu mikropkaka içerisinde OD ölçümleri ve kolometrik olarak saptanan INT eklenmesi yoluyla MIK yöntemi ile antimikrobiyal analizleri gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada ilk olarak *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşları kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite gösteren örnekler ile *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Clavibacter michiganensis* ve *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* suşları ile MIK yöntemi uygulanarak antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir.

Kullanılan mikroalg kültürleri 1'den 20'e kadar numaralandırılarak deneyler gerçekleştirilmiştir. Verilen numara ve kültür ismi eşleştirmesi aşağıda yer alan Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Antibakteriyel aktivite gösteren mikroalgler; *Spirulina* sp. AQUAMEB-56, *Scenedesmus* sp. AQUAMEB-57 (Akvaryum), *Kirchneriella* sp. AQUAMEB-55, *Aliinostoc* sp. AQUAMEB-58, *Ankistrodesmus* sp. AQUAMEB-33, *Pseudoanabaena* sp. AQUAMEB-36, *Chlamydomonas* CC124 mt'dir. Antimikrobiyal etki farklı suşlarda ve farklı konsantrasyonlarda görülmüştür. Etkinin görüldüğü suş ismi, konsantrasyon değeri ve agar kuyu yöntemi ile belirlenmiş olan zon çapları gram negatif bakteriler için Çizelge 3.4'de ve gram pozitif bakteriler için ise Çizelge 3.5'te verilmiştir.

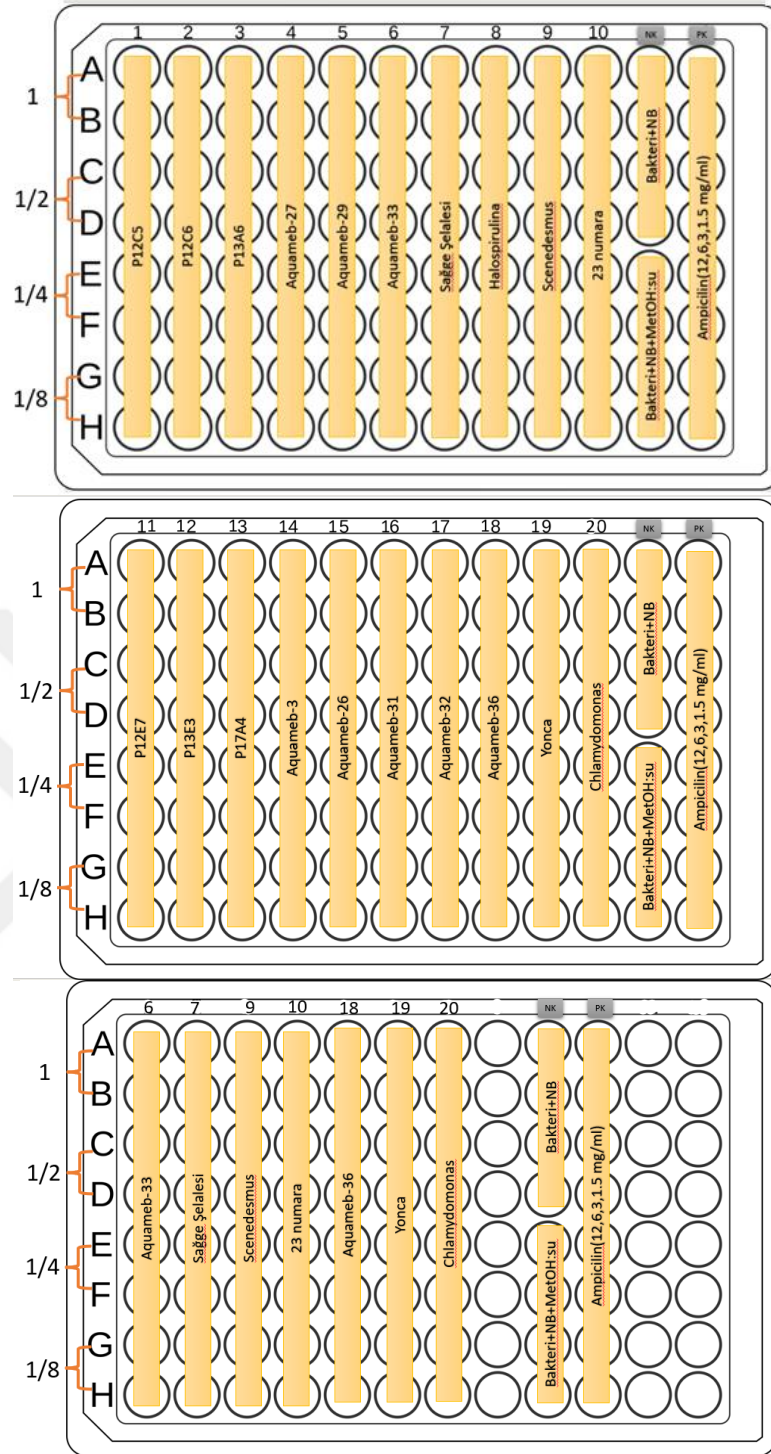
*Escherichia coli* bakterisi plakasında yer alan INT eklemesi sonucunda renk değişimi gözlenmeyen örnekler ve belirlenen minimal inhibasyon konsantrasyon değeri: *Nostoc* sp. AQUAMEB-60 P13A6 (3) 2,5 mg/ml, *Limnothrix* sp. AQUAMEB-27 (4) 0,625 mg/ml, *Calothrix* sp. AQUAMEB-29 (5) 1,25 mg/ml, *Ankistrodesmus* sp. AQUAMEB-33 (6) <0,625 mg/ml, *Kirchneriella* sp. AQUAMEB-55(7) <0,625 mg/ml, AQUAMEB-57 *Scenedesmus* sp. (Akvaryum) (9) <0,625 mg/ml ve *Aliinostoc* sp. AQUAMEB-58 (10) <0,625 mg/ml şeklindedir. Bu kuyulardan alınarak petrilere MBC belirlemek amacıyla ekim yapılan örneklerde, *Limnothrix* sp. AQUAMEB-27 (4) için neredeyse hiç büyüme gözlenmemişken, *Ankistrodesmus* sp.

AQUAMEB-33 (6) petrinin bir kısmında büyüme meydana gelmiştir, *Scenedesmus* sp. AQUAMEB-57 (Akvaryum) (9) ve *Aliinostoc* sp. AQUAMEB-58 (10) örneklerde ise az miktarda kolonilerin oluştuğu tespit edilmiştir. Örneklerin MIC INT uygulaması sonrası görüntüleri ve renk değişimi olmayan kuyuların ekim sonrası plakalarda görünümü Şekil 3.15'te verilmiştir.

**Çizelge 0.11** : MİK değerlerinin belirlenmesi için antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılan mikroalg kültürlerinin deneyler için numaralandırılması.

Verilen Numara	Kültür İsmi
1	<i>Cylindrospermopsis</i> sp. P12C5
2	<i>Cylindrospermopsis</i> sp. P12C6
3	<i>Nostoc</i> sp. AQUAMEB-60 P13A6
4	<i>Limnothrix</i> sp. AQUAMEB-27
5	<i>Calothrix</i> sp. AQUAMEB-29
6	<i>Ankistrodesmus</i> sp. AQUAMEB-33
7	<i>Kirchneriella</i> sp. AQUAMEB-55
8	<i>Spirulina</i> sp. AQUAMEB-56
9	<i>Scenedesmus</i> sp. AQUAMEB-57 (Akvaryum)
10	<i>Aliinostoc</i> sp. AQUAMEB-58
11	<i>Calothrix</i> sp. P12E7
12	<i>Calothrix</i> sp. P13E3
13	<i>Calothrix</i> sp. P17A4
14	<i>Eualothece/Halothece</i> sp. AQUAMEB-3
15	<i>Aphanizomenon (Cuspidothrix)</i> AQUAMEB-26
16	<i>Calothrix</i> sp. AQUAMEB-31
17	<i>Synechococcaceae</i> sp. AQUAMEB-32
18	<i>Pseudoanabaena</i> sp. AQUAMEB-36
19	<i>Chlorophyta</i> AQUAMEB-59 (Yonca)
20	<i>Chlamydomonas</i> CC124 mt

Diğer *Escherichia coli* bakterisi plakasında yer alan INT eklemesi sonucunda renk değişimi gözlenmeyen örnekler ve belirlenen minimal inhibasyon konsantrasyon değerleri; *Pseudoanabaena* sp. AQUAMEB-36 (18) <0,625 mg/ml, *Chlorophyta* AQUAMEB-59 (Yonca)(19) <0,625 mg/ml, *Chlamydomonas* sp. (20) 1,25 mg/ml'dir. Bu kuyulardan alınarak petrilere MBC belirlemek amacıyla ekim yapılan örneklerde *Pseudoanabaena* sp. AQUAMEB-36 (18), *Chlorophyta* AQUAMEB-59 (Yonca) (19), *Chlamydomonas* sp. (20) az miktarda (5-10 arası koloni) büyüme gözlenmemiştir. Örneklerin MIC INT uygulaması sonrası görüntüleri ve renk değişimi olmayan kuyuların ekim sonrası plakalarda görünümü yine Şekil 3.16'da verilmiştir.

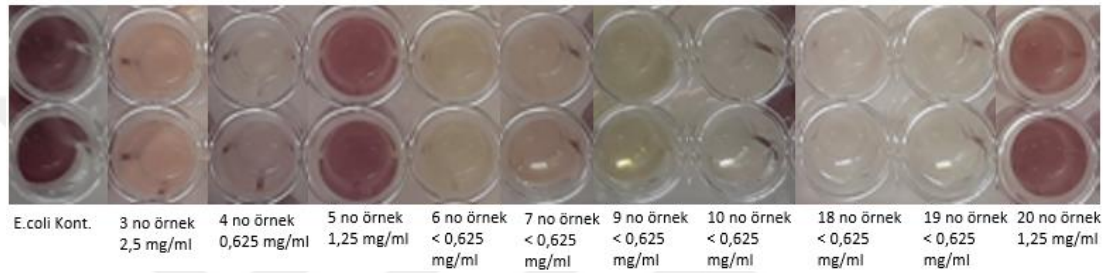


**Şekil 0.34** : MIK yönteminde kullanılan mikroalg ekstraktlarının 96 kuyucuklu plaka içerisinde yerleşimi.<sup>3</sup>

*Bacillus cereus* bakterisi plakasında yer alan INT eklemesi sonucunda renk değişimi gözlenmeyen örnekler ve belirlenen minimal inhibasyon konsantrasyon değerleri: *Nostoc* sp. AQUAMEB-60 P13A6 (3) <0,625 mg/ml, *Limnothrix* sp. AQUAMEB-27

<sup>3</sup> Yerleşimler yukarıdan aşağı doğru seyreltmeler ile iki tekrarlı olarak yapılmıştır.

(4) 1,25 mg/ml, *Ankistrodesmus* sp. AQUAMEB-33 (6) <0,625 mg/ml, *Kirchneriella* sp. AQUAMEB-55(7) <0,625 mg/ml, *Scenedesmus* sp. AQUAMEB-57 (Akvaryum) (9) <0,625 mg/ml ve *Aliinostoc* sp. AQUAMEB-58 (10) <0,625 mg/ml'dir. Bu kuyulardan alınarak petrilere MBC belirlemek amacıyla ekim yapılan örneklerde, *Limnothrix* sp. AQUAMEB-27 (4), *Ankistrodesmus* sp. AQUAMEB-3 (6), *Kirchneriella* sp. AQUAMEB-55(7), *Scenedesmus* sp. AQUAMEB-57 (Akvaryum) (9) ve *Aliinostoc* sp. AQUAMEB-58 (10) büyüme meydana gelmiştir. Örneklerin MIC INT uygulaması sonrası görüntüleri ve renk değişimi olmayan kuyuların ekim sonrası plakalarda görünümü Şekil 3.9'da verilmiştir.

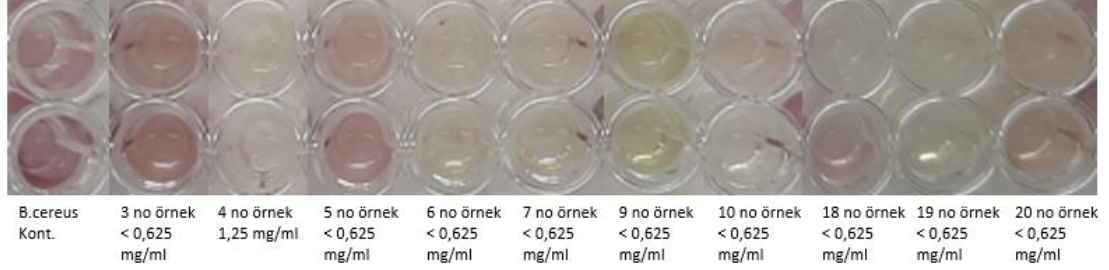


**Şekil 0.35 :** *Escherichia coli* bakterisine ait INT MIK yönteminde etkinin görüldüğü konsantrasyonun bulunduğu kuyular.<sup>4</sup>

Diğer *Bacillus cereus* bakterisi plakasında yer alan INT eklemesi sonucunda renk değişimi gözlenmeyen örnekler ve belirlenen minimal inhibasyon konsantrasyon değerleri; *Pseudoanabaena* sp. AQUAMEB-36 (18) <0,625 mg/ml, *Chlorophyta* AQUAMEB-59 (Yonca) (19) <0,625 mg/ml, *Chlamydomonas* sp. (20) <0,625 mg/ml'dir. Bu kuyulardan alınarak petrilere MBC belirlemek amacıyla ekim yapılan örneklerde *Pseudoanabaena* sp. AQUAMEB-36 (18) tek bir koloni, *Chlorophyta* AQUAMEB-59 (Yonca) (19) hiçbir büyüme gözlenmemiş ve *Chlamydomonas* sp. (20) 10 kolonilik bir büyüme meydana gelmiştir. Örneklerin MIC INT uygulaması sonrası görüntüleri ve renk değişimi olmayan kuyuların ekim sonrası plakalarda görünümü yine Şekil 3.17'de verilmiştir.

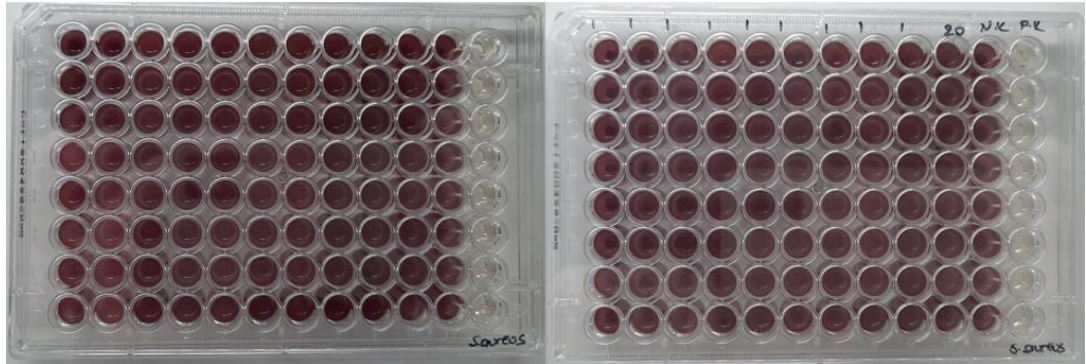
<sup>4</sup> 3 numaralı örnek: *Nostoc* sp. AQUAMEB-60 P13A6, 4 numaralı örnek: *Limnothrix* sp. AQUAMEB-27, 5 numaralı örnek: *Calothrix* sp. AQUAMEB-29, 6 numaralı örnek: *Ankistrodesmus* sp. AQUAMEB-33, 7 numaralı örnek: *Kirchneriella* sp. AQUAMEB-55, 9 numaralı örnek: *Scenedesmus* sp. AQUAMEB-57 (Akvaryum), 10 numaralı örnek: *Aliinostoc* sp. AQUAMEB-58, 18 numaralı örnek: *Pseudoanabaena* sp. AQUAMEB-36, 19 numaralı örnek: *Chlorophyta* AQUAMEB-59 (Yonca), 20 numaralı örnek: *Chlamydomonas* CC124 mt.

*Staphylococcus aureus* için hiçbir kültürden elde edilen ekstrakt bakterinin büyümesini engelleyici/durdurucu bir etki göstermemiştir. Tüm kuyularda renk değişimi gözlemlenmiştir. Plaka görüntüsü Şekil 3.18’de verilmiştir.



**Şekil 0.36 :** *Bacillus cereus* bakterisine ait INT MIK yönteminde etkinin görüldüğü konsantrasyonun bulunduğu kuyular.<sup>5</sup>

Diğer bakteriler ile yapılan testlerde pozitif sonuç veren *Ankistrodesmus* sp. AQUAMEB-33, *Kirchneriella* sp. AQUAMEB-55(7), *Scenedesmus* sp. AQUAMEB-57 (Akvaryum) (9), *Aliinostoc* sp. AQUAMEB-58 (10), *Pseudoanabaena* sp. AQUAMEB-36 (18), *Chlorophyta* AQUAMEB-59 (Yonca)(19), *Chlamydomonas* sp.(20) örnekler *Salmonella typhimurium*, *Clavibacter michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* bakterileri için de denenmiştir.

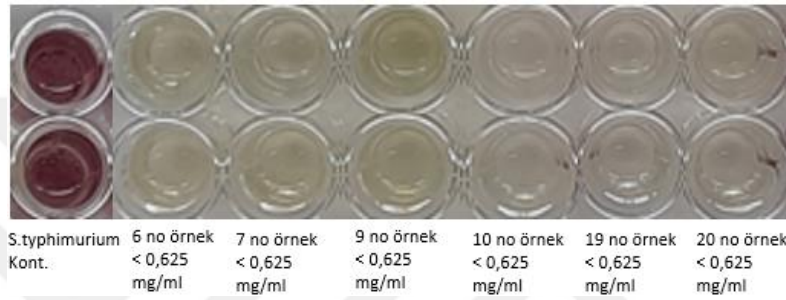


**Şekil 0.37 :** *Staphylococcus aureus* bakterisine ait plakaların görünümü.

*Salmonella typhimurium* bakterisi plakasında yer alan *Ankistrodesmus* sp. AQUAMEB-33 (6), *Kirchneriella* sp. AQUAMEB-55(7), *Scenedesmus* sp. AQUAMEB-57 (Akvaryum) (9), *Aliinostoc* sp. AQUAMEB-58 (10), *Chlorophyta*

<sup>5</sup> 3 numaralı örnek: *Nostoc* sp. AQUAMEB-60 P13A6, 4 numaralı örnek: *Limnithrix* sp. AQUAMEB-27, 5 numaralı örnek: *Calothrix* sp. AQUAMEB-29, 6 numaralı örnek: *Ankistrodesmus* sp. AQUAMEB-33, 7 numaralı örnek: *Kirchneriella* sp. AQUAMEB-55, 9 numaralı örnek: *Scenedesmus* sp. AQUAMEB-57 (Akvaryum), 10 numaralı örnek: *Aliinostoc* sp. AQUAMEB-58, 18 numaralı örnek: *Pseudoanabaena* sp. AQUAMEB-36, 19 numaralı örnek: *Chlorophyta* AQUAMEB-59 (Yonca), 20 numaralı örnek: *Chlamydomonas* CC124 mt

AQUAMEB-59 (Yonca)(19), *Chlamydomonas* sp.(20) örneklerinde INT eklemesi sonucunda kuyularda renk değişimleri gözlemlenmemiştir. Bu kuyulardan alınan örnekler petrilere MBC belirlemek amacıyla ekim yapılmıştır. *Ankistrodesmus* sp. AQUAMEB-33 (6)'da 3 koloni, *Kirchneriella* sp. AQUAMEB-55(7)'de 2 koloni, *Scenedesmus* sp. AQUAMEB-57 (Akvaryum) (9)'da 14 koloni, *Aliinostoc* sp. AQUAMEB-58 (10) 16 koloni, *Chlorophyta* AQUAMEB-59 (Yonca)(19)'da 12 koloni, *Chlamydomonas* sp.(20)'da 2 koloni sayılmıştır. Örneklerin MIC INT uygulaması sonrası görüntüleri ve renk değişimi olmayan kuyuların ekim sonrası plakaların görünümü Şekil 3.19'da verilmiştir.



**Şekil 0.38** : *Salmonella typhimurium* bakterisine ait INT MİK yönteminde etkinin görüldüğü konsantrasyonun bulunduğu kuyular.<sup>6</sup>

*Clavibacter michiganensis* bakterisinde büyüme koşullarının uygun olmaması nedeniyle kontrol grubunda da renk değişimleri göstermediğinden plakada büyümenin gerçekleşmediği görülmüştür (Şekil 3.20).

MIC80 değerleri OD ölçümlerine göre *Escherichia coli* bakterisi için: *Limnothrix* sp. AQUAMEB-27 (4) 0,021, *Ankistrodesmus* sp. AQUAMEB-33 (6) 0,029, *Kirchneriella* sp. AQUAMEB-55(7), 0,026, *Scenedesmus* sp. AQUAMEB-57 (Akvaryum) (9) 0,028, *Aliinostoc* sp. AQUAMEB-58 (10) 0,020, *Pseudoanabaena* sp. AQUAMEB-36 (18) 0,023, *Chlorophyta* AQUAMEB-59 (Yonca)(19) 0,023, *Chlamydomonas* (20) 0,045 şeklindedir. Ampicilin 3 mg/ml konsantrasyonda 0,018'dir.

*Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* bakterisi plakasında kontrol kuyularına kıyaslandığında daha açık renkte renk değişimi/renk değişiminin olmadığı kuyulara

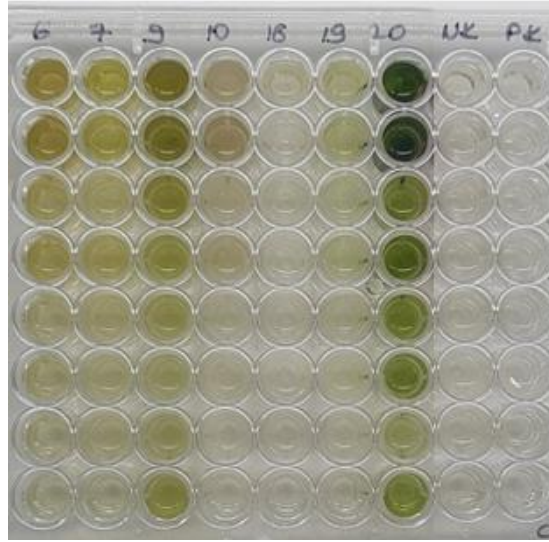
<sup>6</sup> 3 numaralı örnek: *Nostoc* sp. AQUAMEB-60 P13A6, 4 numaralı örnek: *Limnothrix* sp. AQUAMEB-27, 5 numaralı örnek: *Calothrix* sp. AQUAMEB-29, 6 numaralı örnek: *Ankistrodesmus* sp. AQUAMEB-33, 7 numaralı örnek: *Kirchneriella* sp. AQUAMEB-55, 9 numaralı örnek: *Scenedesmus* sp. AQUAMEB-57 (Akvaryum), 10 numaralı örnek: *Aliinostoc* sp. AQUAMEB-58, 18 numaralı örnek: *Pseudoanabaena* sp. AQUAMEB-36, 19 numaralı örnek: *Chlorophyta* AQUAMEB-59 (Yonca), 20 numaralı örnek: *Chlamydomonas* CC124 mt

rastlanmamıştır (Şekil 3.21). MIC80 değerleri OD ölçümlerine göre *Bacillus cereus* için, *Limnithrix* sp. AQUAMEB-27 (4) 0,020, *Ankistrodesmus* sp. AQUAMEB-33 (6) 0,024, *Kirchneriella* sp. AQUAMEB-55(7) 0,021, *Scenedesmus* sp. AQUAMEB-57 (Akvaryum) (9) 0,030, *Aliinostoc* sp. AQUAMEB-58 (10) 0,026, *Pseudoanabaena* sp. AQUAMEB-36 (18) için 0,021, *Chlorophyta* AQUAMEB-59 (Yonca)(19) 0,023, *Chlamydomonas* CC124 mt (20) 0,031 şeklindedir. Ampicilin antibiyotiği ise 12 mg/ml konsantrasyonda 0,018'dir.

**Çizelge 0.12** : Gram negatif bakterilerin mikroalg ekstraktlarının (%70 Metanol) zon çapları (mm) ve MİK değerleri (mg/mL).

Kültürler	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Tomato</i>
1	-	TE	TE <sup>7</sup>
2	-	TE	TE
3	-/ 2,5	TE	TE
4	-/ 0,625	TE	TE
5	-/ 1,25	TE	TE
6	11,42/ <0,625	11,88/ < 0,625	-
7	11,74/ <0,625	12,96/ < 0,625	-
8	-	TE	TE
9	17,24/ <0,625	17,90/ <0,625	-
10	12,26/ <0,625	12,50/ <0,625	-
11	-	TE	TE
12	-	TE	TE
13	-	TE	TE
14	-	TE	TE
15	-	TE	TE
16	-	TE	TE
17	-	TE	TE
18	TE/ <0,625	TE	-
19	20,88/ <0,625	25,21/ <0,625	-
20	18,54 /1,25	18,60/ <0,625	-

<sup>7</sup> TE: Test edilmedi.

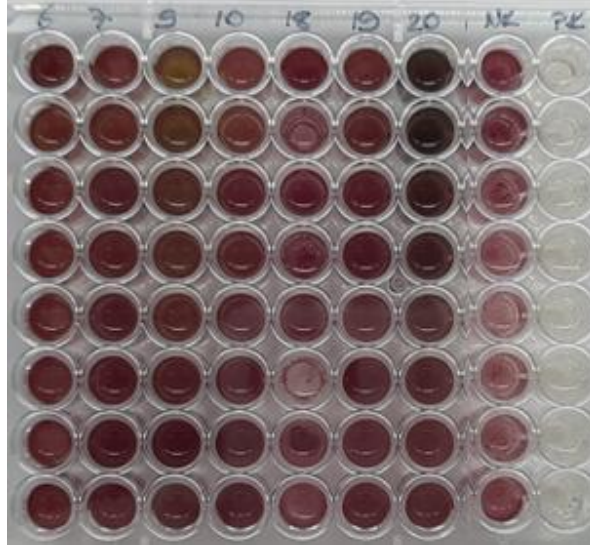


Şekil 0.39 : *Clavibacter michiganensis* bakterisine ait plaka görünümü.

Çizelge 0.13 : Gram pozitif bakterilerin mikroalg ekstraktlarının (%70 Metanol) zon çapları (mm) ve MİK değerleri(mg/mL).

Kültürler	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i>
1	-	-	TE <sup>8</sup>
2	-	-	TE
3	- / <0,625	-	TE
4	- / 1,25	-	TE
5	-	-	TE
6	11,89 / <0,625	-	-
7	10,63 / <0,625	-	-
8	-	-	14,29 / TE
9	12,63 / <0,625	-	11,75 / TE
10	12,03 / <0,625	-	-
11	-	-	TE
12	-	-	TE
13	-	-	TE
14	-	-	TE
15	-	-	TE
16	-	-	TE
17	-	-	TE
18	11,13 / <0,625	-	-
19	14,29 / <0,625	-	-
20	- / <0,625	-	-

<sup>8</sup> TE: Test edilmedi.



**Şekil 0.40 :** *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* bakterisine ait plaka görünümü.

### 3.4 Prob Sonikasyon ile Ekstraksiyon

Kurutulmuş mikroalg örneklerinden su kullanılarak prob sonikasyon ile elde edilen ekstraktların disk difüzyon metodu ile antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. Özüt derişimleri 10 mg/ml'dir.

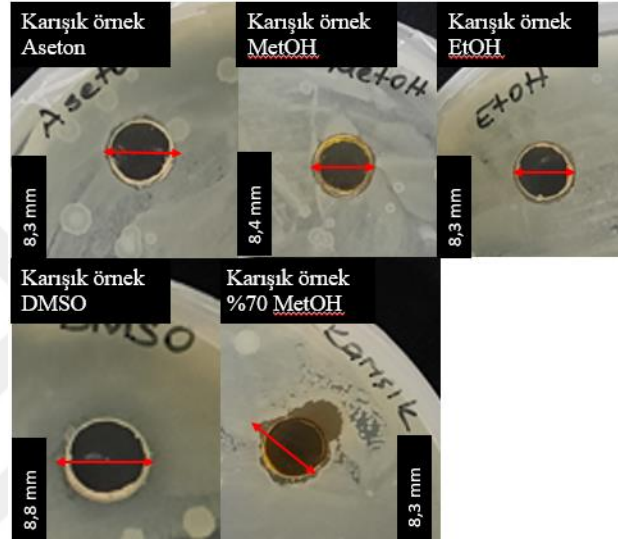
Çalışmada kullanılan suşlar için antimikrobiyal aktivite sonuçlarında zon oluşumu gözlenmemiştir.

### 3.5 Cam Boncuk ile Ekstraksiyon Sonuçları

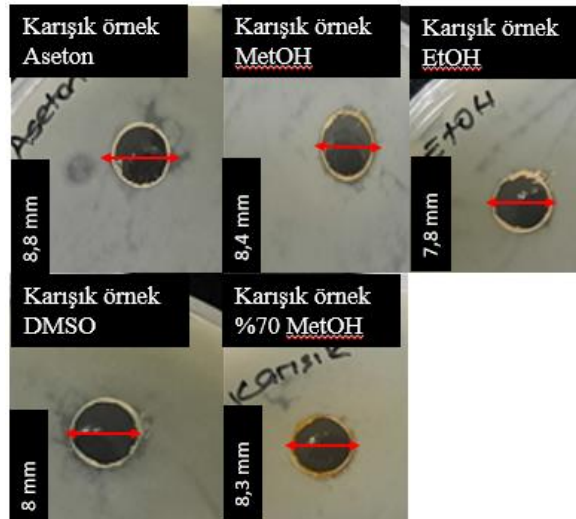
Kurutulmuş mikroalg örneklerinden *Spirulina* sp. ve Karışık örnek (Uluabat gölünden plankton çekimi ile toplanan ve içeriğinde siyanobakteri ve diğer alg gruplarının olduğu örnek.) kullanılarak cam boncuklar ile hekzan, aseton, metanol, etanol ve su kullanılarak ekstraksiyonları yapılmıştır. Antimikrobiyal analizleri için agar kuyucuk yöntemi kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan suşlar *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Clavibacter michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Penicilium*'dur. *Spirulina* sp. ve karışık örneklerinde oluşan zon görüntüleri Şekil 3.22 ve 3.28 arasında verilmiştir. Zon çapları kumpas ile ölçülmüş ve değerler Çizelge 3.6 ve 3.7 'de verilmiştir. Ölçülen zon çapları solventlerin %100'lük oranlarında saptanmıştır.

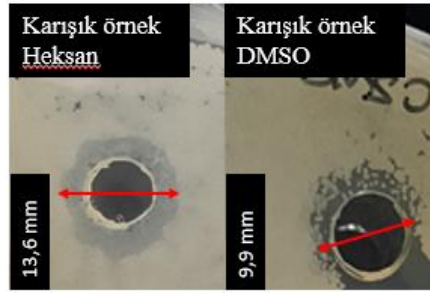
Karışık örneklerde *Escherichia coli* ATCC 25922 bakterisinde Aseton 8,3 mm, MetOH 8,4 mm, EtOH 8,3 mm, DMSO 8,8 mm, %70 MetOH 8,3 mm; *Bacillus cereus* ATCC 10876 bakterisinde Aseton 8,8 mm, MetOH 8,4 mm, EtOH 7,8 mm, DMSO 8 mm, %70 MetOH 8,3 mm; *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* bakterisinde %70 MetOH 8,6 mm; *Clavibacter michiganensis* bakterisinde Hekzan 13,6mm, DMSO 9,9 mm; *Candida albicans* ATCC 10231 mantarında %70 MetOH 9,29; *Aspergillus niger* ATCC 16404 mantarında DMSO 12,23 mm zon çapları ölçülmüştür.



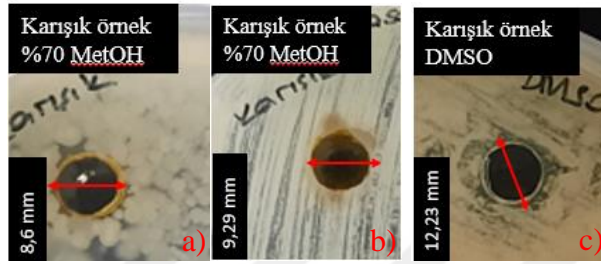
**Şekil 0.41** : Cam boncuklar ile elde edilen Karışık örnek ekstraktların *Escherichia coli* bakterisinde oluşan zon görüntüleri.



**Şekil 0.42** : Cam boncuklar ile elde edilen Karışık örnek ekstraktların *Bacillus cereus* bakterisinde oluşan zon görüntüleri.



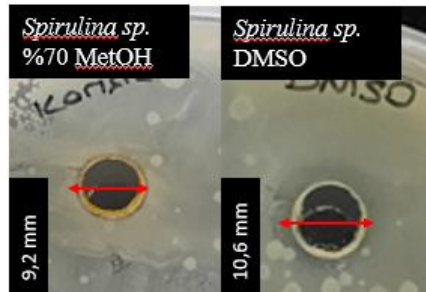
**Şekil 0.43** : Cam boncuklar ile elde edilen Karışık örnek ekstraktların *Clavibacter michiganensis* bakterisinde oluşan zon görüntüleri.



**Şekil 0.44** : Cam boncuklar ile elde edilen Karışık örnek ekstraktların mantarlarda oluşan zon görüntüleri.<sup>9</sup>

**Çizelge 0.14** : Cam boncuk ile elde edilen Karışık örnek ekstraktların agar kuyucuk ile belirlenen zon çapları (mm).

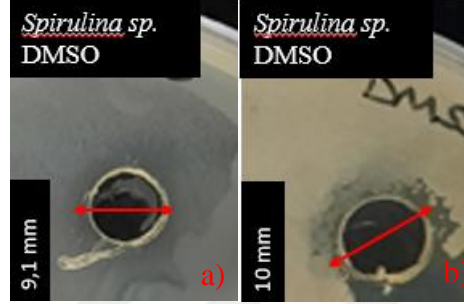
Bakteri ve Mantarlar	Hekzan	Aseton	MetOH	EtOH	DMSO	%70MetOH
<i>Escherichia coli</i>	-	8,3	8,4	8,3	8,8	8,3
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	8,8	8,4	7,8	8	8,3
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i>	-	-	-	-	-	8,6
<i>pv. Tomato</i>						
<i>Clavibacter michiganensis</i>	13,6	-	-	-	9,9	-
<i>Penicilium sp.</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	9,29
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-	12,23	-



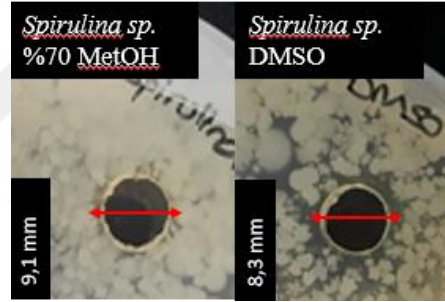
**Şekil 0.45** : Cam boncuklar ile elde edilen *Spirulina sp.* örnek ekstraktların *Escherichia coli* bakterisinde oluşan zon görüntüleri.

<sup>9</sup> a) *Pseudomonas syringae pv. Tomato* b) *Candida albicans* c) *Aspergillus niger*

*Spirulina* sp. örneklerinde *Escherichia coli* ATCC 25922 bakterisinde DMSO 9,2 mm, %70 MetOH 10,6 mm; *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 DMSO 9,1 mm; *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* DMSO 9,1 mm, %70 MetOH 8,3 mm; *Clavibacter michiganensis* bakterisinde DMSO 10 mm zon çapları ölçülmüştür. *Bacillus cereus* ATCC 10876 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 tüm solventlerle yapılan ekstraksiyonlarda zon oluşumlarına rastlanmamıştır.



**Şekil 0.46** : Cam boncuklar ile elde edilen *Spirulina* sp. örnek ekstraktların bakterilerde oluşan zon görüntüleri.<sup>10</sup>



**Şekil 0.47** : Cam boncuklar ile elde edilen *Spirulina* sp. ekstraktların *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* bakterisinde oluşan zon görüntüleri.

**Çizelge 0.15** : Cam boncuk ile elde edilen *Spirulina* sp. ekstraktların agar kuyucuk ile belirlenen zon çapları (mm).

Bakteri ve Mantarlar	Hekzan	Aseton	MetOH	EtOH	DMSO	%70MetOH
<i>Escherichia coli</i>	-	-	9	-	9,2	10,6
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-	9,1	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Tomato</i>	-	-	-	-	9,1	8,3
<i>Clavibacter michiganensis</i>	-	-	-	-	10	-
<i>Penicilium</i> sp.	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-	-	-

<sup>10</sup> a) *Salmonella typhimurium* b) *Clavibacter michiganensis*

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Mikroalgler, çevre dostu ve sürdürülebilir çözümler sunma potansiyeline sahip organizmalardır. Ürettikleri biyoaktif bileşenler, mikroorganizmalara karşı etkili bir şekilde kullanılabilir ve antibiyotik direncine karşı umut vadeden bir çözüm sunmaktadır. Antibiyotiklere dirençli bakteriler, dünya genelinde önemli bir sağlık riski oluşturmaktadır. Bu nedenle, mikroalglerden elde edilen doğal antimikrobiyal bileşikler, yeni tedavi seçenekleri sunma potansiyeline sahiptir (Zuorro ve diğ, 2024). Tarımda biyopestisit olarak kullanılabilen bu biyoaktif bileşikler, direnç gelişimini azaltarak uzun vadeli fayda sağlayabilir. Ayrıca, doğada parçalanabildikleri için kimyasal kalıntı bırakmaz ve tarım alanlarında çevresel zararları en aza indirir (Bhattacharjee, 2022). Bu çalışmada, mikroalglerden elde edilen ekstraktların antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmış ve tarımsal zararlılara karşı biyopestisit potansiyelleri incelenmiştir.

Araştırmada, Bursa Teknik Üniversitesi Alg ve Siyanobakteri Kültür Koleksiyonu (AQUAMEB) kapsamındaki 32 mikroalg suşunun özütlerinin antimikrobiyal etkileri değerlendirilmiştir. Tatlı su, deniz ve tuzlu ortamlardan izole edilen mikroalglerin biyoaktif bileşenleri, soxhlet, prob sonikasyon, ultrasonik banyo ve cam boncuk gibi ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilmiş; metanol, etanol, aseton, DMSO ve hekzan gibi çözücüler kullanılmıştır. Ekstraksiyon sonrasında, antimikrobiyal aktiviteyi değerlendirmek amacıyla Agar difüzyon (agar disk difüzyon, agar kuyu difüzyon) ve Broth mikrodilüsyon (minimum inhibitör konsantrasyon (MİK)) yöntemleri uygulanmıştır. Bu yöntemlerin her biri, farklı avantaj ve sınırlamalarıyla çalışmanın sonuçlarına katkı sağlamıştır.

Agar disk difüzyon yöntemi, antimikrobiyal aktivite taramasında yaygın olarak kullanılan, görsel olarak değerlendirme yapılabilen hızlı bir yöntemdir (Parsaeimehr ve Lutz, 2016). Farklı çözücü ve ekstrakt türlerinin karşılaştırılmasında uygun bir yöntem olmasına rağmen, lipofilik bileşiklerin düşük çözünürlüğü ve difüzyon kapasitesi gibi sınırlamaları nedeniyle yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçlar verebilir. Ayrıca, uçucu bileşiklerin buharlaşması veya laboratuvarlar arası

standardizasyon zorlukları da bu yöntemin dezavantajları arasındadır (Eloff, 2019; van Vuuren, 2008). Öte yandan, MİK değerleri elde etmek için kullanılan mikroseyrelti testi, kantitatif ve tekrarlanabilir sonuçlar sunar ve farklı araştırma grupları arasında karşılaştırma yapmayı mümkün kılar. Bu yöntemde ayrıca, p-iyodonitrotetrazolium (INT) menekşesi kullanılarak büyüme gözlemlenebilir hale getirilir (Eloff, 1998; Guiry, 2012).

Araştırma sonuçları, mikroalglerin özellikle gram-negatif bakterilere karşı belirgin bir inhibitör etkiye sahip olduğunu göstermiştir. *Spirulina* sp. AQUAMEB-56, *Scenedesmus* sp. AQUAMEB-57 ve *Kirchneriella* sp. AQUAMEB-55 türlerinden elde edilen metanol bazlı ekstraktlar, *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium* gibi gram-negatif bakteriler üzerinde düşük minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri ile güçlü bir antimikrobiyal aktivite sergilemiştir. Bu bulgu, metanolün polar yapısı sayesinde fenolik bileşiklerin ve lipitlerin etkin bir şekilde ekstrakte edilmesiyle ilişkilendirilmiştir. Literatürde de metanolün mikroalglerden biyoaktif bileşiklerin çıkarılmasında en etkili çözücülerden biri olduğu belirtilmiştir (Stirk ve van Staden, 2022).

Gram-pozitif bakterilere karşı etkinlik daha sınırlı olmakla birlikte, *Bacillus cereus* üzerinde belirgin bir aktivite gözlemlenmiştir. Özellikle *Scenedesmus* sp. AQUAMEB-57 ve *Chlorophyta* AQUAMEB-59 türleri, bu bakteriye karşı en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Bununla birlikte, *Staphylococcus aureus* ve *Clavibacter michiganensis* gibi türlerde etkinin daha sınırlı olduğu belirlenmiştir. Bu durum, gram-pozitif bakterilerin kalın peptidoglikan tabakalarının, biyoaktif bileşiklerin hücre zarına nüfuz etmesini zorlaştırması neden ile açıklanabilir (Eloff, 2019).

Mikroalg ekstraktlarının *Candida albicans*, *Aspergillus niger* ve *Penicillium* sp. gibi mantar patojenlerine karşı sınırlı bir etkinlik gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu durum, mantar hücre duvarlarının yapısal özellikleri nedeniyle mikroalg kaynaklı bileşiklere daha az duyarlı olabileceğini göstermekte ve antifungal etkinliklerin ekstraksiyon yöntemleri ile hedef bileşiklerin polaritesine bağlı olarak değişebildiğini ifade eden literatürle uyum göstermektedir (Kim ve diğ., 2006). Ayrıca, *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, *Phytophthora nicotianae*, *Verticillium dahliae* gibi tarım zararlısı mantar türleriyle yapılan çalışmalarda uygun bir negatif kontrol ajanı eksikliği nedeniyle deneyler sınırlı kalmıştır. Dolayısıyla, mantar patojenlerine karşı

etkinliğin artırılabilmesi için farklı çözücü kombinasyonları ve ekstraksiyon stratejilerinin araştırılması gerekmektedir.

Mikroalglerin biyoaktif bileşiklerinin antibakteriyel potansiyelinin türlere özgü olduğunu ve özellikle gram-negatif bakterilere karşı etkili olabileceği bu çalışma ile ortaya konmuştur. *Spirulina* sp. AQUAMEB-56 ve *Scenedesmus* sp. AQUAMEB-57'nin metanol bazlı ekstraktlarının *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium* için MİK değerlerinin <0,625 mg/mL olduğunu tespit edilmiştir. Bu değerler, literatürde Eloff'un (2019) mikroalg ekstraktlarının antimikrobiyal aktivite düzeylerini değerlendirdiği sınıflamayla uyumludur; MİK <1 mg/mL olduğunda aktivite "güçlü" olarak sınıflandırmıştır. Bulgular, mikroalglerin gram-pozitif bakterilere karşı sınırlı, ancak gram-negatif bakterilere karşı oldukça etkili olduğunu göstermiştir.

Mikroalg ekstraktlarının tarımsal zararlılara karşı biyopestisit olarak kullanımı, umut verici sonuçlar ortaya koymuştur. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ve *Clavibacter michiganensis* tarım zararlısı bakterilerine karşı gözlemlenen etkiler, bu bileşiklerin tarım alanında kullanım potansiyelini göstermektedir. *Spirulina* sp. AQUAMEB-56'nın *Clavibacter michiganensis* üzerinde 14,29 mm'lik inhibisyon zonu oluşturması, mikroalglerin tarımsal zararlılara karşı biyopestisit olarak kullanılabilirliği için güçlü bir veri sunmaktadır. *Chlorophyta* AQUAMEB-59 türünden elde edilen metanol bazlı ekstraktların *Salmonella typhimurium* üzerinde geniş bir inhibisyon zonu oluşturduğu (25,21 mm) tespit edilmiştir. Bu durum, mikroalglerden elde edilen lipit ve fenolik bileşiklerin gram-negatif bakterilerin hücre zarı lipid tabakalarını bozması kaynaklı oluşabilir (Butler ve Carter-Franklin, 2004; Ördög ve diğ., 2004).

*Phaeodactylum tricornutum* hücre lizatlarından elde edilen eikosapentaenoik asidin (Ward ve Singh, 2005), heksadekatrienoik asidin (Santoyo ve diğ., 2009) hem gram-pozitif (+) hem de gram-negatif (-) bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite sergilediği bildirilmiştir. Bu yağ asitlerinin, hücre zarlarını hedefleyerek zar hasarına, hücre içeriğinin sızmasına ve besin alımının azalmasına neden olabilir (Ghasemi ve diğ., 2004). *H. pluvialis* özütleri (bütanoik ve metil laktik asit) ise kısa zincirli yağ asitleri sayesinde *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* üzerinde etkili bulunmuştur (Smith ve diğ., 2009). Yağ asitlerinin etki mekanizmaları tam olarak bilinmese de zar hasarının yanı sıra peroksidatif süreçler de olası mekanizmalar arasındadır (Desbois ve diğ., 2009).

Çalışmamızda, mikroalglerden elde edilen biyoaktif bileşiklerin tarımsal patojenlere karşı etkinliği, literatürde bildirilen bulgularla uyumludur. Örneğin, *Chlorophyta* grubuna ait türlerden elde edilen ekstraktların tarımsal patojenlere karşı gösterdiği etkinlik, önceki araştırmalarla da doğrulanmıştır (Herrero ve diğ., 2006; Ambrico ve diğ., 2020). Bu doğal bileşiklerin patojenlerin antibiyotik direnci geliştirme olasılığını azaltarak sürdürülebilir bir çözüm sunduğu vurgulanmaktadır. Fenolik bileşikler ve polisakkaritler gibi biyokimyasal yapılar, antibakteriyel özellikleriyle kimyasal pestisitlerin kullanımını sınırlama potansiyeline sahiptir.

Çalışmada, solventlerin toksisite testleri sonucunda, metanol, etanol ve asetonun %100 konsantrasyonda gram-pozitif (+) ve gram-negatif (-) bakteriler ile mantarlar üzerinde belirgin toksik etkiler gösterdiği saptanmıştır. Buna karşın, hekzan ve DMSO solventlerinin herhangi bir toksik etki göstermediği fakat antimikrobiyal aktiviteye de anlamlı bir katkı sağlamadığı görülmüştür. Metanol, polar yapısı sayesinde mikroalglerden biyoaktif bileşenlerin etkin bir şekilde çıkarılmasını sağlamış ve %70 metanol-su karışımları, hem ekstraksiyon verimliliği hem de toksisiteyi azaltma açısından optimum sonuçlar vermiştir. Literatürde, polar çözücüler (ör. metanol ve etanol) biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunda yüksek verim sağlarken, lipofilik bileşiklerin düşük çözünürlükleri nedeniyle daha az etkinlik gösterdiği belirtilmiştir (Herrero ve diğ., 2006).

Çözücü seçiminin yanı sıra, kullanılan ekstraksiyon yöntemleri de biyoaktif bileşiklerin etkin bir şekilde elde edilmesinde önemli bir rol oynamıştır. Çalışmada, %70 metanol-su karışımının yüksek ekstraksiyon verimi ve toksisiteyi azaltma açısından en uygun çözücü olduğu sonucuna varılmıştır. Ultrasonik banyo yöntemi, fenolik bileşikler ve yağ asitlerinin çözünmesini kolaylaştırarak hem verim hem de antimikrobiyal aktivite açısından en başarılı yöntem olarak belirlenmiştir. Soxhlet yöntemi saf ekstraktlar sağlama avantajına sahip olmakla birlikte, uzun işlem süreleri ve yüksek solvent kullanımı nedeniyle çevresel ve ekonomik açıdan dezavantajlı bulunmuştur. Cam boncuk ve prob sonikasyon yöntemleri ise düşük verimlilikleri nedeniyle sınırlı katkı sağlamıştır. Bu bulgular, çözücü polaritesinin ve ekstraksiyon yöntemlerinin biyoaktif bileşiklerin elde edilmesindeki önemini vurgulamaktadır.

Mikroalglerden polar ve polar olmayan çözücülerle hazırlanan ekstraktların antimikrobiyal aktiviteleri, çözücünün kimyasal bileşimiyle uyumuna bağlı olarak farklılık göstermiştir. Polar çözücüler, özellikle metanol ve metanol-su karışımları,

gram-negatif bakterilere karşı güçlü inhibitör aktivite sergilemiştir (Plaza ve diğ., 2012). *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium* testlerinde, bu çözücülerle hazırlanan ekstraktların geniş inhibisyon zonları oluşturduğu ve yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ancak, polar olmayan çözücülerle elde edilen ekstraktlar genelde düşük verim sağlamakla birlikte, nadiren de olsa etkili antimikrobiyal bileşiklerin eldesini sağlayabilmiştir (Albayati, 2020). Polar olmayan çözücülerin düşük verim elde edilmesine rağmen, etkili antimikrobiyal ajanların keşfi için önemli fırsatlar sunduğu belirtilmiştir (Kellam ve Walker, 1989). Ara polar çözücüler (dietyl eter ve kloroform gibi), genelde daha geniş spektrumlu aktivite sergilerken, aseton ile yapılan ekstraktlarda antimikrobiyal aktivite gözlemlenmemiştir (Cannell ve diğ., 1988).

Bu çalışmanın en önemli bulgularından biri, mikroalglerin biyopestisit olarak tarımsal zararlılarla mücadelede etkili bir alternatif sunmasıdır. Çevresel koşullara uyum sağlama kapasiteleri, hızlı büyüme ve biyokütle üretme yetenekleri, mikroalgleri kimyasal pestisitlere kıyasla daha az toksik ve çevre dostu bir seçenek haline getirmektedir. Mikroalg ekstraktlarının zararlı organizmalar üzerinde seçici bir etki göstermesi, faydalı mikroorganizmalar üzerinde olumsuz etkilerinin olmaması ve toprak mikrobiyotasını zenginleştirerek tarımsal verimliliği artırma potansiyelleri, sürdürülebilir tarım uygulamaları açısından büyük bir avantaj sunmaktadır (Abdel-Raouf ve diğ., 2012). Ayrıca, mikroalglerden elde edilen biyopestisitlerin hem tarımsal verimliliği artırabileceği hem de çevre kirliliğini azaltabileceği literatürde belirtilmiştir (Köhler ve Triebkorn, 2013; Costa ve diğ., 2019).

Dünya çapında yaklaşık 100.00 mikroalg türünden yalnızca 44.000'i tanımlanmış olup, bu türlerin çok az bir kısmı detaylı şekilde incelenmiştir (Guiry, 2012). Evrimsel geçmişleri ve ekosistemlerdeki geniş yayılımları, mikroalglerin çeşitli biyoaktif metabolitler üretme potansiyelini desteklemektedir. Günümüze kadar makroalglerden elde edilen biyopestisitler üzerine yoğunlaşmış olsa da mikroalgler, yeni biyopestisitlerin keşfi için büyük bir kaynak sunmaktadır (Asimakis ve diğ., 2022).

Mikroalglerden elde edilen biyopestisitler, sürdürülebilir ve çevre dostu bir alternatif olarak tarımsal ve tıbbi uygulamalarda önemli bir potansiyele sahiptir. Ancak bu potansiyelin tam anlamıyla hayata geçirilebilmesi ve ticarileştirilebilmesi için kapsamlı araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle biyoaktif bileşiklerin

kimyasal tanımlamaları, saha çalışmaları, toksikolojik analizler ve ekonomik değerlendirmeler öncelikli gereksinimler arasında yer almaktadır. Mikroalglerin geniş ölçekli üretimi, antimikrobiyal ve biyopestisit etkilerinden sorumlu biyoaktif bileşiklerin kimyasal yapılarının detaylı incelenmesi ve ekonomik analizlerin gerçekleştirilmesi, bu potansiyelin tam anlamıyla ortaya çıkarılmasına katkı sağlayacaktır. Bununla birlikte, söz konusu potansiyelin hayata geçirilebilmesi için bazı eksikliklerin giderilmesi ve belirli alanlarda iyileştirmeler yapılması gerekmektedir.

- Ekstraksiyon yöntemlerinin iyileştirilmesi: Ultrasonik banyo yöntemi yüksek verim sağlamakla birlikte, farklı solvent kullanımları ile optimize edilmeli ve büyük ölçekli uygulamalara adapte edilmesi gerekmektedir.
- Mantar patojenlerine karşı etkinlik: Mantar patojenleri üzerinde sınırlı etkinlik gözlemlenmiştir. Bu doğrultuda, antifungal etkilerin artırılması amacıyla yeni ekstraksiyon yöntemleri veya kombinasyon stratejileri geliştirilmelidir.
- Saha çalışmaları: Mikroalg kaynaklı bileşiklerin laboratuvar koşullarında sağladığı etkiler, saha ortamında test edilerek gerçek yaşam koşullarında verimliliği değerlendirilmelidir. Özellikle tarımsal zararlılara karşı biyopestisitlerin etkililiği ve dayanıklılığı daha geniş ölçekte araştırılmalıdır.
- Toksikolojik ve ekonomik analizler: Mikroalg ekstraktlarının toksikolojik özellikleri, insan sağlığı ve çevreye olabilecek etkileri daha derinlemesine araştırılmalıdır. Bunun yanı sıra, üretim maliyetlerini azaltmaya yönelik ekonomik analizlerin yapılması gerekmektedir.
- Biyoaktif bileşiklerin tanımlanması: Antimikrobiyal ve biyopestisit etkilerinden sorumlu biyoaktif bileşiklerin kimyasal yapıları detaylı olarak incelenmeli ve işlev mekanizmaları aydınlatılmalıdır.
- Yeni mikroalg türlerinin araştırılması: Çalışmada incelenen türlerin dışında, diğer mikroalg türlerinin biyoaktif bileşik üretim potansiyelleri araştırılmalı ve biyoçeşitliliğin sağladığı fırsatlar değerlendirilebilmelidir.

Gelecekte yapılacak çalışmalar, mikroalglerden elde edilen bileşiklerin ekonomik değerlendirmelerinin yanı sıra biyopestisit ve antimikrobiyal ajan olarak daha geniş bir uygulama yelpazesinde kullanılmasını mümkün kılabilir. Bu çalışmalar, mikroalglerin yalnızca tarımsal zararlılarla mücadelede değil, aynı zamanda ekolojik

sürdürülebilirlik ve insan sağlığını koruma hedeflerinde de önemli bir kaynak olarak değerlendirilmesini sağlayacaktır (Lourenço-Lopes ve diğ., 2020).

Sonuç olarak, bu çalışma, mikroalglerin antimikrobiyal ve biyopestisit olarak geliştirilme potansiyelini ortaya koymakta ve sürdürülebilir, çevre dostu bir alternatif olarak önemli bir bilimsel temel sunmaktadır. Mikroalglerden elde edilen biyoaktif bileşikler, tarımsal zararlılarla mücadelede çevreye zarar veren kimyasal pestisitlere alternatif oluşturabilir, tarım verimliliğini artırabilir ve antibiyotik direncinin yayılmasını engelleyebilir. Düşük toksisiteleri, yüksek biyobozunurluk seviyeleri ve çevresel etkilerinin az olması, mikroalgleri sürdürülebilir tarım sistemlerinin vazgeçilmez bir bileşeni yapma potansiyeline sahiptir. Ayrıca, bu bileşiklerin toprak mikrobiyotasını zenginleştirerek toprak sağlığını iyileştirme, bitki büyümesini teşvik etme ve besin döngüsüne katkıda bulunma gibi ekolojik faydalar sağlayabileceği vurgulanmaktadır (Abdel-Raouf ve diğ., 2012).

Mikroalglerin biyopestisit olarak kullanılmasındaki en büyük avantaj, düşük toksisiteleri sayesinde insan sağlığı ve çevre üzerinde olumsuz etkilere yol açmamalarıdır. Bu özellikler, mikroalgleri kimyasal pestisitlere kıyasla daha güvenilir ve çevre dostu bir seçenek haline getirmektedir.

#### **4.1 Çalışmanın Uygulama Alanı**

Mikrobiyal aktivite gösteren ekstraktlar tarım zararlılarına karşı kullanılarak tarımsal verimliliğin sağlanabilmesi için katkı sağlayacaktır. Mikroalglerden elde edilen biyopestisitler, çeşitli alanlarda kullanılarak farklı zararlı organizmalarla mücadele de sağlayabilir. Mikroalglerden elde edilen biyopestisitlerin yaygın olarak kullanıldığı çalışma alanları:

1. Tarımsal Zararlılar: Tarımsal ürünlerin zararlı böcekleri, mantarları, bakterileri ve nematodları gibi zararlı organizmalarla mücadelede kullanılabilir. Tarımsal ürünlerin zararlılarla mücadelesinde kimyasal pestisitlere alternatif olarak çevre dostu tarım uygulamalarını teşvik edebilir.
2. Su Ürünlerinin Yetiştirilmesi: Su ürünleri yetiştiriciliği alanında, mikroalgler sucul organizmaların zararlılarına karşı biyolojik mücadele aracı olarak kullanılabilir. Ayrıca, yetiştirme sistemlerinde zararlı organizmaların

kontrolünü destekleyerek su ürünleri üretiminde daha sağlıklı ve sürdürülebilir koşulların sağlanmasına katkıda bulunabilir.

3. Bitki Koruyucu Ürünler: Bitki koruma ürünleri olarak da kullanılabilir. Bitki hastalıkları ve zararlılarına karşı etkili bir koruma sağlayabilirler ve bitkilerin büyümesini ve verimliliğini artırabilirler.
4. Organik Tarım: Organik tarım uygulamalarında da kullanılabilir. Organik tarımın temel prensiplerine uygun olan bu biyopestisitler, kimyasal gübre ve pestisit kullanımını azaltarak doğal kaynakların korunmasına katkı sağlayabilirler.
5. Endüstriyel ve Eysel Alanlar: Endüstriyel ve evsel alanlarda zararlı organizmaların kontrolünde kullanılabilirler. Örneğin, ev bahçelerinde veya endüstriyel alanlarda zararlı böceklerin kontrolünde kullanılabilirler.

Bu alanlar, mikroalglerden elde edilen biyopestisitlerin yaygın olarak kullanılabilmesi için bazı çalışma alanlarıdır. Ancak, bu biyopestisitlerin etkinliği ve güvenliği üzerine daha fazla araştırma ve ürünlerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Çünkü mikroalgal ekstraktların etkileri ve uygulama yolları henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Bu duruma rağmen mikroalgal ekstraktların antimikrobiyal aktiviteleri, alternatif bir tedavi seçeneği olarak kabul görmektedir.

## KAYNAKLAR

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A., Ibraheem, I.** (2012). Agricultural importance of algae. *African Journal of Biotechnology*, 11(54), 11648–11658.
- Andersen, R. A.** (Ed.). (2005). *Algal culturing techniques*. Elsevier.
- Albayati, M. A. F.** (2020). Bazı makroalg türlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi.
- Alsenani, F., Tupally, K. R., Chua, E. T., Eltanahy, E., Alsufyani, H., Parekh, H. S., Schenk, P. M.** (2020). Evaluation of microalgae and cyanobacteria as potential sources of antimicrobial compounds. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 28(12), 1834–1841.
- Ambrico, A., Trupo, M., Magarelli, R., Balducchi, R., Ferraro, A., Hristoforou, E., Marino, T., Musmarra, D., Casella, P., Molino, A.** (2020). Effectiveness of dunaliella salina extracts against bacillus subtilis and bacterial plant pathogens. *Pathogens*, 9(8), 1–14.
- Arora, N. K.** (2019). Impact of climate change on agriculture production and its sustainable solutions. *Environmental Sustainability 2019 2:2*, 2(2), 95–96.
- Asimakis, E., Shehata, A. A., Eisenreich, W., Acheuk, F., Lasram, S., Basiouni, S., Emekci, M., Ntougias, S., Taner, G., May-Simera, H., Yilmaz, M., Tsiamis, G.** (2022). Algae and Their Metabolites as Potential Bio-Pesticides. *Microorganisms*, 10(2), 1–33.
- Bhattacharjee, M. B.** (2022). Biopesticides from algae and their potential for sustainable agriculture and environmental protection.
- Belwal, T., Chemat, F., Venskutonis, P. R., Cravotto, G., Jaiswal, D. K., Bhatt, I. D., Devkota, H. P., Luo, Z.** (2020). Recent advances in scaling-up of non-conventional extraction techniques: Learning from successes and failures. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 127, 115895.
- Bidyarani, N., Prasanna, R., Babu, S., Hossain, F., Saxena, A. K.** (2016). Enhancement of plant growth and yields in Chickpea (*Cicer arietinum L.*) through novel cyanobacterial and biofilmed inoculants. *Microbiological Research*, 188–189, 97–105.
- Biondi, N., Piccardi, R., Margheri, M. C., Rodolfi, L., Smith, G. D., Tredici, M. R.** (2004). Evaluation of Nostoc strain ATCC 53789 as a potential source of natural pesticides. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3313–3320.
- Bouhlal, R., Riadi, H., Bourgougnon, N.** (2013). Antibacterial Activity of the Extracts of Rhodophyceae From the Atlantic and the Mediterranean Coasts of Morocco. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food*

*Sciences*, 2(6), 2431–2439.

- Butler, A., Carter-Franklin, J. N.** (2004). The role of vanadium bromoperoxidase in the biosynthesis of halogenated marine natural products. *Natural Product Reports*, 21(1), 180–188.
- Cannell, R. J. P., Kellam, S. J., Owsianka, A. M., Walker, J. M.** (1988). Results of a large screen of microalgae of the production of protease inhibitors. *Planta Medica*, 54(1), 10–14.
- Cardozo, K. H. M., Guaratini, T., Barros, M. P., Falcão, V. R., Tonon, A. P., Lopes, N. P., Campos, S., Torres, M. A., Souza, A. O., Colepicolo, P., Pinto, E.** (2007). Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(1–2), 60–78.
- Carson, R.** (2015). Silent Spring. *Silent Spring, Thinking About the Environment*, 150–155.
- Carvalho, F. P.** (2017). Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security*, 6(2), 48–60.
- Cheung, R. C. F., Wong, J. H., Pan, W. L., Chan, Y. S., Yin, C. M., Dan, X. L., Wang, H. X., Fang, E. F., Lam, S. K., Ngai, P. H. K., Xia, L. X., Liu, F., Ye, X. Y., Zhang, G. Q., Liu, Q. H., Sha, O., Lin, P., Ki, C., Bekhit, A. A., ... Ng, T. B.** (2014). Antifungal and antiviral products of marine organisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(8), 3475–3494.
- Cohen, Z.** (2002). Chemicals from Microalgae. İçinde *Chemicals from Microalgae*. CRC Press.
- Copping, L. G., Menn, J. J.** (2000). Biopesticides: A review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science*, 56(8), 651–676.
- Costa, J. A. V., Freitas, B. C. B., Cruz, C. G., Silveira, J., Morais, M. G.** (2019). Potential of microalgae as biopesticides to contribute to sustainable agriculture and environmental development. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 54(5), 366–375.
- de Felício, R., de Albuquerque, S., Young, M. C. M., Yokoya, N. S., Debonsi, H. M.** (2010). Trypanocidal, leishmanicidal and antifungal potential from marine red alga *Bostrychia tenella* J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52(5), 763–769.
- Dembitsky, V. M., Srebnik, M.** (2002). Natural halogenated fatty acids: their analogues and derivatives. *Progress in Lipid Research*, 41(4), 315–367.
- Desbois, A. P., Mearns-Spragg, A., Smith, V. J.** (2009). A fatty acid from the diatom *Phaeodactylum tricorutum* is antibacterial against diverse bacteria including multi-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Marine Biotechnology*, 11(1), 45–52.
- Dökümcüoğlu, V. E.** (2018). İzmir Çamaltı Tuzlasından İzole Edilen Halofilik Mikroalgelerin Moleküler ve Morfolojik Taksonomisi ile Stres

Faktörlerine Fizyolojik Yanıtları. *Bursa Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, 6(1), 1–8.

- Ejidike, I. P.** (2018). Cu (II) Complexes of 4-[(1 E)-N-{2-[(Z)-Benzylidene-amino] ethyl} ethanimidoyl] benzene-1, 3-diol Schiff base: synthesis, spectroscopic, in-vitro antioxidant, antifungal and antibacterial studies. *Molecules*, 23(7), 1581.
- Elcik, H., Çakmakçı, M.** (2017). Mikroalg üretimi ve mikroalglerden biyoyakıt eldesi. *Journal of the Faculty of Engineering & Architecture of Gazi University/Gazi Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 32(3).
- Eloff, J. N.** (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*, 64(8), 711–713.
- Eloff, Jacobus Nicolaas.** (2019). Avoiding pitfalls in determining antimicrobial activity of plant extracts and publishing the results. *BMC complementary and alternative medicine*, 3(19), 1–8.
- Encarnaç o, T., Pais, A. A. C. C., Campos, M. G., Burrows, H. D.** (2015). Cyanobacteria and microalgae: A renewable source of bioactive compounds and other chemicals. *Science Progress*, 98(2), 145–168.
- Fayaz, T., Renuka, N., Ratha, S. K.** (2024). Antibiotic occurrence, environmental risks, and their removal from aquatic environments using microalgae: Advances and future perspectives. *Chemosphere*, 349, 140822.
- Ferreira, A., Melkonyan, L., Carapinha, S., Ribeiro, B., Figueiredo, D., Avetisova, G., Gouveia, L.** (2021). Biostimulant and biopesticide potential of microalgae growing in piggery wastewater. *Environmental Advances*, 4(April), 100062.
- Ghasemi, Y., Tabatabaei Yazdi, M., Shafiee, A., Amini, M., Shokravi, S., Zarrini, G.** (2004). Parsiguine, a novel antimicrobial substance from *Fischerella ambigua*. *Pharmaceutical Biology*, 42(4–5), 318–322.
- Gonç alves, A. L.** (2021). The use of microalgae and cyanobacteria in the improvement of agricultural practices: A review on their biofertilising, biostimulating and biopesticide roles. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(2), 1–21.
- Guiry, M. D.** (2012). How many species of algae are there? *Journal of Phycology*, 48(5), 1057–1063.
- Guzmán, F., Wong, G., Román, T., Cárdenas, C., Alv rez, C., Schmitt, P., Albericio, F., Rojas, V.** (2019). Identification of Antimicrobial Peptides from the Microalgae *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butcher and Bactericidal Activity Improvement. *Marine Drugs*, 17(8), 1–19.
- Hamed, S. M., Abd El-Rhman, A. A., Abdel-Raouf, N., Ibraheem, I. B. M.** (2018). Role of marine macroalgae in plant protection & improvement for sustainable agriculture technology. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(1), 104–110.
- Hannon, M., Gimpel, J., Tran, M., Rasala, B., Mayfield, S.** (2010). Biofuels from algae: Challenges and potential. *Biofuels*, 1(5), 763–784.

- Hernández-Carlos, B., Gamboa-Angulo, M. M.** (2011). Metabolites from freshwater aquatic microalgae and fungi as potential natural pesticides. *Phytochemistry Reviews*, 10(2), 261–286.
- Herrero, M., Ibáñez, E., Cifuentes, A., Reglero, G., Santoyo, S.** (2006). *Dunaliella salina* Microalga Pressurized Liquid Extracts as Potential Antimicrobials. *Journal of Food Protection*, 69(10), 2471–2477.
- Jokel, M., Salazar, J., Chovancek, E., Sirin, S., Allahverdiyeva, Y.** (2023). Screening of several microalgae revealed biopesticide properties of *Chlorella sorokiniana* against the strawberry pathogen *Phytophthora cactorum*. *Journal of Applied Phycology*, 35(6), 2675–2687.
- Kayış, U.** (2019). Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları. *Aydın Sağlık Dergisi*, 5(1), 1-12.
- Kellam, S. J., Walker, J. M.** (1989). Antibacterial activity from marine microalgae in laboratory culture. *British Phycological Journal*, 24(2), 191–194.
- Kheirfam, H., Sadeghi, S. H., Homae, M., Zarei Darki, B.** (2017). Quality improvement of an erosion-prone soil through microbial enrichment. *Soil and Tillage Research*, 165, 230–238.
- Kim, J.-D.** (2006). Screening of Cyanobacteria (Blue-Green algae) from Rice Paddy Soil for Antifungal Activity against Plant Pathogenic Fungi. *Mycobiology*, 34(3), 138.
- Köhl, J., Kolnaar, R., Ravensberg, W. J.** (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. *Frontiers in Plant Science*, 10, 454982.
- Köhler, H. R., Triebkorn, R.** (2013). Wildlife Ecotoxicology of Pesticides: Can We Track Effects to the Population Level and Beyond? *Science*, 341(6147), 759–765.
- Kulik, M. M.** (1995). The potential for using cyanobacteria (blue-green algae) and algae in the biological control of plant pathogenic bacteria and fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 101(6), 585–599.
- Lourenço-Lopes, C., Fraga-Corral, M., Jimenez-Lopez, C., Pereira, A. G., Garcia-Oliveira, P., Carpena, M., Prieto, M. A., Simal-Gandara, J.** (2020). Metabolites from Macroalgae and Its Applications in the Cosmetic Industry: A Circular Economy Approach. *Resources 2020*, Vol. 9, Page 101, 9(9), 101.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., Clark, D. P.** (2008). Brock biology of microorganisms 12th edn. *Int. Microbiol*, 11(1).
- Manjunath, M., Kanchan, A., Ranjan, K., Venkatachalam, S., Prasanna, R., Ramakrishnan, B., Hossain, F., Nain, L., Shivay, Y. S., Rai, A. B., Singh, B.** (2016). Beneficial cyanobacteria and eubacteria synergistically enhance bioavailability of soil nutrients and yield of okra. *Heliyon*, 2(2).
- Marks, E. A. N., Miñón, J., Pascual, A., Montero, O., Navas, L. M., Rad, C.** (2017). Application of a microalgal slurry to soil stimulates heterotrophic activity and promotes bacterial growth. *Science of The Total Environment*, 605–606, 610–617.

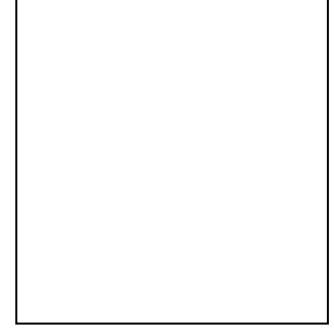
- Marrone, P. G.** (2019). Pesticidal natural products – status and future potential. *Pest Management Science*, 75(9), 2325–2340.
- Marutescu, L., Popa, M., Saviuc, C., Lazar, V., Chifiriuc, M. C.** (2017). Botanical pesticides with virucidal, bactericidal, and fungicidal activity. *New Pesticides and Soil Sensors*, 311–335.
- Matanjun, P., Mohamed, S., Mustapha, N. M., Muhammad, K., Ming, C. H.** (2008). Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo. *Journal of Applied Phycology*, 20(4), 367–373.
- Menicucci, F., Michelozzi, M., Raio, A., Tredici, M., Cencetti, G., Clemente, I., Ristori, S.** (2021). Thymol-loaded lipid nanovectors from the marine microalga *Nannochloropsis* sp. as potential antibacterial agents. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 32(February), 101962.
- Mol, I., Purushothaman, T.** (2020). *Micro-algae as bio-pesticides for the development of sustainable agriculture*. 8(6), 35–48.
- Ördög, V., Stirk, W. A., Lenobel, R., Bancířová, M., Strnad, M., Van Staden, J., Szigeti, J., Németh, L.** (2004). Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites. *Journal of Applied Phycology*, 16(4), 309–314.
- Parsaeimehr, A., Lutz, G. A.** (2016). Algae as a Novel Source of Antimicrobial Compounds: Current and Future Perspectives. Current and Future Perspectives. İçinde *Antibiotic Resistance: Mechanisms and New Antimicrobial Approaches* (Sayı March).
- Pimentel, D.** (2005). Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. *Environment, Development and Sustainability*, 7(2), 229–252.
- Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., García-Blairsy Reina, G., Herrero, M., Señoráns, F. J., Ibáñez, E.** (2010). Screening for bioactive compounds from algae. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2), 450–455.
- Plaza, Merichel, Santoyo, S., Jaime, L., Avalo, B., Cifuentes, A., Reglero, G., García-Blairsy Reina, G., Señoráns, F. J., Ibáñez, E.** (2012). Comprehensive characterization of the functional activities of pressurized liquid and ultrasound-assisted extracts from *Chlorella vulgaris*. *Lwt*, 46(1), 245–253.
- Pratt, R., Daniels, T. C., Eiler, J. J., Gunnison, J. B., Kumler, W. D., Oneto, J. F., Strait, L. A., Spoehr, H. A., Hardin, G. J., Milner, H. W., Smith, J. H. C., Strain, H. H.** (1944). Chlorellin, an antibacterial substance from *Chlorella*. *Science*, 99(2574), 351–352.
- Quadros, P. D. de, Zhalnina, K., Davis-Richardson, A. G., Drew, J. C., Menezes, F. B., Camargo, F. A. d. O., Triplett, E. W.** (2016). Coal mining practices reduce the microbial biomass, richness and diversity of soil. *Applied Soil Ecology*, 98, 195–203.
- Rachidi, F., Benhima, R., Kasmi, Y., Sbabou, L., Arroussi, H. El.** (2021). Evaluation of microalgae polysaccharides as biostimulants of tomato

plant defense using metabolomics and biochemical approaches. *Scientific Reports* 2021 11:1, 11(1), 1–16.

- Rachidi, F., Benhima, R., Sbabou, L., El Arroussi, H.** (2020). Microalgae polysaccharides bio-stimulating effect on tomato plants: Growth and metabolic distribution. *Biotechnology Reports*, 25, e00426.
- Ranglová, K., Lakatos, G. E., Câmara Manoel, J. A., Grivalský, T., Suárez Estrella, F., Ación Fernández, F. G., Molnár, Z., Ördög, V., Masojídek, J.** (2021). Growth, biostimulant and biopesticide activity of the MACC-1 *Chlorella* strain cultivated outdoors in inorganic medium and wastewater. *Algal Research*, 53(August 2020).
- Rani, K., Sridevi, V., Kumar, K. V., Harsha, N., Kumar, C. S.** (2013). *Biotechnological Approach in Biopesticides-An overview*. 55, 12936–12940.
- Richmond, A.** (Ed.). (2004). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology* (Vol. 577). Oxford: Blackwell science.
- Santoyo, S., Rodríguez-Meizoso, I., Cifuentes, A., Jaime, L., García-Blairsy Reina, G., Señorans, F. J., Ibáñez, E.** (2009). Green processes based on the extraction with pressurized fluids to obtain potent antimicrobials from *Haematococcus pluvialis* microalgae. *LWT - Food Science and Technology*, 42(7), 1213–1218.
- Saritha, M., Prasad Tollamadugu, N. V. K. V.** (2018). The status of research and application of biofertilizers and biopesticides: Global scenario. *Içinde Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*. Elsevier Inc.
- Smith, V. J., Desbois, A. P., Dyrzynda, E. A.** (2010). Conventional and Unconventional Antimicrobials from Fish, Marine Invertebrates and Micro-algae. *Marine Drugs* 2010, Vol. 8, Pages 1213-1262, 8(4), 1213–1262.
- Stirk, W. A., van Staden, J.** (2022). Bioprospecting for bioactive compounds in microalgae: Antimicrobial compounds. *Biotechnology Advances*, 59(May), 107977.
- Stolte, W., Karlsson, C., Carlsson, P., Granéli, E.** (2002). Modeling the increase of nodularin content in Baltic Sea *Nodularia spumigena* during stationary phase in phosphorus-limited batch cultures. *FEMS Microbiology Ecology*, 41(3), 211–220.
- Štumpf, S., Hostnik, G., Primožič, M., Leitgeb, M., Salminen, J. P., Bren, U.** (2020). The effect of growth medium strength on minimum inhibitory concentrations of tannins and tannin extracts against *E. coli*. *Molecules*, 25(12), 2947.
- Sudakin, D. L.** (2003). Biopesticides. *Toxicological Reviews*, 22(2), 83–90.
- Tiwari, O. N., Muthuraj, M., Bhunia, B., Bandyopadhyay, T. K., Annapurna, K., Sahu, M., Indrama, T.** (2020). Biosynthesis, purification and structure-property relationships of new cyanobacterial exopolysaccharides. *Polymer Testing*, 89(April), 106592. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2020.106592>.

- Toribio, A. J., Jurado, M. M., Suárez-Estrella, F., López-González, J. A., Martínez-Gallardo, M. R., López, M. J.** (2021). Application of sonicated extracts of cyanobacteria and microalgae for the mitigation of bacterial canker in tomato seedlings. *Journal of Applied Phycology*, 33(6), 3817–3829.
- Toribio, A. J., Suárez-Estrella, F., Jurado, M. M., López, M. J., López-González, J. A., Moreno, J.** (2020). Prospection of cyanobacteria producing bioactive substances and their application as potential phytostimulating agents. *Biotechnology Reports*, 26.
- Tuney, I., Cadirci, B. H., Unal, D., Sukatar, A.** (2007). Locational and organic solvent variation in antimicrobial activities of crude extracts of marine algae from the coast of Izmir (Turkey). *Fresenius Environmental Bulletin*, 16(4), 428–434.
- van Vuuren, S. F.** (2008). Antimicrobial activity of South African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(3), 462–472.
- Vanzolini, T., Bruschi, M., Rinaldi, A. C., Magnani, M., Fraternali, A.** (2022). Multitalented synthetic antimicrobial peptides and their antibacterial, antifungal and antiviral mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 545.
- Villa, T. G., Veiga-Crespo, P.** (2014). Antimicrobial Compounds. *Current Strategies and*.
- Ward, O. P., Singh, A.** (2005). Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochemistry*, 40(12), 3627–3652.
- Wijesekara, I., Yoon, N. Y., Kim, S. K.** (2010). Phlorotannins from *Ecklonia cava* (Phaeophyceae): Biological activities and potential health benefits. *BioFactors*, 36(6), 408–414.
- Zuorro, A., Lavecchia, R., Contreras-Ropero, J. E., Martínez, J. B. G., Barajas-Ferreira, C., Barajas-Solano, A. F.** (2024). Natural Antimicrobial Agents from Algae: Current Advances and Future Directions. *International Journal of Molecular Sciences 2024, Vol. 25, Page 11826*, 25(21), 11826.

## ÖZGEÇMİŞ



**Ad-Soyad** : Vesile Esra ERÇETİN

**Doğum Tarihi ve Yeri** :

**E-posta** :

### ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2014, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
- **Lisans** : 2016, Anadolu Üniversitesi, İşletme Fakültesi, İşletme Bölümü
- **Yüksek Lisans** : 2018, Bursa Teknik Üniversitesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

### MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- Bazı yeni Schiff bazı metal komplekslerinin sentezi, karakterizasyonu, antimikrobiyal özelliklerinin incelenmesi, kuantum mekaniksel modellenmesi ve moleküler docking çalışmaları' BAP Projesi, – Araştırmacı
- Sürdürülebilir Tarım Ürünü Üretimi İçin Biyo-Pestisit ve -Herbisitlerin Geliştirilmesi, Tübitak Projesi – Araştırmacı
- "İzmir Çamaltı Tuzlası'nın Mikrobiyal Çeşitliliği ve Bulunan Organizmaların Biyoteknolojik Potansiyellerinin Araştırılması" isimli 114Z274 numaralı 1001TübitakProjesi – Araştırmacı
- Kabaoğlu U., Aslan M. U., Dokumcuoglu E., Ünal D., (Poster) Giberellin Hormonunun Lipit Biyosentezi ve Miktarı Üzerine Etkisinin *Chlorella vulgaris* Türünde Uygulanarak Biyodizel Üretiminde Verimliliğinin Araştırılması, 2. Alg Teknolojisi Sempozyumu, 24-27 Mayıs 2016, Seferihisar, İzmir
- "*Chlorella vulgaris* Türünde UV-B ve Yüksek Işık Stresi Altında Poliaminlerin ve Antioksidant Enzimlerine Ait Gen İfadeleri Üzerindeki Rollerinin Araştırılması" isimli 2209 Tübitak Öğrenci Projesi – Araştırmacı

- Dokumcuoglu E, Akarsu S. (Poster) ”*Chlorella vulgaris* türünde yüksek ışık stresi altında putresinin askorbat peroksidaz enziminin gen ifadesi üzerine etkisi” 5.Ulusal Biyoloji toplulukları kongresinde (25-27 Nisan 2014) poster ikincilik ödülü.

#### **ESERLER, SUNUMLAR VE PATENTLER:**

**Akarsu S., Erçetin E., Ozakca D.** (Poster).The Effect of Polyamine on mRNA level of Photosynthesis-Related and Antioxidant Enzymes Gene under High Light Stress. III. International Congress of the Molecular Biology Association, 10-12 September, 2014, Izmir-Turkey.

**Dobrucali, E., Uyanik, S., Altuntaş, V., Yilmaz, M., Balci, M., Şahan, A. N., Uçar, D.** (2024). Physicochemical and microbiological investigation of ballast waters of the ships operating in the Marmara Sea. *Ocean & Coastal Management*, 256, 107300.

**Erçetin, V. E., Yilmaz, M.** (2020). Assessment of cell counting method based on image processing for a microalga culture. *Mediterranean Fisheries and Aquaculture Research*, 3(2), 75-81.

**Memiş, E. B., Beran, B., Kaya, Y., Dokumcuoglu, V. E., Yilmaz, M.** Synthesis, Characterization, Theoretical Studies and Antibacterial Activity Studies of a New Schiff Base: 2-[(5-Amino-1, 3, 3-Trimethyl-Cyclohexyl Methyl Imino)-Methyl]-4-Bromo-Phenol. Available at SSRN 4272933.