



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MICROCYSTIS SPP. DE MICROCYSTIN ÜRETİMİNDEN  
SORUMLU GENLERİNİN TESPİTİ**

**Dilek SEVER KAYA**  
**Su Ürünleri Temel Bilimleri Anabilim Dalı**  
**Çsular Biyolojisi Programı**

**Danışman**  
**Doç. Dr. Meriç ALBAY**

**Haziran, 2008**

**İSTANBUL**



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MICROCYSTIS SPP. DE MICROCYSTIN ÜRETİMİNDEN  
SORUMLU GENLERİNİN TESPİTİ**

**Dilek SEVER KAYA**  
**Su Ürünleri Temel Bilimleri Anabilim Dalı**  
**Çsular Biyolojisi Programı**

**Danışman**  
**Doç. Dr. Meriç ALBAY**

**Haziran, 2008**

**İSTANBUL**

Bu çalışma 11/07/2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Su Ürünleri Temel Bilimler Anabilim Dalı İçsular Biyolojisi programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



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

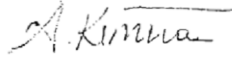
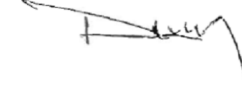


Prof. Dr. Nuran ÜNSAL  
İstanbul Üniversitesi  
Su Ürünleri Fakültesi



Prof. Dr. Mustafa TEMEL  
İstanbul Üniversitesi  
Su Ürünleri Fakültesi

Yard.Doç.Dr. Duran ÜSTEK  
İstanbul Üniversitesi  
DETAE



Yard.Doç.Dr. Ayten ERDEM  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Bu alı ma stanbul niversitesi Bilimsel Ara tırma Projeleri Yürütücüsü  
Sekreterli inin T-37/15122006 numaralı projesi ile desteklenmi tir .

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezimin olu um sürecinden ba layarak de erli bilgilerini benimle payla an, fikirleriyle bana yol gösteren danı manım Sayın Doç . Dr. Meriç ALBAY'a,

Tezim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle payla an, laboratuvar çalı malarım da bana her türlü imkanı sa layan, deste ini her zaman yanımda hissetti im, bir nevi ikinci danı manım olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Duran ÜSTEK'e,

Laboratuvar çalı malarım da bilgi ve tecrübesiyle sürekli yanımda olan, sabırla benimle ilgilenen Sayın Doç. Dr. Reyhan AKÇAALAN'a,

Tez a amamın ba ından sonuna kadar beni hiç yalnız bırakmayan, bilgisi ve eme iyle sürekli yanımda olan sevgili arkada ım, Tıbbi Biyolog Ça rı GÜLEÇ'e,

Tez çalı malarımın çe itli a amalarında de erli katkılarıyla bana yardımcı olan arkadaş larım Dr. Neslihan ABACI, Ar . Gör. Cenk GÜREV N, Ar . Gör. Aris ÇAK R S, Fizikçi Ba ar OKU, Kimyager Öznur A LAR ve Dr. Fulya ÇO AN'a,

Tezimin hazırlanmasında eme i geçen, çalı malarım süresince deste ini hep yanımda hissetti im, sabır ve ilgisini benden esirgemeyen sevgili e im Hasan KAYA'ya,

Tüm ya amım boyunca maddi ve manevi destekleriyle beni hiç yalnız bırakmayan, kar ıla tı ım her türlü güçlü ü a mamda yardımcı olan sevgili annem e, babama ve karde ime sonsuz te ekkürlerimi sunarım.

**Haziran, 2008**

**Dilek Sever KAYA**

## Ç NDEK LER

ÖNSÖZ.....	i
Ç NDEK LER.....	ii
EK L L STES .....	iv
TABLO L STES .....	v
SEMBOL L STES .....	vi
ÖZET.....	vii
SUMMARY.....	vii i
1. G R .....	1
2. GENEL KISIMLAR .....	5
2.1. SUYUN ÖNEM .....	5
2.2. SU K RL L .....	6
2.3. ÖTROF KASYON.....	7
2.4. CYANOBACTERIA (CYANOPHYTA: MAV YE L ALGLER) TÜRLER N N GENEL ÖZELL KLER .....	8
2.5. MAV YE L ALG TOKS NLER (CYANOTOKS NLER) .....	9
2.6. SEKONDER METABOL TLER .....	11
2.7. <i>MICROSYSTIS</i> SPP.'N N EKOLOJ S .....	13
2.8. MICROCYSTIN N YAPISI VE TOKS K MEKAN ZMASI .....	14
2.9. MICROCYSTIN N CANLILAR ÜZER NDEK ETK LER .....	17
2.10. MICROCYSTIN ÜRET M N N GENET K TEMEL .....	22
3. MALZEME VE YÖNTEM .....	31
3.1. ÇALI MA SAHASININ TANIMI .....	31
3.2. ÖRNEKLEME.....	32
3.3. <i>MICROCYSTIS</i> ' N ZOLASYONU .....	32
3.4. DNA ZOLASYON ÇÖZELT LER .....	33
3.4.1. TE (TrisEDTA) Tampon Çözeltisi (50 ml, pH : 8,0).....	33
3.4.2. SDS %10 (50 ml, pH: 7.2).....	33

3.4.3. Lizis Buffer .....	33
3.4.4. Amonyum Asetat Çözeltisi (9.5 M) .....	33
3.5. ELEKTROFOREZ ÇÖZELT LER .....	34
3.5.1. Agaroz Jel Elektrofözezi için Yürütme Tamponu (TAE, 50X) .....	34
3.5.2. Agaroz Jel Elektrofözezi için Yükleme Tamponu (6X) .....	34
3.5.3. Etidyum Bromür .....	34
3.6. GÜMÜ BOYAMA ÇÖZELT LER .....	34
3.7. KULLANILAN ENZ MLER .....	35
3.8. KULLANILAN PR MERLER.....	35
3.9. KÜLTÜR PROSEDÜRÜ .....	36
3.10. DNA ZOLASYONU .....	36
3.10.1. DNA'nın Miktar ve Saflı ının Ölçümü .....	36
3.10.2. Agaroz Jel Elektrofözezi .....	37
3.11. PCR (POL MERAZ Z NC R REAKS YONU) .....	37
3.11.1. PCR Karı ımları .....	38
3.11.2. PCR Ko ulları .....	38
3.11.3 PCR Sonuçlarının Kontrolü .....	39
3.12. ENZ M KES M .....	39
3.13. SSCP (TEK Z NC RL KONFORMASYON POL MORF ZM ) .....	40
3.13.1. Örneklerin Hazırlanı ı ve Elektrofözeze .....	40
3.11.2. Gümü Boyama .....	40
3.12. D Z LEME .....	41
4. BULGULAR .....	42
4.1. <i>MICROCYSTIS SU LARININ TANIMLANMASI</i> .....	42
4.2. DNA ZOLASYON SONUÇLARI .....	44
4.3. PCR SONUÇLARI .....	46
4.4. SSCP VE D Z LEME SONUÇLARI .....	50
5. TARTI MA VE SONUÇ .....	54
KAYNAKLAR.....	64
ÖZGEÇM .....	72

## EK L L STES

<b>ekil 2.1</b>	: Linear tripeptid ACV'nin [ -(-L- -aminoadipil)-L-sisteinil-D-valin] sentez mekanizması.....	12
<b>ekil 2.2</b>	: Microcystinin genel yapısı.....	14
<b>ekil 2.3</b>	: Microcystinin toksik mekanizması .....	16
<b>ekil 2.4</b>	: Microcystin-LR'nin yapısı ve konfigürasyonu .....	17
<b>ekil 2.5</b>	: Cyanobacterial NRPS ve NRPS/PKS gen kümeleri .....	23
<b>ekil 2.6</b>	: Microcystin üretimini etkileyen genetik, hücre ve populasyon seviyesindeki faktörlerin özeti .....	24
<b>ekil 2.7</b>	: <i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-843'ün halkasal kromozomunun ematik görünümü.....	25
<b>ekil 2.8</b>	: Microcystin biosentezini gerçekle tiren gen kümesinin organizasyonu ....	26
<b>ekil 2.9</b>	: Microcystin sentetaz bile enlerinin rolü ve fonksiyonel analizleri .....	27
<b>ekil 2.10</b>	: Microcystin-LR'ın biyosentetik modeli ve <i>mcyA, B, C, E</i> 'nin domeyn yapıları.....	28
<b>ekil 3.1</b>	: Küçükçekmece Gölü'nün Lokasyonu .....	32
<b>ekil 4.1</b>	: Mic 1 su una ait DNA konsantrasyon de erleri .....	45
<b>ekil 4.2</b>	: Mic 1 genomik DNA'sının agaroz jel görüntüsü .....	45
<b>ekil 4.3</b>	: <i>mcyB</i> geninin genomik organizasyonu .....	46
<b>ekil 4.4</b>	: <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806'dan izole edilen <i>mcyB</i> geninin agaroz jel görüntüsü .....	46
<b>ekil 4.5</b>	: <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806 ve <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806 PCR ürününün (6318 bç) agaroz jel görüntüsü .....	47
<b>ekil 4.6</b>	: <i>mcyB</i> genine ait PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri .....	48
<b>ekil 4.7</b>	: <i>Microcystis</i> su larının PCR görüntüleri.....	49
<b>ekil 4.8</b>	: <i>mcyB</i> geni 2, 6 ve 10. bölgeye ait SSCP jel görüntüleri .....	50
<b>ekil 4.9</b>	: <i>mcyB</i> geni 3, 4, 10, 11 ve 12. bölgeye ait SSCP jel görüntüleri .....	51
<b>ekil 4.10</b>	: DNA dizileme sonuçlarının ematik görünümü . .....	52
<b>ekil 4.11</b>	: Nükleotid de i ikli ini gösteren kromotogram. ....	52
<b>ekil 4.12</b>	: Mic 17 su unun <i>mcyB</i> geninde olu an varyasyonlar .....	53
<b>ekil 5.1</b>	: <i>mcyB</i> genindeki dizi motiflerinin lokasyonu .....	61
<b>ekil 5.2</b>	: <i>mcyB</i> geninde bulunan nükleotid farklılıklarının neden oldu u aminoasit de i iklikleri. ....	62

## TABLO L STES

<b>Tablo 2.1</b>	: Cyanotoksinler ve toksin üreten cyanobacteria türleri .....	10
<b>Tablo 2.2</b>	: <i>Microcystis</i> spp.'nin taksonomisi .....	13
<b>Tablo 2.3</b>	: Mavi ye il alglerle ilgili sa lık sorunlarına örnekler .....	21
<b>Tablo 2.4</b>	: <i>Microcystis aeruginosa</i> genomunun ve genlerinin özellikleri .....	25
<b>Tablo 3.1</b>	: Küçükçekmece Gölünün genel özellikleri .....	31
<b>Tablo 3.2</b>	: BG 11 Sıvı Besiyeri .....	33
<b>Tablo 3.3</b>	: Gümü boyama çözeltileri .....	34
<b>Tablo 3.4</b>	: Primerler .....	35
<b>Tablo 3.5</b>	: PCR karı ımları .....	38
<b>Tablo 3.6</b>	: PCR 1 ko ulları.....	38
<b>Tablo 3.7</b>	: PCR 2 ko ulları.....	39
<b>Tablo 3.8</b>	: Enzim kesimi karı ımları .....	39
<b>Tablo 4.1</b>	: <i>Microcystis</i> spp. su ları ve özellikleri .....	43
<b>Tablo 4.2</b>	: PCR reaksiyonları sonucunda elde edilen ürün boyları .....	48
<b>Tablo 5.1</b>	: Cyanobacteria türlerinde toksisite tespiti için PCR, HPLC, ELISA ve Bioassay yöntemlerinin kar ıla tırılması .....	55
<b>Tablo 5.2</b>	: Peptid sentetazların katalitik domeynlerinin yüksek derecede korunmu dizi motifleri.....	60

## SEMBOL LİSTESİ

<b>Bp</b>	: Baz çifti
<b>Da</b>	: Dalton
<b>Elisa</b>	: Enzim linked immünosorbent assay
<b>HPLC</b>	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
<b>Ha</b>	: Hektar
<b>kDa</b>	: Kilodalton
<b>kb</b>	: Kilobaz
<b>LPS</b>	: Lipopolisakkaritler
<b>M</b>	: Molar
<b>mA</b>	: Miliamper
<b>mcy</b>	: Microcystin sentetaz gen kümesi
<b>µ</b>	: Mikron
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>ng</b>	: Nanogram
<b>Nm</b>	: Nanometre
<b>NRPS</b>	: Non ribozomal peptid sentetaz
<b>PKS</b>	: Poliketid sentaz
<b>PP1, PP2A</b>	: Protein fosfataz inhibisyon assay 1, 2A
<b>PCR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>SSCP</b>	: Tek zincirli konformasyon polimorfizmi

## ÖZET

### **MICROCYSTIS SPP. DE MICROCYSTIN ÜRETİMİNDEN SORUMLU GENLERİN TESPİTİ**

Microcystinler (mikrosistin) mavi yeşil algler tarafından üretilen, insanlar ve diğer canlılar üzerinde çeşitli olumsuz etkilere yol açan ve sekonder metabolitler olarak adlandırılan gruba dahil olan biyotoksinlerdir. Microcystinin en önemli üreticileri başta *Microcystis* olmak üzere *Planktothrix*, *Anabaenopsis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*'ya ait türlerdir. Özellikle Akdeniz iklimine sahip ülkelerde yaz aylarından sonbahar ortalarına kadar devam eden *Microcystis* spp. de görülen algal çoğalmalarla birlikte microcystin miktarında önemli artışlar tespit edilmiştir. Suyun ekolojik ve ekonomik değerini önemli ölçüde düşüren bu durum bir yandan habitat kayıplarına yol açarken bir yandan da insanlarda ve diğer canlılarda ölüm olaylarına kadar varabilen sorunlara neden olabilmektedir. Daha çok içme suyu rezervuarları, göller ve lagün alanlarda görülen cyanotoksinlerin ortaya çıkış mekanizmasını düzenleyen hücre içi organizasyonun moleküler ve genetik düzeyde incelenmesi, cyanobacteria algal çoğalmaları gerçekleştiren erken uyarı sistemlerinin oluşturulmasını ve bu duruma özgü etkin ve sürdürülebilir önlem alınmasını kolaylaştıracaktır. Bu nedenle microcystin üretiminde rol alan genlerin moleküler belirteç olarak kullanılıp toksik türlerin tespiti erken uyarı sistemlerinin oluşturulmasına en büyük katkıyı sağlayacaktır.

Toksin üretiminden sorumlu genlerin amplifiye edilmesi ve olası varyasyonların incelenmesi amacıyla hazırlanan bu araştırma kapsamında sadece toksik türlerin varlığının tespiti değil aynı zamanda moleküler belirteç olarak kullanılan *mcyB* geninde olabilecek varyasyonların da belirlenmesi hedeflenmiştir. Çünkü bu gen meydana gelebilecek varyasyonlar microcystinde de varyasyonlara sebep olabilmekte ve toksisiteyi etkileyebilmektedir. Mevcut çalışmada *mcyB* geni PCR temelli yöntemlerle amplifiye edildikten sonra enzim kesimi, SSCP ve dizileme analizleriyle incelenmiş ve analizlerin sonucunda *mcyB* geninin bir çok bölgesinde varyasyonlarla karşılaşılmıştır. Bu varyasyonlar genellikle tek nükleotid değişimleridir ve sessiz mutasyonlara yol açmaktadır. Bununla birlikte amino asit değişikliklerine de rastlanmıştır. Amino asit değişiklikleri korunmuş dizi motiflerine denk gelmediğinden microcystin toksisitesinde herhangi bir değişime neden olmadıkları düşünülmüştür. Bununla birlikte korunmuş dizi motiflerinin dizindeki amino asit değişimlerinin etkisini anlayabilmek için çalışmanın daha ayrıntılı araştırmalarla yürütülmesi gerekmektedir.

## SUMMARY

### THE DETERMINATION OF MICROCYSTIN PRODUCING GENE IN *MICROCYSTIS* SPP.

Microcystins are biotoxins, also called secondary metabolites, produced by cyanobacteria and caused various problems in human health and other living organisms. The main producers of microcystin are *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaenopsis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*. Countries with Mediterranean climate have intensive blooms of *Microcystis* spp., and therefore microcystin accumulation, particularly in summer to mid autumn. As a result, ecologic and economic value reduction, habitat losses and deaths of several organisms can be seen in aquatic ecosystems.

The investigation of mechanisms of cyanotoxin production in the cell in molecular and genetic grade will help us to develop early warning systems and take precautions for blooms which are especially present in drinking water reservoirs, lakes and lagunar sites.

In this study, not only the determination of toxin genes but also the investigation of variations in *mcyB* genes, as a molecular indicator, are aimed. Because, variations in *mcyB* genes can alter microcystin structure and increase toxicity.

*mcyB* gene amplified by PCR-base methods. Then enzyme cutting, SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) and sequence analysis studied. As a result, it was found that many parts of the *mcyB* gene has many variations. These variations especially are single nucleotid mutations and they caused silent mutations. At the same time amino acid changes were seen, however, not in conserved sequence motifs. Therefore, it has been thought that they have no effect on microcystin toxicity. However, to understand roles of amino acid changes and single nucleotid mutations, which are excepting of conserved sequence motifs, more detailed investigations should be done.

## 1. G R

Su ya amsal olayların sürdürülebilmesi için vazgeçilmez bir kaynaktır. Tüm organizmalar biyolojik gereksinimlerini kar ılayabilmek için suya ihtiyaç duyarlar. Su ya amsal öneme sahip olmakla birlikte daha çok insan kaynaklı olmak üzere çe itli kirleticiler ile kalite kayıplarına u rama kta, kullanıcılar üzerinde çe itli olumsuz etkilere neden olmaktadır. Hızlı sanayile me, nüfustaki hızlı artı ve plansız kentle me, çe itli altyapı sorunları ve sanayi kurulu larının pek ço unda arıtım tesisinin bulunmayı ı gibi ana nedenler su üzerinde önemli bir baskı olu turmaktadır. Suyla birlikte vücuda alınan kirleticiler insan sa lı ı açısından pek çok olumsuz etkiye yol açmaktadır. Özellikle geli mekte olan ülkelerde evsel ve endüstriyel atıkların yeterince arıtılmadan nehir, göl ve deniz gibi alıcı ortamlara verilmesi ekolojik sistem için ciddi sorunlar olu turmaktadır. Su kirlenmesi sucul ekosistemlerin etkilenmesine, ekolojik dengenin bozulmasına, giderek sahip oldukları özümleme kapasitesinin azalmasına ve yok olmasına yol açabilir. Nehir, göl ve di er su kaynaklarının kirlenmesi yle olu an durumun düzeltilmesi ancak çok büyük mali harcamalar ile mümkündür. Ülkemizin mevcut içsu potansiyeli dikkate alındı ında su kaynaklarımızın korunması ve su kirlili inin önlenmesi halk sa lı ı ve ülke ekonomisi açısından oldukça önemlidir. Su kayna ı olarak ihtiyaç duyulan bazı göller ve barajlarda kirlenmenin boyutları giderek artmaktadır. Bu nedenle gölleri besleyen akarsu ve nehirlerin su kalitesinin belirlenmesi ve bu ortamda ya ayan canlı gruplarının tesp it edilmesi büyük önem arz etmektedir (1, 2, 3, 4, 5).

Bilindi i gibi evsel ve endüstriyel atıklarla kirlenilen su kaynaklarında bir süre sonra azot ve fosfor gibi besleyici tuzların artı ı ile birlikte ötrofikasyon görölmektedir. Göl ekosisteminin yapısında meydana gelen de i imler en çok fitoplankton toplulu unu etkiler. Bu yüzden fitoplanktonların bazı türleri çevre kirlili inin ve ötrofikasyonun indikatörü olarak kabul edilirler. Fitoplankton içerisinde yer alan mavi ye il algler hemen hemen tüm habitatlarda yayılım gösteren, prokaryotik, fotosentez yapabilen, hayatın ba langıcı kadar eski ya am formlarıdır. Özellikle öytröf sularda yüksek

biyomas de erlerine ula abilen mavi ye il alglerin bazı türleri ise toksin üretebilme yetene ine sahiptir (6, 7, 8, 9).

Mavi ye il algler arasında kozmopolit da ılım gösteren türlerin ba ında *Microcystis* spp. gelmektedir. Hemen her ülkede öyτροφik sularda artı göstermesi nedeni ile ilk cyanotoksin ölçümü *Microcystis* spp. üzerinde yapılmı ve tespit edilen cyanotoksine bu türü refere etmesi için “microcystin” adı verilmi tir. Microcystinler peptid sentetaz enzimleri aracılı ıyla ribozom dı ı yolla sentezlenen siklik heptapeptid hepatotoksinlerin bir grubu olan sekonder metabolitlerdir. Microcystinin toksisitesinin moleküler temeli hepatosit protein fosfotaz 1 ve 2A’yı inhibe etmesidir. Özellikle karaci er hücrelerinde toksik etkisini gösteren microcystin aynı zamanda makrofajlar, böbrek hücreleri, gastro intestinal sistem üzerinde de olumsuz etkilere yol açmaktadır. Microcystin sadece insanlar için de il bu toksinle ili ki içerisinde bulunan tüm organizmalar için toksik etkiye sahiptir. Bu nedenle microcystinle kontamine olan suları kullanan tüm organizmalar ve insanlar ciddi bir tehlike altındadır. Microcystinin insanlar üzerindeki toksik etkisinin benzer ekilde hayvanlar üzerinde de görüldü ü bilinmektedir. Örne in, microcystin ekstraktı verilen farelerde ve sıçanlarda karaci er ve deri kanserinin geli ti i görülmü tür. Microcystinin tümör nekrozis faktör - ’nın indüklenmesine neden olmasından dolayı primer tümör promotörü oldu u dü ünülmektedir. Microcystinin insanlar üzerinde olu turdu u toksik etkilere en çarpıcı örnek Brezilya’da meydana gelen ve 60 hastanın ölümüyle sonuçlanan Caruaru sendromudur. Brezilya’da bir diyaliz klini inde hastalara rutin renal diyaliz uygulanmasından sonra nörolojik ikayetlerin olu masıyla ortaya çıkan olayın microcystin kontaminasyonundan kaynaklandı ı anla ılmı tir (10, 11, 12, 13, 14, 15).

Microcystinin olumsuz etkilerinden korunabi lmek için yapısının, sentez mekanizmasının ve organizmalar tarafından üretimini etkileyen faktörlerin iyi bilinmesi gerekir. Ayrıca microcystinin su kaynaklarındaki miktarının tespit edilebilmesi de önemli bir konudur. Microcystin varlı ı ve miktarı en ha ssas ekilde moleküler ve genetik yöntemlerle tespit edilmektedir. Bu yöntemlerin temeli microcystin sentetaz genlerinin ço altılmasına dayanır ve bu ekilde toksin varlı ı hızlı ve hassas bir ekilde tayin edilir. Bunun için *mcvA* ve *mcvB* gibi moleküler belirteçler kullanılmaktadır. Bu çalı mada *mcvB* moleküler belirteci kullanılarak toksin üretme potansiyeli olan

*Microcystis* türlerinin tespiti ve toksik *Microcystis* türlerinin a ırı ço alma göstermeden tanımlanmasıyla bu toksinin olumsuz etkilerine kar ı önceden önlem alınması amaçlanmı tır. Su kaynaklarının yönetiminden sorumlu birimler için toksik artı ların önceden bilinmesi, hem önlem alınması hem de arıtma maliyetlerinin dü ürülmesi bakımından büyük önem ta ımaktadır. Özellikle halk sa lı nı olumsuz yönde etkileyecek durumları önleyebilmek için su kaynaklarının yönetiminden sorumlu olan yerel yönetimlerle i birli i yapılarak erken uyarı sistemlerinin geli tirilmesi günümüzün en önemli konuları arasında yer almaktadır . Bu çalı mada sadece *mcyB* moleküler belirteci kullanılarak toksik türlerin belirlenmesi de il, *mcyB* geninde olabilecek varyasyonların da tespit edilmesi amaçlanmı tır. Yapılan çalı malar göstermektedir ki, *mcyB* geninde olabilecek varyasyonlar microcystin varyantlarının olu masına neden olabilmektedir. Microcystin varyantları toksisite açısından farklılıklar göstermektedir. Örne in Dünya Sa lık Örgütü içme suyunda bulunabilecek en yüksek microcystin düzeyini, bilinen en toksik varyant olan Microcystin LR üzerinden tespit etmi ve bu miktarı 1µg/l olarak düzenlemi tır (16, 17, 18, 19).

Bu çalı mada öncelikle su örneklerinden izole edilecek olan *Microcystis* spp.'nin kültür ortamına transfer edilmesinin ardından elde edilecek su lardan PCR yöntemiyle *mcyB* geninin ço altılması amaçlandı. Daha sonra enzim kesimi ve SSCP yöntemleri uygulanarak farklı su lardan elde edilen *mcyB* gen fragmanlarının arasındaki olası farklılı ın tespiti hedeflendi. SSCP jel görüntülerine göre farklı görünüme sahip olan örneklerin dizileme analizleri yoluyla bu farklılıkların hangi nükleotid dizilerinden kaynaklandı ının belirlenerek olası nükleotid de i ikliklerinin anlamlı bir farklılı a neden olup olmadı ının ortaya çıkarılması ve *mcyB* gen varyasyonları ile bu varyasyonların microcystin üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

Ülkemizde cyanotoksinler ile ilgili ara tırmalar oldukça yenidir. Yapılan ilk ara tırma Albay ve ark. tarafından [20] Sapanca, znik ve Ta kısı ı Gölleri ile Ömerli Baraj Gölü'nde cyanotoksinlerin dikey da ılımı ve çevresel faktö rler ile olan ili kilerini inceleyen çalı madır. Daha sonra Küçükçekmece Gölü'ndeki mevcut cyanotoksin üretimi ile çevresel faktörler kar ıla tırmalı olarak incelenmi tır. Yine Akçaalan ve ark. [23] Sapanca Gölü'nden izole etti i *Planktothrix rubescens* filamentinden direkt microcystin ölçümü yapmayı ba armı tır. Fakat imdiye kadar microcystinin yapısı ve

sentez mekanizması hakkında ülkemizde yapılmı genetik düzeyde herhangi bir ara tırma mevcut de ildir. Cyanotoksinlerden ve dolayısıyla microcystinden kaynaklanan ekolojik ve ekonomik kayıplar ile bu toksinlerin halk sa lı ı üzerinde olu turdu u tehditler dü ünüldü ünde ülkemizde bu konu üzerinde yapılacak bir çok çalı maya ihtiyaç oldu u görülmektedir. Bu nedenle, yapılan bu ara tırmanın önemli bir bo lu u dolduraca ı ve gelecek yıllarda ülkemizde yapılabilecek moleküler ve genetik temelli cyanotoksin çalı malarına ve erken uyarı sistemlerine bir temel olu turaca ı dü ünülmektedir (20, 21, 22, 23).

## 2. GENEL KISIMLAR

### 2.1. SUYUN ÖNEM

Hayatın kaynağı olan su gerekli önlemler alınmadığı takdirde yakın gelecekte dünyanın en önemli sorunlarından biri olacaktır. Tüm doğal kaynaklar gibi su da sınırsız, kullanılmakla bitmeyecek bir kaynak değildir. Dünyadaki toplam su miktarının ancak % 0,74 kadarı kullanılabilir tatlı sudur. Kullanılabilir tatlı suyun da % 70'inden fazlası imdiden kirlenmiş durumdadır (24). Türkiye üç tarafı denizlerle çevrili, 8333 km kıyı eridi, 80.791 km<sup>2</sup> deniz alanı, 10.000 km<sup>2</sup> doğal gölü, 15.000 ha göleti, 342.377 ha baraj gölü ve 177.714 km uzunluğunda akarsuları ile önemli bir potansiyele sahiptir (25). Bu potansiyelin verimli bir şekilde kullanılması halk sağlığı ve ülke ekonomisi açısından çok önemlidir.

Bir ülkenin su zengini sayılabilmesi için yılda ortalama kişi başına 10.000 m<sup>3</sup> su potansiyeline sahip olması gerekir. Su potansiyeli 1000 m<sup>3</sup>'ten az olan ülkeler su fakiri kabul edilmektedir. Kişi başına düzen kullanılabilir su potansiyeli 3690 m<sup>3</sup> olan Türkiye, dünya ortalaması olan 7600 m<sup>3</sup>'ün oldukça altında olmasından dolayı su fakiri olmamakla birlikte su kısıtı bulunan ülkeler arasındadır. Türkiye'de kişi başına düzen kullanılabilir su miktarı ise 1735 m<sup>3</sup> civarındadır. Devlet İstatistik Enstitüsü, 2025 yılına kadar ülke nüfusunun 80 milyona varacağını tahmin etmektedir. Bu durumda kişi başına düzen kullanılabilir su miktarı 1300 m<sup>3</sup>'e düşecektir (26). Bunun yanında nüfus artışı, kentleşme ve sanayileşme olgularına bağlı olarak artan su tüketim değerleri dikkate alındığında nicelik açısından yenilenebilir tatlı su kaynaklarında bir azalma ile karşı karşıya kalındığı açıktır (27). Mevcut artışlar (ülkemizin toplam nüfusu, nüfus artışı hızı, kullanılabilir su miktarı vs.) göz önüne alındığında gelecek yıllarda temiz su kaynaklarının hiçbiri kirletilmese bile Türkiye'yi yakın gelecekte çok ciddi su sorunlarının beklediği açıktır.



tüketimi, kontamine sulara avlanan balıkların tüketimi ya da bu sulara yüzme, bir çok patojen bakteri kaynaklı enfeksiyon veya toksikasyonlara neden olmaktadır. Su kaynaklı hastalıklar içinde en sık görülenler mikrobiyel ve paraziter kökenli olanlardır. Bunların bazıları kolera (*Vibrio cholera*), tifo ve paratifo (*Salmonella typhi* ve *S. paratyphi*), dizanteri (*Shigella dizenteriae*), turist ishali (*E. coli*), poliomyelit, hepatit A, viral gastroenteritis (Enteroviruslar), amebiasis (*Entamoeba histolytica*), giardiasis (*Giardia intestinalis*) ve criptosporidiosis (*Cryptosporidium parvum*)' dir (30). Su kirliliği sadece bakteriyolojik açıdan tehlike oluşturmamaktadır. Ayrar metallere, pestisidler, radyoaktif maddeler gibi kirleticilere maruz kalan suyun kullanımı kısa ve uzun vadede insan sağlığı üzerinde olumsuz etkiler yaratmaktadır. Kirleticilerin bir kısmı insanlara doğrudan zarar verdiğini gibi birçoku da bitki ve hayvanlarda birikerek besin zinciri yoluyla insanlara geçebilmektedir. Suda bulunan mikroorganizma, bitki ve hayvan toplulukları da kirliliğe tolerans derecelerine göre zaman içerisinde yok olmaktadır (31).

### 2.3. ÖTROFİKASYON

Çeşitli insan aktiviteleri ile kirlenilen su kaynakları her zaman her canlı için olumsuz sonuçlar oluşturmaz. Örneğin evsel, endüstriyel ve tarımsal faaliyetler sonucu suda miktarları artan azot ve fosfor gibi besleyici tuzlar birçok alg türünün artmasına neden olmaktadır. Algler sucul ortamın birincil üreticileridir ve suyun biyolojik verimliliğinin belirlenmesinde önemli bir yere sahiptirler (32). Algler fotosentez yaparak sucul yaşam için gerekli oksijeni sağlarlar. Sucul ortamlarda ekosistemin temel üyeleri olan büyük dip omurgasızları ve balıklar için yaşam faaliyetleri açısından gerekli oksijen ve besin ihtiyacı bu organizmalar tarafından karşılanır (33). Görüldüğü gibi algler sucul ekosistem için çok önemli organizmalardır. Ancak, besin elementleri göl, rezervuar, akarsu, ırmak ve sahil gibi ortamlarda fazlaca derlenir edilirse su kalitesinin bozulmasıyla birlikte alg artışı sonucu ötrofikasyon gerçekleşir (32).

Ötrofikasyon su ortamının yapısına bağlı olarak farklı gelişme süreçleri izler. Örneğin göller için alg üretimini kısıtlayan temel etken azot ve fosfordur. Bu besin elementlerinin miktarı yıllık ortalama 0,3 mg/lt azot ve 0,02 mg/lt fosfor oranını

a madıkça sularda a ırı alg üremesi söz konusu de ildir (34). Göl kirlenmesinde temel ta nım yolları akarsular ve atmosferdir. Akarsularla ta nın çözünümü ve askıdaki maddelerin miktarının önemli bir bölümü erozyon ve kimyasal çözünme sonucu olur. Bu girdilerde arazi kullanımındaki de i im ve ya murun, asiditenin artması gibi nedenlerle artı olabilir. Göle giren kirleticilerin büyük bir kıs mı akarsular, endüstriyel atık sular ve drenaj yoluyla ta nmaktadır. Bununla birlikte atmosferle kirlilik ta nımı da küçümsenmemelidir (29). Tüm bu etkenler azot ve fosforun normal de erlerinin üzerine çıkmasına neden olur ve ardından a ırı alg ço alması gerçekleşir. Öncelikle suda çözünümü oksijen miktarında hızlı bir artı meydana gelir. Ancak a ırı üreyen alglerin zamanla ölererek suyun dibine çökmesi ve aerobik bozunma ile birlikte sudaki çözünümü oksijen miktarı azalır ve bu sularda ya ayan çözünümü oksijene gereksinim duyan canlı türleri tolerans derecelerine göre yok olmaya ba lar (34).

Ötrofikasyonun olumsuz etkileri oksijen miktarındaki azalma ile sınırlı kalmaz. A ırı ço alan alg türleri içinde toksik olanlar da mevcuttur. Ötrofikasyon nedeniyle çok fazla miktarda üretilen toksinler sucul ekosistemle ili kili canlıların ölümlerine kadar varan toksisite sorunlarına sebep olmaktadır. Bununla birlikte a ırı alg ço alması su kalitesinde dümeye, toksisite problemlerinden dolayı balık ölümlerine ve kültür balıkçılı nda kayıplara, halk sa lı nın olumsuz etkilenmesine, kötü koku ve görünüş sorunlarından kaynaklı estetik kayıplara da neden olmaktadır (35).

#### **2.4. CYANOBACTERIA (CYANOPYHTA: MAV YE L ALGLER) TÜRLER N N GENEL ÖZELL KLER**

Ötrofik tatlı sularda bulunan alg grupları içinde cyanobacteria en önemli ve baskın grubu olur. Cyanobacteria'lar çok eski ya am formlarıdır. Fosil kayıtları yaklaşık 3.5 milyar yıl önce geç prekambrien dönemde var olduklarını göstermektedir. Prokaryotik organizmalardır. Tıpkı bakterilerde oldu u gibi özelle mi organelleri ve nukleus zarları yoktur. Nukleus zarı olmadığından halkasal ve çift zincirli yapıdaki DNA molekülü sitoplazmada da mık halde bulunur. Sitoplazmaları granüler görünümde ve birçok ribozom içerir. Sitoplazma içerisinde ribozomlara ek olarak gaz keseleri, glikojen granülleri, ya damlacıkları, arginin granülleri, aspartik asit polimerleri ve polihedral karboksizomlar da bulunur. Buonsi hareketinin

gerçekle mesini sağlayan gaz keseleri özellikle yüzen akuatik türlerde görülür. Cyanobacteria türleri nitrojeni fikse edebilir. Nitrojen fiksasyonu özellikle heterosist adı verilen hücrelerde meydana gelir. Heterosist hücreleri zarla çevrilidir (36). Tüm Cyanobacteria türleri fotosentetik ve ökaryotik fotoototroflar gibi klorofil-a içerirler. Bu sayede fotosentezi gerçekleştirirler. Cyanobacteria'da bulunan bir diğer pigment fikobilin pigmentidir. Fikobilin mavi renk verir. Bu nedenle genellikle mavi yeşil algler olarak adlandırılmaktadırlar (10). Tek hücreli, koloniel veya filamentli yapıda olabilirler. Hücre çapları 2-40 µm arasında olabilir. Bitki veya mantarlarla simbiyont olarak yaşayabilirler. Cyanobacteria türleri kozmopolitan bir dağılımı gösterir ve tüm habitatlarda bulunur. Genel olarak deniz ve tatlı sularda su sütununun planktonik üyeleri olarak yaşamlarını sürdürürler. Toksik üreten türleri bulunmaktadır (37). Cyanobacteria türleri yüzey sularında aşırı artı olarak adlandırılan birikmeler yaparlar. Algal aşırı artılarda hücre konsantrasyonları milimetrede milyonlarca hücreye ulaşabilir. Bu aşırı artıların sonucunda algler süyün kokusu ve rengini değiştirebilir (renk yeşil, sarı, kahve veya kırmızıya dönüşebilir), su kalitesini bozarlar (38).

Bilimsel literatürde ilk toksik cyanobacteria artışı 125 yıl önce Kuzey Avustralya'da rapor edilmiştir (10). Avrupa, Kuzey Amerika, Avustralya, Asya ve Afrika'da yapılan araştırmalar göstermektedir ki aşırı cyanobacteria çoğalmaları geniş çaplı çevre koşulları altında hemen hemen tüm dünyada özellikle tropik ve subtropik bölgelerde meydana gelmektedir. Yine bu çalışmalar doğrultusunda aşırı cyanobacteria artışlarının %25-%75'inin toksik olduğunu anlamıştır. Cyanobacterial aşırı çoğalmaların sebebi ötrofik sulardır. Ancak tüm cyanobacteria artışlarının ötrofikasyonla ilgili olmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. Örneğin Avusturya'da insan etkilerine maruz kalmamış su kaynaklarında ve İsviçre'nin oligotrofik Alp sularında aşırı cyanobacteria artışlarının meydana geldiği görülmüştür (10).

## **2.5. MAVİ YEŞİL ALG TOKSİNLERİ (CYANOTOKSİNLER)**

Mavi yeşil alglerden kaynaklı aşırı alg çoğalmaları sonucu sulardaki toksin konsantrasyonunun aşırı artışı en önemli çevre sorunlarından birini oluşturmaktadır. Toksik mavi yeşil algler (cyanobacteria) dünyanın her yerinde tüm iç sular ve denizlerde bulunmaktadır. Buna kadar omurgalıları da toksik etki yaratan 46 mavi yeşil

alg türü tespit edilmiştir. Bunlardan en önemlileri; *Microcystis* spp., *Planktothrix rubescens*, *Planktothrix agardhii*, *Anabaena* spp., *Aphanizomenon* spp., bazı *Oscillatoria* spp., *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Synechococcus* spp., *Gloetrichia* spp., *Lyngbya* spp., *Nostoc* spp., *Schizothrix* spp., ve *Synechocystis* spp.'dir (39).

Cyanotoksinler kimyasal yapılarına göre siklik peptidler (microcystin, nodularin), alkaloidler (anatoxin-a, anatoxin-a(s), saxitoxin, cylindrospermopsin, aplysiatoxins, lyngbyatoxin-a) ve lipopolisakaritler (LPS) olarak ayrılır (40). Cyanotoksinler etkiledikleri bölgeye göre hepatotoksinler, nörotoksinler ve dermatotoksinler olarak gruplandırılırlar (Tablo 2.1).

Tablo 2.1 : Cyanotoksinler ve toksin üreten cyanobacteria türleri (37)

Toksin	Cyanobacteria Türleri
Hepatotoksik	
Microcystins	<i>Microcystis, Oscillatoria, Nostoc, Anabaena, Anabaenopsis</i>
Nodularin	<i>Nodularia</i>
Cylindrospermopsin	<i>Cylindrospermopsis, Aphanizomenon, Umezakia</i>
Nörotoksik	
Anatoxin-a	<i>Anabaena, Oscillatoria, Aphanizomenon</i>
Anatoxin-a(s)	<i>Anabaena</i>
Saxitoxins	<i>Anabaena, Aphanizomenon, Lyngbya, Cylindrospermopsis, Planktothrix</i>
Dermatotoksik	
Aplysiatoxins	<i>Lyngbya, Schizothrix, Oscillatoria</i>
Lyngbyatoxin-a	<i>Lyngbya</i>

Hepatotoksinler birçok cyanobacteria türü tarafından üretilmektedir (Tablo 2.1). Bu toksinler karaciğer hücrelerini hedef alırlar ve çiftlik hayvanlarının, kuşların ve vahşi hayvanların ölümüne neden olurlar. Ayrıca Çin, Hindistan, Avustralya ve Brezilya'da insanlarda hastalık ve ölümlere neden oldukları da rapor edilmiştir (37).

Nörotoksinlerin nikotinik asetilkolin reseptörlerine karşı yüksek afiniteleri vardır. Reseptörlere bağılandıkları zaman post sinaptik reseptör iyon kanallarında konformasyonel değişikliklere neden olurlar ve bu durum da nöromuskular depolarizasyonun blokajına sebep olur (40). Nörotoksin içeren sulardan içen hayvanlar tipik bulgular olan çarpınma ve nefes alamama durumunun hemen ardından solunum durmasına bağlı olarak dakikalar içinde ölür (41). Nörotoksin üreten cyanobacteria

türlerinin (özellikle *Anabaena* spp.) a ırı ço alması çiftlik hayvanları, balık çiftlikleri, vah i hayvanlar ve insanlar için oldukça büyük bir sorun olu turmaktadır. 1990 yılında Darling nehrindeki *Anabaena* spp., kaynaklı a ırı ço alma sonucunda yakla ık 1600 koyun ve büyükba hayvan ölmü tür (42).

Dermatotoksinler deri irritasyonlarına, allerjik reaksiyonlara ve gastroenterite neden olur (43). Ayrıca karaci erde küçük granulomalara ve artımı mitozise neden oldukları da bilinmektedir (44).

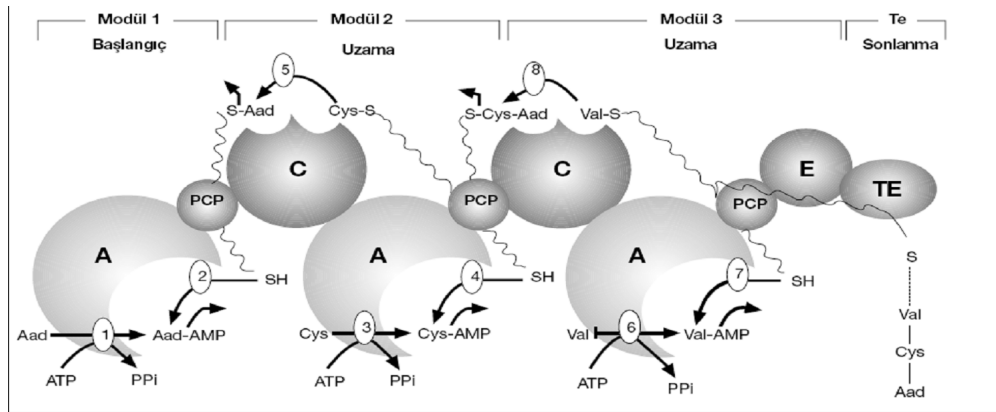
## 2.6. SEKONDER METABOL TLER

Son 20 yılda arazi ve kültür örneklerinden birçok mavi ye il alg metaboliti izole edilmi tir. u ana kadar birçok cyanobacteria türünden 600'ün üzerinde peptid veya peptidik yapıda metabolit tanımlanmı tır. Bu metabolitlerin yapıları co rafik orjinlerine ve ait oldukları gruba göre çok büyük farklılıklar gösterir. Cyanobacteria sekonder metabolitlerinin çok büyük bir bölümü peptiddir veya peptidik yapılar içerir. Bu oligopeptidlerin büyük bir ço unlu u non-ribozomal peptid sentetaz (NRPS) veya poliketid sentaz (PKS) mekanizması tarafından sentezlenir (45).

Sekonder metabolitler organizma herhangi bir stres durumuyla kar ıla tı nda faaliyete geçen özelle mi metabolit yollar tarafından üretilirler. Bu ürünlerin ara metabolizma ürünlerinden farkı organizmanın büyümesi ve üremesi için mutlak gerekli olmamalarıdır. Buna ra men organizma için önemli bir takım fonksiyonlar üstlenirler. Atıkların uzakla tırılması, detoksifikasyon, savunma ve hücreler arası haberle me bu fonksiyonlar arasındadır. Üretildikleri organizma için üstlendikleri bu görevlerin dı nda antibiyotik, kemoterapötik, pestisid, immünsüpresif, antilipolitik ajan gibi çok çe itli farmasotik fonksiyonlara da sahiptir ve bu etkileri nedeniyle yaygın ekilde kullanılmaktadır. Fonksiyonlarındaki çe itlili e benzer ekilde bu bile ikler kimyasal yapıları bakımındanda çok büyük çe itlilik gösterirler (46).

Ribozom dı ı protein sentez sisteminde peptidler yüksek molekül a ırlıklı multienzimler (NRPS) aracılı ıyla ya asidi sentezine benzer bir mekanizmayla sentezlenirler. Ribozom dı ı sentez mekanizmasında ribozomal protein sentezinde oldu u gibi

aktivasyon, ba lama, zincir uzaması ve sonlanma a amaları bulunmasına ve gerekli enerji ATP hidrolizinden sa lanmasına ra men kalı p görevini mRNA yerine peptid sentetazlar üstlenir ve olu an ürünlere standart L -aminoasitlere ek olarak D -aminoasitler, çok çe itli sıradı ı modifiye aminoasitler ve ya asitleri de bulunur. Bu yolla sentezlenen oligopeptidlerin yapısında 300'den fazla a mino ve ya asidi türevinin yer aldı ı tespit edilmi tir. Bu yapı ta ları tiyoesterler ekinde aktive edilirler. Peptid ba ı olu umu ve zincir uzaması enzime kovalent olarak ba lı fosfopantetein grubu yardımıyla ya asidi sentezine benzer bir mekanizma ile gerçekte ir. Olu an üründeki aminoasit sayısı genellikle 3-15 arasındadır. Ribozom dı ı peptid sentetazlar birçok ortak özelli e sahiptir. Modül olarak adlandırılan alt birimlerden olu urlar. Yakla ık bin aminoasit içeren ve molekül a ırlı ı 120 kDa civarında her bir modül belirli bir aminoasidin eklenmesi için özgüldür. Peptid sentetazda bulunan modül sayısı genellikle olu an peptiddeki yapı ta larına e ittir. Peptid sentetazları kodlayan genler 20 kb ve üstü büyüklükte gen kümeleri halinde düzenlenmi le rdir. Tek bir modülü kodlayan gen 3 kb civarındadır. Modüllerin sırası genellikle sentezlenen peptiddeki yapı ta larının dizili ini belirler. Bu ekinde modüller peptid sentezinde kalı p i levi görür. Bir modül adenilasyon bölgesi, peptidil ta ıyıcı bölgesi ve kondensasyon bölgesi olmak üzere en az üç bölge içerir. Ayrıca olu acak ürüne göre epimerizasyon, N -metilasyon gibi bölgeler de bulundurabilirler (46).



ekil 2.1: Lineer tripeptid ACV'nin [ -(-L- -aminoadipil)-L-sisteinil-D-valin] sentez mekanizması: A, Adenilasyon bölgesi; C, Kondensasyon bölgesi; PCP, peptidil taşıyıcı protein; E, Epimerizasyon bölgesi; TE, Tiyosteraz; Aad, Aminoadipil; -SH, Sülfhidril grubu; ATP, Adenozin tri fosfat; AMP, Adenozin mono fosfat; PPi, Pirofosfat (46).

## 2.7. MICROCYSTIS SPP.'N N EKOLOJ S

*Microcystis* spp., mavi ye il alglerin önemli bir grubunu olu turmakla birlikte bu türler çok geni bir alanda yayılım göstermektedir (47). A ırı alg artı larında en çok kar ıla ılan genus olan *Microcystis* hemen hemen her zaman toksiktir ancak toksik olmayan türleri de bulunmaktadır (39). *Microcystis* spp., akinet ve heterosist olu turmaz. Ayrıca hücrelerin boyutu, ekli ve kolonilerin hücre tipleri büyük farklılıklar gösterir. Bu özellikler *Microcystis* formlarının ve türlerinin tanımlanmasında kullanılır. *Microcystis* spp., sıklıkla morfoloji temelli taksonomiyle tanımlanır. İlk olarak izole edilip, kültüre alınan, labrotuvarıda çalı ılan ve tanımlanan toksik mavi -ye il alg türü *Microcystis aeruginosa*'dır. Tablo 2.2'de gösterilen türler ve bunların çe itli formları microcystin adlı toksinin primer üreticileridir. u ana kadar *Microcystis* spp.'nin sadece tek bir tür toksin (microcystin) üretti i tespit edilmi ti r. Diğer toksik Cyanobacteria türleri ise iki tür toksin birden (microcystin -anatoksin veya microcystin -citotoksin) üretebilmektedir (47).

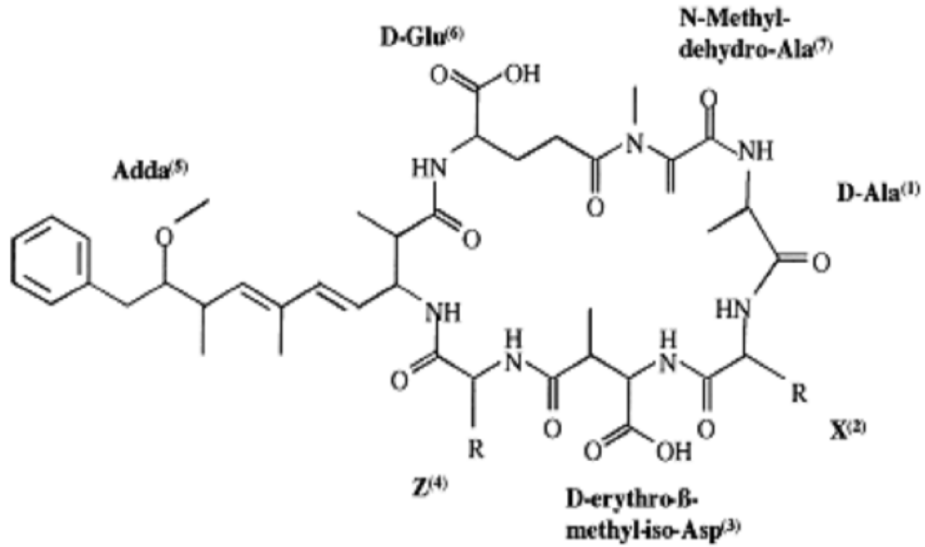
Tablo 2.2 : *Microcystis* spp.'nin taksonomisi (48,49)

Kingdom	Plantae
Subkingdom	Thallobionta
Classis	Cyanophyceae
Division	Cyanophyta
Ordo	Chroococcales
Familia	Microcystaceae
Genus	<i>Microcystis</i>
Species	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Microcystis flos-aque</i> <i>Microcystis ichthyoblabe</i> <i>Microcystis novacekii</i> <i>Microcystis viridis</i> <i>Microcystis wesenbergii</i> <i>Microcystis pulvereae</i> <i>Microcystis robusta</i>

Ötrofik ve hiperötrofik sularda *Microcystis* spp. artışı gösterir ve tüm yüzeyi kaplayıp suyun rengini, kokusunu ve karakteristiğini de değiştirebilir. Böyle durumlarda *Microcystis* spp. bütün yıl boyunca dominant tür olarak kalır. *Microcystis* türleri büyük çoğunlukla toksiktir. Örneğin, Çin’de yapılan bir araştırmada incelenen su kaynaklarının % 80’inden fazlasının *Microcystis* türleriyle kontamine olduğu ve kontamine olan bu suların % 95’inden fazlasında da hayvanları öldürebilecek düzeyde microcystin üretiminin olduğu görülmüştür (47).

## 2.8. MICROCYSTINİN YAPISI VE TOKSİK MEKANİZMASI

Toksik mavi yeşil alg artışı, bir yandan içinde insanların da bulunduğu birçok organizma için risk oluştururken, öte yandan ürettikleri metabolitler ile ekosistem için ciddi bir sorun oluşturmaktadır (50). Bu toksinler arasında yer alan microcystinler, *Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc* ve *Oscillatoria* genuslarına ait mavi yeşil algler tarafından üretilen siklik heptapeptid hepatotoksinlerin bir grubudur. *Microcystis*, microcystin üretiminin en fazla görüldüğü genustur (51). Microcystin diğer sekonder metabolitler gibi ribozom dışı peptid sentetaz mekanizmasıyla sentezlenir ve genel yapısı Şekil 2.2’de gösterildiği gibi halkasaldir (52).



Şekil 2.2 : Microcystinin genel yapısı: X ve Z ile gösterilen yerlere çeşitli L -aminoasitler gelebilir. (52)

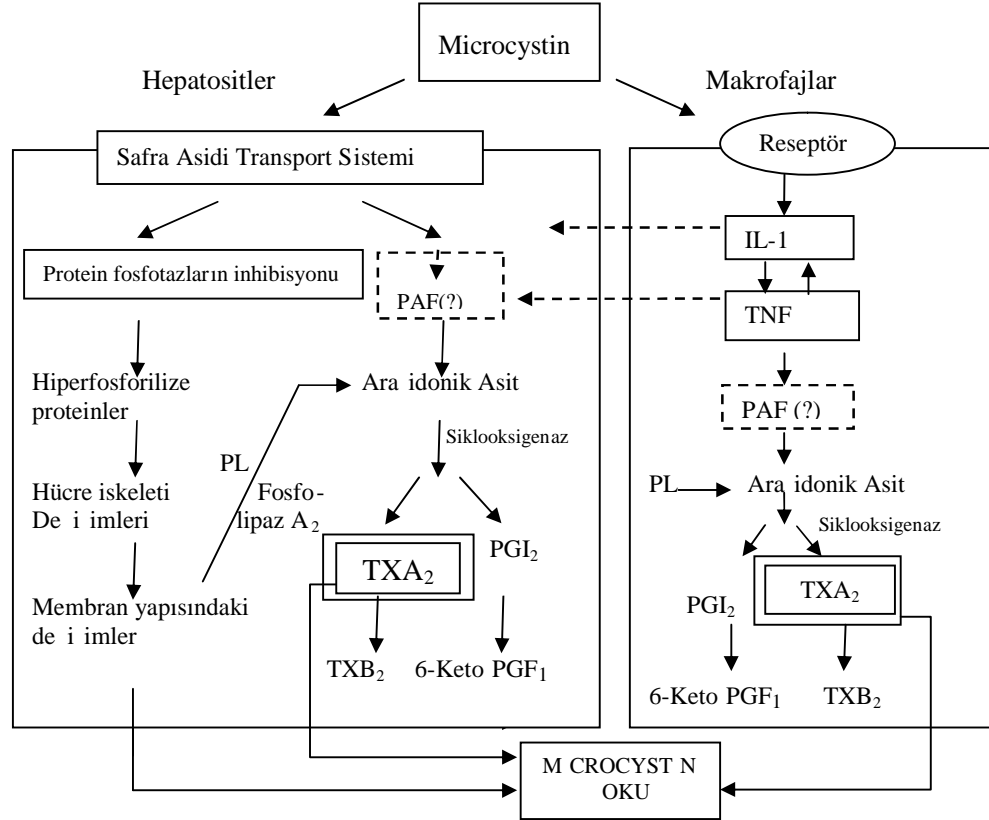
Tersinir protein fosforilizasyonu birçok hücresel işlem için temel düzenleyici mekanizma olmakla birlikte birçok düzenleyici ve yapısal proteinin biyolojik aktivitesi için de anahtar mekanizmadır. Fosforilizasyon prensip olarak serin, treonin ve tirozin rezidülerinde meydana gelir ve metabolizma, membran transportu, hücre bölünmesi, transkripsiyon ve translasyon gibi hücre içi olayların kontrolü için gerekli temel mekanizma olarak tanımlanır (53). Protein fosfataz 1 ve 2A serin/treonin fosfataz ailesine dahildir (52). Ökaryotik hücrelerde protein fosforilizasyonun % 98'inden fazlası serin ve treonin rezidülerinde gerçekleşir (53).

Sayıklı ökaryotik hücrelerde, regülör proteinlerin üzerinde bulunan protein kinaz ve fosfotazların fosforilizasyon-depolarizasyon aktiviteleri arasında kritik bir denge vardır. Bu denge hücreler arası sinyal transdüksiyon yolları için esas olur. Karbonhidrat ve yağ metabolizması, gen ekspresyonu, protein sentezi, hücre bölünmesi, membran transportu ve sekresyonu, nörotransmisyon gibi çeşitli biyolojik işlemler bu yolla düzenlenir (10).

Microcystin toksisitesinin moleküler temeli hepatosit protein fosfotaz 1 ve 2A'yı inhibe etmesidir. Microcystin, safra asidi organik anyon taşıyıcı sistemi yoluyla hepatositlerin içine aktif olarak taşınır (52). Protein fosfataz 1 ve 2A'yı inhibe eden microcystin sitokeratin hiperfosforilizasyonuna neden olur ve hücre iskeleti komponentlerinin yıkılmasına, hücrenin deforme olmasına ve ardından karaciğerde hemoraji görülmesine yol açar (51, 54). Microcystinin primer etkilerinden biri de karaciğer hasarına ve karaciğer yetmezliğine sebep olmasıdır. Ayrıca karaciğerde oranla daha az etkili olmakla birlikte gastrointestinal sistemde ve böbrekler üzerinde de toksik etkisi bulunmaktadır (10). Ayrıca içme suyuyla birlikte sürekli düşük miktarlarda microcystin alan insanların karaciğerinde tümör oluşumunun tetiklenebileceği düşünülmektedir (51, 54).

Microcystinin hepatositler ve makrofajlar olmak üzere iki tip hücre üzerinde etkisinin olduğu çeşitli çalışmaları rapor edilmiştir. Bu toksin hepatosit hücrelerinde protein fosfotazların inhibitörü, fosfolipaz A<sub>2</sub> ve siklooksigenazın aktivatörü olarak etki etmektedir. Diğer yandan makrofajlarda ise tümör nekrozis faktör- $\alpha$  ve interleükin-1'in indüklenmesine neden olmaktadır. Bu sitokinler platelet aktive edici faktörün üretilmesini sağlayarak siklooksigenazların aktivasyonuna neden olurlar.

Siklooksigenazlar da inflamasyon için kimyasal araçlar olan tromboksanlar ve prostaglandinleri üretirler. Bu reaksiyonların sonucunda tromboksan B<sub>2</sub> ve prostasiklin (6-ketoF<sub>1</sub>) oluşur (ekil 2.3) (47).

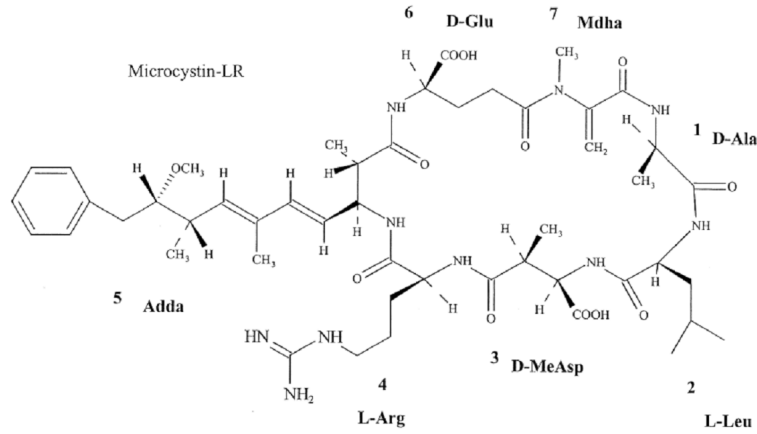


ekil 2.3 : Microcystinin toksik mekanizması: IL-1, interleükin-1; TNF-, Tumor nekrozis faktör-; PAF, Platelet aktive edici faktör; PL, Fosfolipidler; PGI<sub>2</sub>, Prostaglandin I<sub>2</sub>; TXA<sub>2</sub> ve B<sub>2</sub>, Tromboksan A<sub>2</sub> ve B<sub>2</sub>; 6-keto PGF<sub>1</sub>, 6-keto-prostaglandin F<sub>1</sub> (47)

Tromboksan B<sub>2</sub> trombosit kümeleşmesine neden olan güçlü bir aracıyken, 6-ketoF<sub>1</sub> trombosit kümeleşmesinin inhibitörü olarak görev yapar. Tromboksan B<sub>2</sub>'nin varlığı kan pıhtılaşmasına neden olabilir. Ayrıca bu ürünlerin makrofajlarda da görülmesi microcystine karşı bir inflamasyon cevabının geliştiğini göstermektedir (47).

Birçok yüksek derecede toksik olan microcystinlerin yapısal varyantları, siklik heptapeptid yapıda bulunan iki korunmamış pozisyonundaki amino asitlere bağlı olarak farklı amino asitleri ve demetillenmiş veya asetillenmiş amino asitleri içerir (51). Microcystinin ana yapıya kadar tanımlanmış 65'in üzerinde izoformu bulunmaktadır (52). Microcystinin

varyantları arasında en yaygın olanları microcystin-LR (lösin-arginin), microcystin-RR (arginin-arginin) ve microcystin-YR (tirozin-arginin)'dir (55). Microcystin-LR do ada en çok kar ıla ılan ve üzerinde en çok çalı ılan microcystin varyantıdır. Moleküler a ırlı ı 1000 Da civarındadır. Microcystin genel yapısında X (2) ve Y (4) ile gösterilen bölgelere sırasıyla lösin ve arginin amino asitlerinin ba lanması sonucu microcystin -LR izoformu olmaktadır ( ekil 2.4) (56). Hepatotoksin olarak sınıfla ndırılan microcystin-LR, di er microcystin varyantları arasında en toksik olanıdır (53). Özellikle sürekli toksine maruz kalma durumunda çok dü ük konsantrasyonlarda (ng/l) dahi toksik etkisini göstermektedir (56).



ekil 2.4: Microcystin-LR'nin yapısı ve konfigürasyonu (56)

## 2.9. MICROCYSTIN N CANLILAR ÜZER NDEK ETK LER

Microcystin, genellikle *Microcystis* spp. türleri tarafından üretilen bir endotoksindir. Tüm endotoksinlerde oldu u gibi microcystin de hücre ölümü gerçekleştikten sonra hücre dı ma çıkar. Ötrofikasyon nedeniyle a ırı miktarda ço alan toksik türlerden dolayı ötrofik sularda bir süre sonra normal sınırların çok üzerinde toksin de erleri görülür. Bu olay gerçekleşti inde kontamine suyla ili kide olan tüm canlılar toksinlerin olumsuz etkisine maruz kalır. Dünya Sa lık Örgütü, microcystin-LR konsantrasyonunun içme suyunda insan sa lı ı açısından  $1\mu\text{g/l}$ 'yi a maması gerekti ini belirtmiştir (36).

Akuatik bir ortamın organik madde yönünden zenginli i tam olarak besin zincirinin i lemesine ba lıdır. Besin zincirinde ilk halkayı fitoplankton türleri, ikinci halkayı ise

zooplankton türleri olmaktadır. Bir çok zooplankton; alg, detritus ve bakteriden oluşmuş biyosüspansiyonları filtre ederek beslenmektedir. Toksik *Microcystis* türlerini sindirebilen zooplankton türleri microcystinin olumsuz etkilerine maruz kalmaktadır. Ayrıca suda bulunan microcystin miktarına bağlı olarak zooplankton türlerinde farklı hassasiyetler gelişmektedir. Örneğin *Daphnia magna*, suda 0,05 mg/l miktarda çözünmüş toksinin varlığında 48 saat içinde ölmektedir. Ancak bu sadece her zooplankton için öldürücü etkiye yol açmamaktadır (57).

*Phragmites australis*, *Ceratophyllum demersum* ve *Elodea canadensis* gibi makrofitlerin microcystin-LR'ı absorbe ettiği bilinmektedir. Microcystin içeren sulaşan tarım bitkilerinin büyüme ve gelişme amaçlarında sorunlarla karşılaşmaktadır. Ayrıca bu bitkilerde zamanla biriken toksinler insanlara besin zinciri yoluyla geçmektedir (58). Böylece kontamine sularla ilişkide olmayan insanlar dahi microcystinin olumsuz etkilerine maruz kalırlar.

Mavi yeşil alglerin artışıyla beraber artan toksin miktarından en fazla etkilenen organizmaların başta balıklar gelmektedir. Şu ana kadar tüm dünyada toksik mavi yeşil alg kaynaklı birçok balık ölümü rapor edilmiştir. Örneğin İstanbul'un en önemli içme suyu rezervuarı olan Ömerli Barajı'nda *Microcystis aeruginosa*'nın artışı gösterdiği dönemlerde eş zamanlı olarak çok sayıda balık ölümleri görülmüştür. Microcystine bağlı olarak gelişen balık ölümleri aynı zamanda ekonomik kayıplara da neden olmaktadır. Küçükçekmece gölünde meydana gelen ileri derecede ötrofikasyon sonucunda 1950'li yıllarda avcılığı yapılan 15.000 ton civarındaki balık miktarı önemli oranda azalma göstermiştir. İnsanlar microcystin birikimine maruz kalan balıkları tükettiklerinde (özellikle balık karaciğerinin tüketilmesi) bu canlılarda biriken toksinlerin insanlara transfer edildiği rapor edilmiştir. Bu yüzden besin zincirinin en üst seviyesinde olan insanlar sadece su yoluyla değil microcystinle kontamine olan bitkileri, omurgalı (balık, çiftlik hayvanları) ve omurgasız (midye, kerevit) canlıları tüketerek de microcystini vücutlarına alırlar (59,60).

Kontamine su kaynaklarını kullanan vahşi hayvanlar, çiftlik hayvanları ve kedi, köpek gibi evcil hayvanlar da toksinlerin tüm olumsuz etkilerine maruz kalmaktadırlar. Microcystin özellikle karaciğerde hasara neden olduğundan akut veya kronik olarak bu

toksine maruz kalan canlılarda toplu ölümlere kadar varan olaylar rapor edilmiştir. Ayrı miktarlarda toksik mavi-ye il alg artımının görüldüğü bir gölden su içen çiftlik hayvanlarında görülen ölümcül intoksikasyon olayı ilk olarak 1878 yılında belgelenmiştir ve bu ölümcül olay sadece koyun, at, sığırcı, domuz gibi çiftlik hayvanlarını değil köpekleri, balıkları, amfibianları, kemirgenleri, su kuşlarını, yarasaları, zebra ve gergedanları da etkilemiştir (39).

Microcystinin insanlar üzerindeki etkileri hakkında bilinenler, epidemiyolojik verilere, intoksikasyonlara ve laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan toksikolojik çalışmalara dayanmaktadır. Microcystine karşı laboratuvar memelilerinde gelişen semptomların insanlarda da benzer şekilde geliştiği düşünülmektedir. Ancak deney hayvanları üzerinde yapılan toksikasyon çalışmaları yetersizdir. Bu nedenle, microcystinin insanlar üzerindeki etkisini belirleme konusunda epidemiyolojik çalışmalar temel alınır. Buna kadar microcystinin insanlar üzerinde ölüm olayını da içeren akut ve kronik etkilere sahip olduğu birçok çalışmayla gösterilmiştir. Microcystin tarafından meydana gelen akut intoksikasyon olayları ayrı miktarda çok alan toksin üreten türlerin lizisi sonucu toksinlerin suya geçmesi ile eş zamanlı olarak gerçekleşmiştir. Kontamine suların solunması bu suların oral yolla vücuda geçmesinden çok daha tehlikelidir. Buradan microcystinle kontamine olan sularda yüzmenin ve su sporları yapmanın ne kadar tehlikeli olduğu anlaşılmaktadır. Microcystinin karaciğer hücrelerinde neden olduğu protein fosforilasyonu sonucunda hepatositlerin yapısı bozulur, nekroz ve intrahepatik hemoraji gelişir. Özellikle yüksek dozda toksine maruz kalınması bu olayların ardından ölüm gerçekleşebilir. Microcystinin gastrointestinal sistem üzerindeki tipik etkisi enterosit deformasyonu, gastroenterit ve hemorajidir. Böbrekler üzerindeki etkisi ise glomerulus ve toplama tubullerinde lezyonların ve hücre hasarının oluşmasına neden olmaktadır. Böbrekler üzerindeki bu olumsuz etkilerin ardından kandaki üre, kreatinin, azot ve potasyum düzeylerinde dikkate değer bir artış görülmektedir. Microcystinin potansiyel tümör promotörü olduğu deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalarıyla tespit edilmiştir. Bu nedenle içme sularıyla birlikte sürekli olarak alınan düşük dozda microcystin konsantrasyonunun uzun vadede halk sağlığı açısından kanser riski gibi ciddi sorunlar oluşturacağı düşünülmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar microcystin içeren suları kullanan topluluklarda kolorektal kanser ve primer karaciğer kanserinin görülme sıklığının arttığını göstermektedir. Ayrıca bu çalışmalar çocukların, yaşlıların

ve hepatit-B hastalarının microcystinin toksik etkisine karşı çok daha hassas olduklarını da belirtmektedir. Microcystinlerin protein fosfataz 1 ve 2 A'yı inhibe etmesi sonucu gelişen hücre iskeleti deformasyonu sıklıklı bir hücrenin tümör hücresi ne dönüşmesine neden olabilir. Microcystin ekstraktı verilen farelerde deri kanserine, sıçanlarda ise karaciğer kanserine yakalanma sıklığının arttığı tespit edilmiştir. Çin'de yapılan çalışmalarda insanlarda görülen kolorektal ve karaciğer kanserinin sula rdaki microcystin konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak arttığı tespit edilmiştir (10, 39, 58, 61).

Mavi yeşil algler tarafından üretilen hepatotoksinlerden kaynaklı insan ölümlerini belgeleyen ilk olay 1996 yılında Brezilya'nın Caruaru şehrinde bir diyaliz kliniğinde gerçekleşmiştir. 1996 yılınınubat ayında, rutin renal dializ uygulaması yapılan 131 hastanın 116'sında baş ağrısı, bulanık görme, mide bulantısı ve kusma şikayetleri olmuştur. Bu şikayetlerin ardından 20 ubatta ilk ölüm vakası gerçekleşmiştir. Daha sonra 100 hastada akut karaciğer yetmezliği gelişmiştir. Bu hastaların 52'si, ubanda Caruaru sendromu olarak adlandırılan genel bir sendromla Aralık 1996'da ölmüştür. Klinikte kullanılan su ve serumdan alınan örneklerle hastaların karaciğer dokularından alınan örnekler incelendiğinde suyun toksik cyanobacteria türleri ile kontamine olduğu ortaya çıkmıştır. Yapılan incelemelerde diyaliz hastaları için kullanılan su kaynağında 1990 yılından itibaren toksik cyanobacteria türlerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Makulruların karaciğer dokuları incelendiğinde, hücre deformasyonu, nekroz, apoptoz, kolestaz, vakuolizasyon, lökosit infiltrasyonu ve multinükleer hepatosit oluşumları gözlenmiştir. Bu patolojik tablonun microcystine maruz bırakılan deney hayvanlarında gelişen patolojik durumlarla çok büyük benzerlikler ta dılmış görülmüştür. Pernambuco eyaleti sağlık uzmanlarının raporuna göre diyaliz için kullanılan suyun klorlama işlemine tabi tutulduğu anlaşılmıştır. Klorlama işleminden dolayı suda bulunan toksik mavi yeşil algler deforme olmuş ve toksinler hücre dışına salınmıştır. Bu nedenle serum yapımı için kullanılan suyun toksin miktarı ölümcül boyutlara ulaşmıştır (62).

Microcystin suda yüksek derecede stabildir ve kaynatmaya karşı dirençlidir. Bu nedenle yüzey sularını direkt olarak kullanan az gelişmiş ülkelerde yaayan insanlar ciddi bir risk altındadır. Birçok göl, gölet ve akarsuda evsel ve endüstriyel atıksulardan dolayı ötrofikasyon gelişmektedir (Tablo 2.3). İçme suyu olarak kullanılan su kaynakları

microcystinle kontamine olmu sa geleneksel su arıtma i lemleri bu toksini uzakla tırmak için yeterli olmaz. Microcystini içme sularından uzakla tırmak için ozonlama ve aktif karbon gibi geli mi su arıtım tekniklerinin kullanılması gerekmektedir.

Tablo 2.3 : Mavi ye il alglerle ilgili sa lık sorunlarına örnekler : GH, gastrointestinal hastalık; SN, saman nezlesi; H, intestinal hasar; BH, böbrek hasarı; KH, karaci er hasarı; SSH, sinir sistemi hasarı; RE, rapor edilmemi ; PK, primer k araci er kanseri; TT, tanımlanamamı türler (59).

Bölge	Su Arıtım ekli	Cyanobacteria Türü	Sa lık Sorunu
Avustralya, 1979	Bakır sülfat	<i>Cylindrospermopsis</i>	GH, KH, BH, H
Avustralya, 1981	Bakır sülfat	<i>Microcystis</i>	KH
Avustralya	RE	<i>Microcystis, Nodularia</i>	SN
Avustralya, 1992	RE	TT	GH
Avustralya, 1992	Kontaminasyon	<i>Anabaena circinalis</i>	Çoklu Semptom
Brezilya, 1996	Karbon filtrasyonu, microfiltrasyon, anyon-katyon de i im filtrasyonu, kum filtrasyonu	<i>Cylindrospermopsis, Microcystis, Anabaena</i>	KH, SSH, GH
Brezilya, 1988	Bakır sülfat	<i>Microcystis, Anabaena</i>	GH
Kanada		TT	GH, SSH
Çin	RE	<i>Microcystis</i>	Kolarektal kanser
Çin, 1972-1990	RE	<i>Microcystis aeruginosa</i>	PK
Hindistan	RE	<i>Anabaena</i>	GH
Do u Prusya	RE	<i>Anabaena</i>	GH, SSH
Finlandiya	RE	TT	SN
Filipinler	RE	TT	GH
Portekiz	RE	<i>Aphanizomenon flos-aque</i>	GH
Portekiz	RE	<i>Aphanizomenon, Microcystis, Anabaena, Oscillatoria</i>	KH
sveç, 1994	Kontaminasyon	<i>Planktothrix agardhii</i>	GH
ngiltere, 1989	Kontaminasyon	<i>Microcystis aeruginosa</i>	GH, SSH
Amerika, 1975	RE	<i>Lyngbya, Plectonema, Phormidium, Schizothrix</i>	GH
Amerika	Kontaminasyon	<i>Aphanizomenon, Anabaena</i>	GH, SN
Amerika	Çe itli arıtım sistemleri	<i>Microcystis, Anabaena, Cylindrospermopsis</i>	PK
Amerika, 1930-1931	Filtrasyon, Klorlama, Çöktürme	<i>Microcystis</i>	GH
Zimbabve, 1960-1965	RE	<i>Microcystis aeruginosa</i>	GH

## 2.10. MICROCYSTIN ÜRETİMİNİN GENETİK TEMELİ

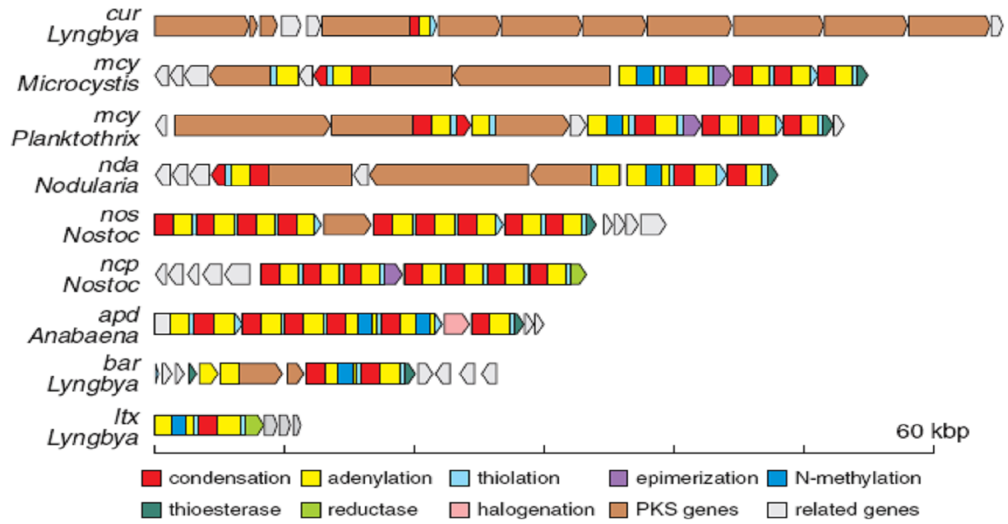
Mavi yeşil algler diğer tüm prokaryotlar gibi kromozomal DNA ve daha küçük, bağımsız ekstrakromozal moleküller olmak üzere iki tip DNA içerir. Genom boyutu farklılıklar gösterir. 128 cyanobacteria su yula yapılan bir çalışmada tek hücreli su ların genom boyutunun  $1,6 \times 10^9$  Da civarında olduğu ve diğer prokaryotların genom boyutundan çok farklı olmadığı gözlenmiştir. Filamentli sularda ise  $8,6 \times 10^9$  Da civarında olan genom boyutunun diğer prokaryotlar için oldukça büyük olduğu görülmüştür. Büyük genomu olan sularda, morfolojik farklılaşma ve nitrojeni fikse edebilme yeteneği gibi özelliklerin olması beklenirken, bu sulardaki DNA'nın büyük bir kısmının kodlama kapasitesi olmayan bazı DNA dizilerinden meydana geldiği görülmüştür (63).

Mavi yeşil alglerin her hücresinde birbirleriyle etkileşim halinde olduğu düşünülen birçok kromozom bulunmaktadır. Bu türlerde yüksek olasılıkla genom etkileşimleri var olmakla birlikte, şuna kadar tespit edilebilmiş herhangi bir kromozomlar arası rekombinasyon olayı yoktur. Hemen hemen tüm mavi yeşil algler plazmid içermektedir. Mavi yeşil alg plazmidlerinin bilinen fonksiyonel bir kodlaması yoktur ve replikasyonlarının düzenleyici mekanizması da halen bilinmemektedir. Çeşitli tek hücreli ve filamentli türlerin kromozomal DNA'sı çok sayıda restriksiyon endonükleazın yıkımına karşı yüksek derecede dirençli olmakla birlikte bu organizmalarda az sayıda restriksiyon enzimi tanımlanmıştır. *AvaI* veya *AvaII* tipi gibi bazı endonükleazlar farklı genuslar arasında yaygın olarak bulunan izo izomerlerdir. Muhtemelen bu durum organizmaların ortak evrimsel kökenleriyle ilişkilidir. Bu türlerde DNA'nın restriksiyon enzimlerinin yıkımına karşı dirençli olmasını açıklayan birçok görüş öne sürülmüştür. Bu durum sıradışı bazlar ile DNA'ya bağlanan proteinler gibi spesifik inhibitörlerin varlığı ve belirli türlerin genomik DNA'sında spesifik tanıma dizilerinin yokluğuyla açıklanabilir (63)

Mavi yeşil algler peptid ve depsipeptidleri içeren birçok sekonder metabolit üretir ve üretilen bu metabolitlerin antikanser, antibakteriyel, antifungal ve proteaz inhibitör etkileri vardır. Çeşitli bioaktiviteleri olan bu bileşikler ilaç yapımı çalışmalarında ve çeşitli biyokimyasal araştırmalarda kullanılmaktadırlar. Sekonder metabolitler ribozom

dı ı peptid sentetaz olarak bilinen bir enzim ailesi tarafından sentezlenir. Bu enzimler ribozomlardaki (poli)peptid formasyonu yoluna bir alternatif olarak peptid biyosentezi için kalıp olarak büyük kompleksler halinde çalışırlar. NRPS, peptidlerin formasyonunu prokaryotlarda ve düşük ökaryotlarda da bulunan tio-templat mekanizması olarak adlandırılan bir mekanizmayla katalizler. NRPS herbirinde aktivasyon, tiolasyon, modifikasyon ve kondensasyon amaçlarından sorumlu bölgeleri bulunan modüllerden oluşmuş modüler bir yapıdır (18,64).

Mavi yeşil alg NRPS genleri 1990'ların ortalarında araştırılmaya başlandı ve ardından bazı suşların NRPS/PKS gen kümeleri bulunup dizilmiştir (ekil 2.5.). İlk olarak dizilenen NRPS geni *Microcystis aeruginosa* PCC7806'dan karakterize edilen microcystin biosentetik kümesinin bir genidir (45).

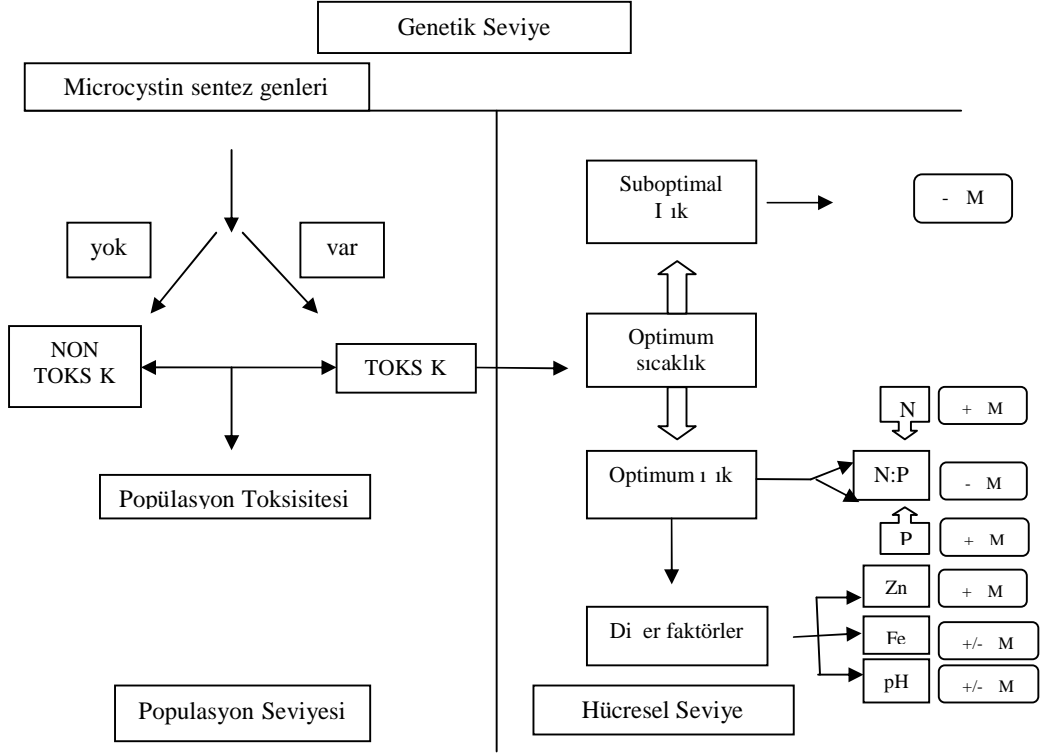


ekil 2.5 : Cyanobacterial NRPS ve NRPS/PKS gen kümeleri (45)

Mavi yeşil alglerin toksisitesi suşları arasında önemli farklılıklar gösterir. Hatta belirli türlerin suşları non-toksik, dermatotoksik, hepatotoksik, nörotoksik veya hem nörotoksik hem hepatotoksik olabilir. *Microcystis* suşlarının microcystin üretimi üç seviyede düzenlenir (ekil 2.6.).

1. Genetik seviye: Belirli bir suşun toksisitesinin belirlenmesinde çok önemli bir faktördür.
2. Hüresel seviye: Toksik suşların toksin üretimi çevresel faktörlerle düzenlenir.

3. Populasyon seviyesi: Toksikite mavi ye il alg komünitelerin toksik ve toksik olmayan su larının oranıyla ilgilidir (10).

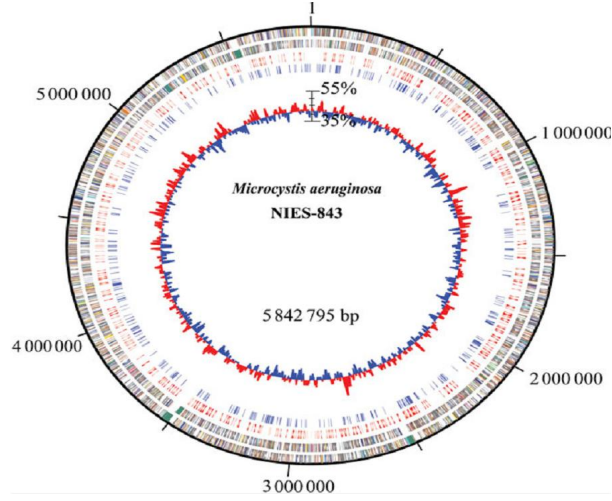


ekil 2.6 : Microcystin üretimini etkileyen genetik, hücre ve populasyon seviyesindeki faktörlerin özeti: M, microcystin (10).

Toksin üretimi açısından bakıldığında microcystin sentezi için gerekli genlerin varlığı diğer faktörlerin varlığından çok daha önemlidir (10).

Microcystinler *mcy* gen kümesi tarafından kodlanan peptid sentetazlar olarak bilinen büyük modüler multifonksiyonel enzim kompleksleri tarafından ribozom dışı yolla sentezlenen birçok sıradışı amino asit içeren küçük halkasal heptapeptid yapıda sekonder metabolitlerdir (64, 65). Microcystin üreten türlerde bulunan peptid sentetaz genlerinin ve özel korunmuş dizi motiflerinin karakteristik modüler yapısı bakteri ve mantarlarda da görülmektedir (66). Microcystin sentezi ile ilgili tüm NRPS genleri (*mcy* gen kümesi) *Microcystis aeruginosa* PCC7806'dan dizilenmiştir (10). Bu güne kadar çeşitli karakterlerde 30 Cyanobacteria türünün genomu dizilenmiştir. Bu türlerden

microcystin üreticisi olan *Microcystis aeruginosa* NIES-843'ün genomu %42,3 GC içeriğine sahip 5.842.795 baz çiftlik halkasal bir moleküldür ( ekil 2. 7).



ekil 2.7. *Microcystis aeruginosa* NIES-843'ün halkasal kromozomunun tematik görünümü: Ölçek, lokasyonu baz çifti olarak göstermektedir. En dıştaki daire saat yönündeki protein kodlayan genlerin pozisyonunu, ikinci daire ise saat yönünün tersindeki protein kodlayan genlerin pozisyonunu göstermektedir. Üçüncü ve dördüncü halkadaki çizgiler MITE (kırmızı) ve IS'nin (mavi) pozisyonlarını, içteki halkalar GC içeriğinin ortalama yüzdesini göstermektedir (67).

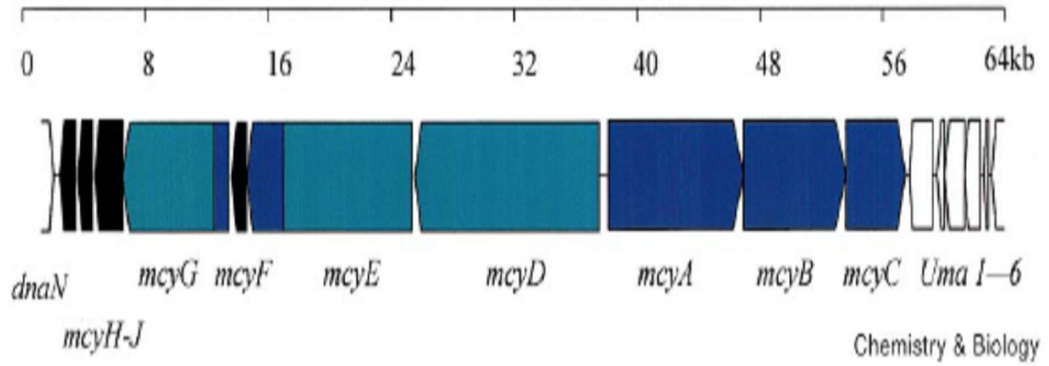
*Microcystis aeruginosa* genomunun dizilenmesiyle bu suya ait genlerinin yapısal ve karakteristik özellikleri belirlenmiştir (Tablo 2.4).

Tablo 2.4. *Microcystis aeruginosa* genomunun ve genlerinin özellikleri (67)

Yapısal özelliklerine göre genler	Genlerinin ve genomunun karakteristik özellikleri
RNA kodlayan genler	Mobil DNA elementleri
Protein kodlayan genler	Toksik ve biyoaktif peptidleri sentezleyen genler
Fonksiyonel domeynler	Gaz vesikülü gelişiminde rol oynayan genler
	ki bileşimli düzenleyici sistem genleri
	Fosfat alınımını düzenleyen genler
	Transkripsiyon faktörleri
	Serin/treonin proteinkinazlar ve fosfatazlar
	Restriksiyon-modifikasyon sistemi
	Fotosentezle ilgili genler

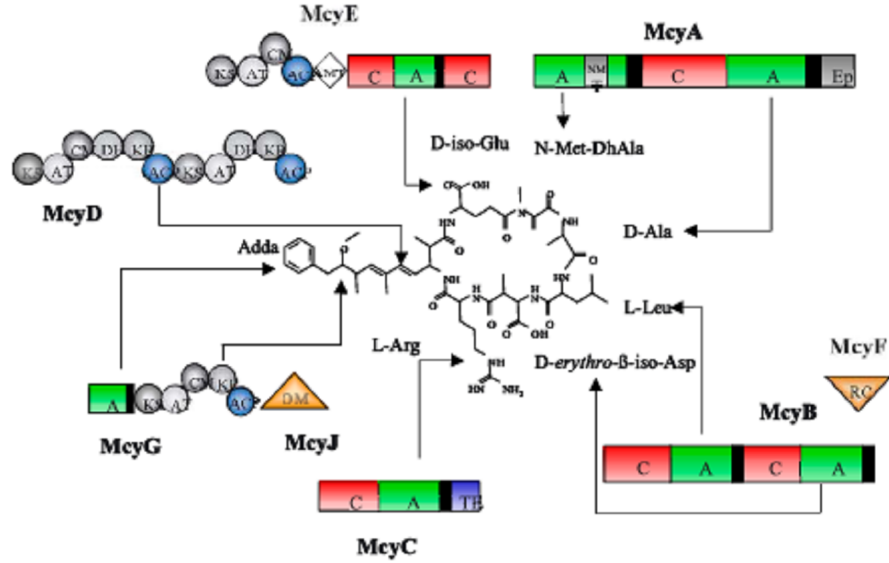
Microcystin sentezleyen gen kümesi NRPS genlerine ek olarak poliketid sentazları ve modifiye edici enzimleri kodlayan genleri içerir. Dizi analizleri *mcy* bölgesinin 10 açık

okuma çerçevesine (*mcyA*, *mcyB*, *mcyC*, *mcyD*, *mcyE*, *mcyF*, *mcyG*, *mcyH*, *mcyI*, *mcyJ*) sahip oldu unu ve 750 baz çiftlik bir promotör bölge tarafından iki operona (*mcyA*'dan *C*'ye ve *mcyD*'den *J*'ye) ayrıldı nı göstermi tir (10, 37). Ayrıca dizi analizleri ile *mcy* bölgesinin iki yönlü operonik bir yapısı oldu u anlaşılmı tır ( ekil 2.8). ki operondan daha büyük olanı (*mcyD-J*) pentaketid kaynaklı -aminoasit ADDA'nın olu umunu katalizleyen ve D -glutamata ba lanmasını sa layan PKS/NRPS modüllerini kodlarken, küçük olanı (*mcyA-C*) dipeptidilleri heptapeptidile çevirerek peptid siklizasyonunu tamamlayan NRPS modüllerini kodlar (52).



ekil 2.8. Microcystin biosentezini gerçekle tiren gen kümesinin organizasyonu: Koyu mavi, NRPS; açık mavi, PKS; siyah, diğer açık okuma çerçeveleri; beyaz, non -microcystin sentetaz açık okuma çerçeveleri (52).

Promotör bölgenin ardında olan *mcyA-C* 5 modül içeren 3 adet NRPS'yi kodlarken promotör öncesindeki *mcyD-J* poliketid sentazları (*mcyD*), hibrid enzimlerini (*mcyE*, *G*) ve ek *tailoring* enzimlerini (*mcyF*, *I*, *J*), ayrıca ABC taşıyıcısının (*mcyH*) bir bile enini kodlar ( ekil 2.9.). Microcystin olu umunda gerekli olan yedi amino asidi, dört asetat birimini ve epimeraz, metiltransferaz, aminotransferaz aktivitelerine sahip domeynleri birle tirmek için gerekli minimum domeyn takımını kapsadığı göz önünde alındığında *mcy* gen kümesinin microcystin biyosentezinde varsayılan 48 ardı ık dizi adımından 45'ini katalizledi i dü ünülmektedir. (64).



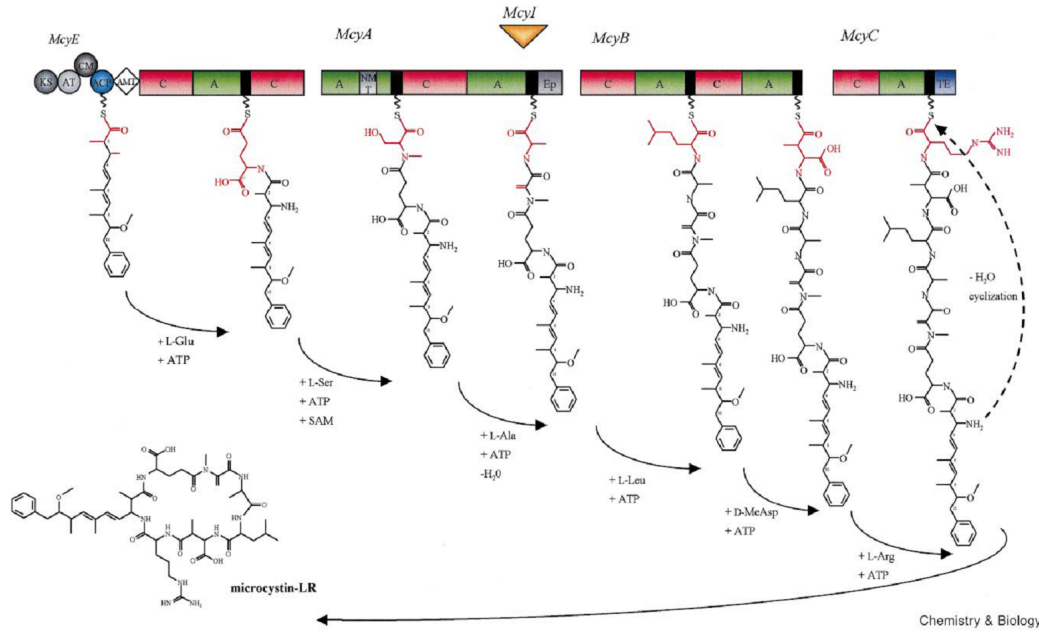
ekil 2.9. Microcystin sentetaz bile enlerinin rolü ve fonksiyonel analizleri. PKS domeynleri: AT, açil transferaz; ACP, açil taşıyıcı protein; KS,  $\beta$ -ketoaçil sentaz, KR, ketoaçil reduktaz; DH, dehidrataz; CM, C-metiltransferaz; AMT, aminotransferaz. NRPS domeynleri: A, aminoaçil adenilasyon; C, kondensasyon; NMT, N-metiltransferaz; EP, epimeraz, TE, tioesteraz; *McyF*, rasemaz; OM (*McyJ*), O-metiltransferaz. Siyah kutular NRPS modülleri tiolasyon motiflerini göstermektedir. Oklar microcystin biyosentezinin adımlarındaki özel proteinlerin görevini göstermektedir (64).

Adda-d-glu öncüsü *myG*, *J*, *D* ve *E* genlerinin olduğu türde bu enzimlerin aktivitesiyle sentezlenir. *McyG*, tipik PKS uzama modülü ile açil-CoA ligazlara benzerlikleri sıradaki bir NRPS adenilasyon domeynini biraraya getiren hibrit bir enzimdir. *McyG* ilk taşıyıcı domeynin 4-fosfopanteteinine transferinin ardından fenil asetatın aktivasyonu aracılığıyla microcystin sentezini başlatır. Sonuç olarak Adda *myG*, *D* ve *E* genlerinin dört PKS modülü tarafından oluşturulur. *McyJ*, bir O-metilasyon aşaması için gereklidir. *McyE*, PKS ve NRPS modüllerinden oluşan hibrit bir proteindir. Glutamat semialdehit aminotransferazlara benzerlikleri olan bir entegre domeyn muhtemelen Adda'nın  $\beta$ -amino grubunu sağlar. Sonuç olarak *myE*'nin ilk kondensasyon domeyni Adda'yı aktive glutamat ile kondansey eder. Böylece microcystin biyosentezinin NRPS kısmıyla PKS kısmını başlatır. *McyA*, *B* ve *C*'nin NRPS modülleri kalan 5 amino asiti aktive eder ve bu amino asitleri oluşan peptid yapısına dahil eder. *McyC*'nin TE domeyninin microcystinin halkasal yapı alması ve microcystin sentetaz kompleksinden ayrılmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir. *myF*, D-aspartat ve büyük olasılıkla D-metil-aspartatı da sağladığı düşünülen bir rasemazdır. *McyI*'nin rolü açıklanmamıştır.

beklemektedir. *McyH*, ABC transporter ile büyük benzerlik gösterdiği için dolayı yüksek olasılıkla microcystin dı a salınımında rol oynamaktadır (64).

Peptid sentetaz genlerinin bazılarının insersiyonal mutagenезleri sonucu toksik olmayan mutantların oluştuğu görülmüştür (37). *Microcystis aeruginosa* PCC7806'daki bir peptid sentetaz geninin insersiyonal inaktivasyonu sonucu bu suyun non-toksik duruma dönüşmesi ve microcystin üretiminin durması *mcyB* olarak adlandırılan bu genin bir microcystin sentetaz kodlayıcısı olduğunu göstermiştir (66).

*mcyABC* operonu üç büyük açık okuma çerçevesine sahiptir. ikinci açık okuma çerçevesi olan 6318 baz çiftlik *mcyB*, her biri adenilasyon, tiolasyon ve kondensasyon domeynlerini içeren iki modülden oluşan 242.334 Da'luk bir peptid sentetaz kodlar (ekil 2.10.) (52).



ekil 2.10. Microcystin-LR'nin biyosentetik modeli ve *mcyA*, *B*, *C*, *E*'nin domeyn yapıları. Her bir daire ve dikdörtgen sırasıyla bir PKS veya NRPS enzimatik domeynini gösterir. Amino transferaz domeyni baklava dilimi ekinde gösterilmiştir. *Tailoring* açık okuma düzeninin aktivitesi (*mcyI*) ters üçgenle gösterilmiştir. KS, -ketoaçil sentaz; AT, açıltransferaz; CM, C-metiltransferaz; ACP, açıl taşıyıcı protein; A, aminoaçil adenilasyon; C, kondensasyon; NM, N-metiltransferaz; Ep, Epimerizasyon; TE, tiyoesteraz; AMT, aminotransferaz. NRPS tiolasyon motifi siyahla gösterilmiştir. Aminoaçil aktivasyon ve kondensasyon düzeni: L-Z-Adda, L-glutamat, L-metilserin, D-alanin, L-lösin, D-metil-aspartat, L-arginin, siklizasyon (52).

L ve D-aminoaçil rezidüleri arasındaki peptid ba ıolu umunu katalizleyen kondensasyon domeynlerinin dizileri ile kar ıla tırılarak *mcyB*'nin amino-terminal domeyni i levsel olarak tanımlanmıştır. Bu tanımlamanın sonucunda, *mcyA*'nın karboksi ucundan gelen D-alanil-peptidil ara bile iinin *mcyB*'nin amino ucundaki bileikle uyumlu oldu u görülmü tür. Microcystinin yapısından dolayı ikinci aktivasyon domeyninin L-lösini aktive etmesi beklenir. *Microcystis aeruginosa* PCC7806'da iki ana microcystin bulunur ve de iken amino asit konumlarında L-arginin ve L-lösün içerir. Lösil ve glutamil veya glutaminil rezidüleri arasında peptid ba ıolu umunda gerekli olan sürfaktin ve likensin sentetazların domeynleri ile *mcyB*'nin ikinci kondensasyon domeyni uyum göstermektedir. Kom u adenilasyon domeyninin tahmini ba lanma bölgesi aspartik asit ve asparjine özg ü bir grup domeyne kar ılıklı gelmektedir (52). *McyBA1* domeyni ya sadece L-lösine özgü yada L-lösün ve L-arginin için multispesifik gibi görünmektedir. *McyBA2*, D-aspartat ve D-metil-aspartatı aktive eder (64).

*Microcystis*'in geleneksel karakterizasyonu morfolojik özelliklere dayandı ı için çok zordur ve farklılıklar genellikle genus seviyesiyle sınırlanır. Morfolojik yöntemlerden kaynaklı tanımlama güçlükleri morfoloji ve toksisite arasındaki korelasyonun güvenilir olmadığını göstermektedir (68). *Microcystis*'in morfolojik temele dayanan tür tanımlaması u sebeplerden kaynaklı olarak geçersiz olabilir; morfospes iyeslerin arasında 16S rDNA'nın dizi farklılı ının az olması, morfolojik görünümleri ile 16S -23S rDNA nükleotid dizileri arasında uyumun yokl u u ile ya asidi kompozisyonunun, GC içeri inin, sıcaklık-tuzluluk toleransının, kemo ve fotoheterotrofinin ayırt edilememesi (67). Buradan da anla ılaca ı gibi moleküler biyoloji metodları *Microcystis* su larını ve özelliklerini tanımlamak için çok daha güvenilir metodlardır. Toksik *Microcystis* türlerini tanımlamak için microcystin sentetaz (*mcy*) gen kümesinin temel alındı ı pek çok çalı ma vardır. Bu yakla ım toksin üretimi ve gen tespiti arasındaki direkt ili kinin avantajını kullanmamızı sa lar. Çünkü toksik olmayan türlerde *mcy* gen kümesi yoktur. Microcystin sentetaz gen kümesindeki *mcyA*, *mcyB* veya adenilasyon domeyni microcystin üretimi ile iyi bir ili ki göstermesine rağmen bazı anomaliler görülmü tür. Örne in bazı *Microcystis* su larında *mcy* gen kümesi tespit edildi i halde toksin üretimi tespit edilememi tir. Bu çeli ki adenilasyon domeynlerinin veya *mcyB* bölgesinin di er

lokuslarla homolojisi ya da toksik olmayan *Microcystis* su larında *mcy* gen kümesinin var olmasıyla açıklanabilir (68).

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

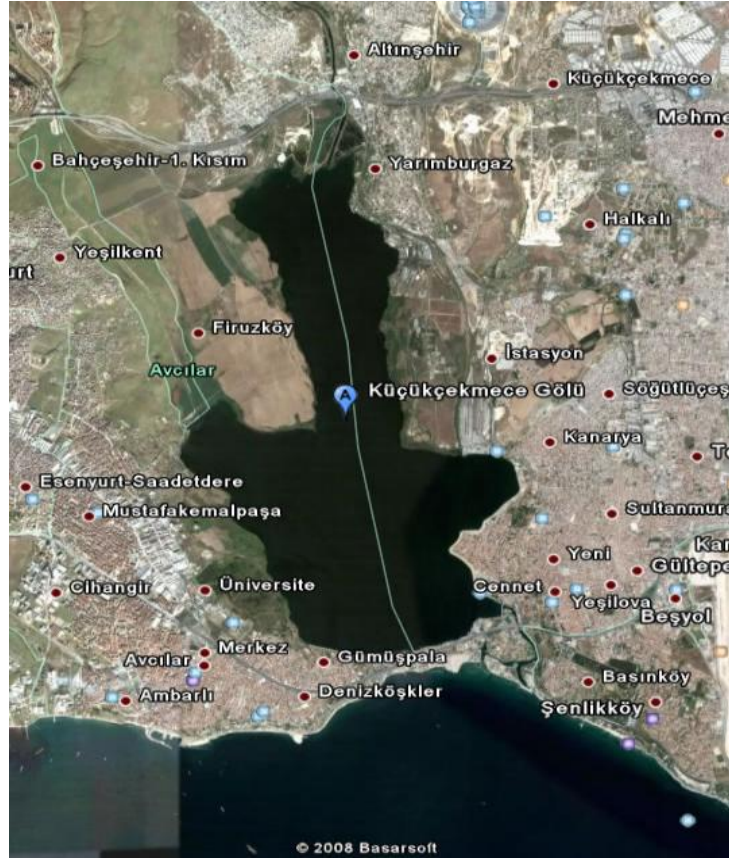
#### 3.1. ÇALIŞMA SAHASININ TANIMI

Küçükçekmece Gölü, İstanbul'un orta batı bölgesinde, 41° 00' N - 28° 43' E enlemleri arasında yer alan, yüzey alanı 15,22 km<sup>2</sup>, en derin yeri yaklaşık 20 m olan ve Marmara Denizi'ne dar bir kanal ile bağlantıdan dolayı lagün özelliği gösteren bir göldür (Şekil 3.1, Tablo 3.1). Gölün en önemli tatlı su kaynakları Nakka Dere, Ekinöz Deresi ve Sazlıdere'dir. Sazlıdere Barajı'nın yapılmasından sonra (1989) önemli miktarda tatlı su kaynağının göle girişi engellenmiştir. Küçükçekmece Gölü'nün su kalitesi, göle girişi yapan tatlı su kaynaklarının evsel ve endüstriyel atıklar ile yoğun şekilde kirletilmesi nedeniyle olumsuz yönde etkilenmektedir (60).

Küçükçekmece ilçesinin 1930'larda 700 civarında olan nüfusu 1980'lerde 81.000'e 2000'li yıllarda ise 600.000'e ulaşmıştır. Bu nüfus artışına paralel olarak gelişmesi gereken su arıtma sistemleri maalesef yetersiz kalmış ve bu nedenle göle aşırı bir nutrient yüküne maruz kalmıştır. Ayrıca önemli miktarda endüstriyel atık direkt olarak göle verilmektedir (22).

Tablo 3.1 : Küçükçekmece Gölünün Genel Özellikleri

Gölün Genel Özellikleri	Birim	
Konum		41° 00' N - 28° 43' E
En yüksek derinlik	M	20
Yüzey alanı	km <sup>2</sup>	15,22
Suyun yenilenme zamanı		Bilinmiyor
Sıcaklık tabakalaşması tipi		Sıcak monomiktik göl



ekil 3.1 : Küçükçekmece Gölü'nün Lokasyonu

### 3.2. ÖRNEKLEME

Microcystin ço almasının görüldü ü Küçükçekmece Gölü'nden Kasım 2006 - Eylül 2007 dönemleri arasında plankton kepçesi ve kapalı su alma kabı kullanılarak su örnekleri alınmıştır.

### 3.3. MICROCYSTIS' N ZOLASYONU

Küçükçekmece Gölü'nden Kasım 2006 ve Eylül 2007 dönemleri arasında alınan su örnekleri .Ü. Su Ürünleri Fakültesi şular Biyolojisi ABD Toksik Cyanobacteria Alg Kültürü Laboratuvarı'na getirilmiştir , aynı gün içerisinde mikroskop altında tanımlanan

*Microcystis* spp. kolonileri pastör pipeti yardımıyla alınarak BG11 ortamına eklenmi tir (Tablo 3.2) (47, 74).

Tablo 3.2 : BG11 Sıvı Besiyeri (47)

BG11 Besi Ortamı	Miktar	*Eser Elementler	Miktar
NaNO <sub>3</sub>	1500 mg	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	40 mg	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,81 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	75 mg	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,222 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	36 mg	NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,39 g
Sitrik asit	6 mg	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,079 g
Ferrik amonyum sitrat	6 mg	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,049 g
EDTA	1 mg	Distile su	1000 ml
NaCO <sub>3</sub>	20 mg		
Eser elementler*	1 ml		
Distile su	999 ml		

### 3.4. DNA ZOLASYON ÇÖZELT LER

#### 3.4.1. TE (TrisEDTA) Tampon Çözeltisi (50 ml, pH : 8,0)

1 M Tris-HCl (pH 8,0)	500 µl
0,5 M EDTA	100 µl
Distile su	49,4 ml

#### 3.4.2. SDS % 10 (50 ml, pH: 7,2)

SDS (Sodyum dodesil sülfat)	5 g
Distile su	50 ml

#### 3.4.3. Lizis Buffer

1 M Tris-HCl (pH: 8,0)	500 µl
0,5 M EDTA	100 µl
5 M NaCl	500 µl
Distile su	48,9 ml

### 3.4.4. Amonyum Asetat Çözeltisi (9,5 M)

Amonyum Asetat	770 g
Distile su	1000 ml

### 3.5. ELEKTROFOREZ ÇÖZELT LER

#### 3.5.1. Agaroz Jel Elektrofözezi için Yürütme Tamponu (TAE, 50X)

Tris baz	242 g
Glasiyal asetik asit	57,1 g
0,5 M EDTA	100 ml
Distile su	990 ml

#### 3.5.2. Agaroz Jel Elektrofözezi için Yükleme Tamponu (6X)

Brom fenol mavisi	% 0,25
Gliserol	% 30
Distile su	10 ml

#### 3.5.3. Etidyum Bromür

Etidyum Bromür	10 mg
Distile su	1 ml

### 3.6. GÜMÜ BOYAMA ÇÖZELT LER

SSCP jellerini boyamak için PlusOne™ DNA Silver Straining Kit (nstructions Genomics) kullanılmı tır (Tablo 3.3).

Tablo 3.3 : Gümü Boyama Çözeltileri

Çözeltiler	Miktar	Süre
Fixing Solüsyon	100 ml	30 dk
Boyama Solüsyonu	100 ml	30 dk
Devoloping Solüsyon	100 ml	6 dk
Durdurma Solüsyonu	100 ml	30 dk
Distile su	>125 ml	1 dk

### 3.7. KULLANILAN ENZİMLER

Proteinaz K, Lizozim, Taq DNA Polimeraz, LA Taq Polimeraz, HinfI, Alu, EcoRI, HindIII.

### 3.8. KULLANILAN PRİMERLER

Tablo 3.4 : Primerler

Primer	Primer Dizisi (5' - 3')	Primer Boyu
Primer 1F	5' GGA GAA TCT TTC ATG GCA GAC AC 3'	23 bç
Primer 1R	5' AAT CTT GAT AAG GAC GCG GTG 3'	21 bç
Primer 2F	5' GTC ATC ATC TTC CTT CAC CGC 3'	21 bç
Primer 2R	5' CAC TTA ATC TCT GTA TTT CAG C 3'	22 bç
Primer 3F	5' GGC TGA AAT ACA GAG ATT AAG TG 3'	23 bç
Primer 3R	5' CTG GAC CTA CAA CCT TAT CTC G 3'	22 bç
Primer 4F	5' ACG AGA TAA GGG TGT AGG TCC AG 3'	23 bç
Primer 4R	5' GAG ATT GCA TGA TTT CAG G 3'	19 bç
Primer 5F	5' CCT GAA ATC ATG CAA TCT C 3'	19 bç
Primer 5R	5' AGG AAC CCC AAT CGG AAG CGG T 3'	22 bç
Primer 6F	5' GAT CAG AAT TTA CAA CCG CTT CC 3'	23 bç
Primer 6R	5' TTC AGC AAT GGT AGG ATG AGC 3'	21 bç
Primer 7F	5' GCT CAT CCT ACC ATT GCT GAA 3'	21bç
Primer 7R	5' CAA ACT CAT TGA CCA ACC ATC AC 3'	23 bç
Primer 8F	5' CAC ATT ATT TGT GAT GGT TGG TC 3'	23 bç
Primer 8R	5' AAG GGA TAA TCG GAA TGT TC 3'	20 bç
Primer 9F	5' GAA CAT TCC GAT TAT CCC TTT G 3'	22 bç
Primer 9R	5' TCG ATG TTT TCT CCG GTG TGG C3'	22 bç
Primer 10F	5' GAC CAA GTT GAA GCC ACA CCG 3'	21 bç
Primer 10R	5' GAG CAA TTT GTA AAC AGT GCC 3'	21 bç
Primer 11F	5' GGC ACT GTT TAC AAA TTG CTC 3'	21 bç
Primer 11R	5' GTT AGA TCA GGA AGC AGT CTG C 3'	22 bç
Primer 12F	5' CGT ACT GGA GAC TTA GGC AGA C3'	22 bç
Primer 12R	5' TCA TCG TTT TTG TCG GGA TTG 3'	21 bç

### 3.9. KÜLTÜR PROSEDÜRÜ

çinde BG11 sıvı besiyeri bulunan petrilere ekilen *Microcystis* kolonileri önce içerisinde BG11 sıvı besiyeri bulunan küçük hacimli erlenlere, daha sonra da büyük hacimli erlenlere aktarıldı. Büyük hacimlerde muhafaza edilen *Microcystis* spp.'nin canlılığını sürdürmek için koloniler 30-45 günde bir yeni besiyerlere ekildi (47, 69). Ayrıca mikroskop altında incelenen kolonilerin başka türlerle kontamine olup olmadıkları kontrol edildikten sonra hücre çapları ölçüldü ve foto rafları çekildi. Kontamine olan sulardan yeniden izolasyon yapıp çoalmaları beklendi. Ara tırma sonunda 15 *Microcystis* su u elde edildi ve her su un görüntüsü foto raflandı.

### 3.10. DNA ZOLASYONU

Geç logaritmik fazdaki *Microcystis* kültüründen 1 ml örnek alındı ve sonikasyon cihazıyla sonike edildi. Sonike edilen örnek santrifüj edildi ve üst sıvı atıldı. Pelete 500 µl Lizis Buffer eklenip süspanse edildikten sonra final konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde lizozim eklenerek 55 °C'de 30 dk inkübe edildi. 10 µl Proteinaz K (10 mg/ml) ve 20 µl SDS (% 10) eklenerek 55 °C'de 10 dk daha inkübe edildi. inkübasyonun ardından örnek buzda so utuldu ve e it hacimde fenol/kloroform/izoamilalkol (25:24:1) eklenerek ekstraksiyon işlemi yapıldı. Organik ekstraksiyon tekrar edildikten sonra 4M amonyum asetat eklendi. Örnek santrifüj edildikten sonra 2 hacim isopropanol eklenerek +4 °C'de 10 dk daha santrifüj edildi. Ü st sıvı atıldıktan sonra 1 ml % 70 etanol eklenerek +4 °C'de 10 dk santrifüj edildi. Ü st sıvı atıldı ve örnek oda ısısında kurumaya bırakıldı. Kuruyan DNA'nın üzerine 100 µl TE eklendi (70).

#### 3.10.1 DNA'nın Miktar ve Saflılığının Ölçümü

Elde edilen DNA'nın nano-drop spektrofotometrede 260-280 nm dalga boylarındaki emilim (absorbsiyon) değerleri ölçüldü. Spektrofotometrede ölçülen değerlerin oranı (OD 260/280) ile elde edilen DNA'nın saflılığı değerlendirildi.

OD 260/280 <1.8 ise protein kontaminasyonu, OD 260/280 >2.1 ise RNA kontaminasyonu olduğu kabul edildi (76).

### 3.10.2. Agaroz Jel Elektroforezi

0,5 g agaroz tartılarak 50 ml TAE solüsyonu içinde çözüldü. Solüsyon ısıtılıp homojenize olana kadar kaynatıldı ve içine 1 µl etidyum bromür (10 mg/ml) eklendi. Ardından çözelti elektroforez tanklarına aktarıldı ve soğuması beklendi. Elde edilen DNA örnekleri brom fenol mavisi içeren yükleme tamponuyla (6X) karıştırılarak % 1'lik agaroz jele yüklendi ve elektroforez işlemi başlatıldı. Bu işlemin ardından jel UV altında CDD kamerasıyla görüntülendi.

### 3.11. PCR (POLİMERAZ ZİNCİRLİ DNA REAKSİYONU)

PCR, biyolojik bir maddede, varlığı bilinen ya da tahmin edilen bir DNA (ya da RNA) parçasının, *in vitro* koşullarda, ölçülebilecek miktarlara kadar çoğaltılması işlemidir. PCR yöntemi, *Taq* DNA Polimeraz enziminin tek zincirli bir DNA molekülünü kalıp olarak kullanmasına ve serbest bir 3' OH ucuna kalıp diziyeye uygun nükleotidleri ekleyebilmesine dayalıdır. Hücre içinde DNA Polimeraz için serbest 3' OH ucu tek zincirli kısa RNA molekülleriyle sağlanırken, *in vitro* koşullarda (PCR) 3' OH uç, yapay olarak üretilen tek zincirli kısa DNA molekülleri ile sağlanır. Primer adı verilen bu tek zincirli DNA molekülleri, PCR'ın seçiciliğini belirleyen esas bileşenlerdir. Primer dizisi kurgulanarak serbest 3' OH ucunun hedef DNA'da bağlanacağı yer, dolayısıyla çoğaltılacak bölge önceden belirlenebilir (71).

DNA örneklerinden hedeflenen bölgelerin çoğaltılması için Long PCR ve PCR yöntemleri kullanıldı. Long PCR ile *mycB* geninin tamamı izole edildi ve diğer PCR'lar için pozitif kontrol olarak kullanıldı. PCR işlemi için, DNA, enzim, MgCl<sub>2</sub>, buffer, primer ve dNTP içeren bir karışım hazırlandı ve bu karışım PCR cihazına konularak çeşitli koşullarda PCR reaksiyonları gerçekleştirildi (Tablo 3. 5, 3.6, 3.7).

### 3.11.1. PCR Karı ımları

Tablo 3.5 : PCR Karı ımları

	PCR 1	PCR 2
H <sub>2</sub> O	12.4 µl	15.35 µl
10X KCl Buffer	-	2.5 µl
10X LA PCR Buffer	2.5 µl	-
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2.0 µl	2.0 µl
dNTP (2.5 mM)	5 µl	2 µl
Primer 1	1 µl	1 µl
Primer 2	1 µl	1 µl
<i>Taq</i> DNA Polimeraz	-	0,15 µl
LA <i>Taq</i> Polimeraz	0.1 µl	-
DNA	1 µl	1
Toplam	25 µl	25 µl

### 3.11.2. PCR Ko ullaı

Tablo 3.6 : PCR 1 Ko ullaı

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

Tablo 3.7 : PCR 2 Ko ullanları

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

### 3.11.3. PCR Sonuçlarının Kontrolü

0,2 µl'lik tüplerde 25 µl'lik karı ım içinde gerçekte tirilen PCR reaksiyonunun sonuçlarını kontrol etmek için, PCR ürününden 5 µl'lik örnek alındı ve TAE tamponundaki % 2'lik agaroz jele 6X yükleme tamponu ile birlikte yüklendi. Ürün boylarını ölçebilmek için jele pUC- mix marker 8 ve PST i aret örne i de yüklendi. Agaroz jele yüklenen örnekler 90 volt ve 70 mA akımda yaklaşık 30 dakika yürütüldü. Jel translüminatör kullanılarak UV altında CDD kamerasıyla görüntülendi.

### 3.12. ENZİM KESİMİ

Restriksiyon enzimleri DNA'yı özgül bölgelerden keserek çe itli uzunluklarda parçalara ayıran enzimlerdir. Sıklıkla kullanılan enzimler arasında HinfI, EcoRI, HindIII gibi enzimler sayılabilir (72).

Tablo 3.8 : Enzim Kesimi Karı ımları

	HinfI	Alu	EcoRI	HindIII
H <sub>2</sub> O	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl
10X Buffer	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl
Enzim	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
PCR Ürünü	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Toplam	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl

Enzim kesimi için hazırlanan karışımla birlikte PCR ürünleri gece boyunca 37 °C'de inkübe edildi. Ardından enzim kesiminin gerçekleştirildiğini anlamak için % 2'lik agaroz jele yüklenen ürünler UV altında CDD kamerasıyla görüntüldü.

### **3.13. SSCP (TEK ZİNCİRLİ DNA KONFORMASYON POLİMORFİZMİ)**

SSCP, tek zincirli DNA molekülünün poliakrilamid jeldeki yürüme tarzının molekülün biçimine bağlı olduğunu varsayımına dayanır. Tek zincirli DNA molekülünün biçimi, yani kendi üzerine katlanma tarzı ise ortamın fizikokimyasal durumuna ve DNA'nın baz dizisine bağlıdır. Dolayısıyla aynı fizikokimyasal koşullar altında, aynı diziye sahip tek zincirli DNA moleküllerinin aynı biçimde katlanacakları ve poliakrilamid jelde aynı tarzda yürüyecekleri varsayılır. Dizisinde bir farklılık olan DNA molekülünün ise aynı fizikokimyasal koşullar altında farklı bir katlanma biçimine sahip olacağı, bunun da örneğin jeldeki yürüme tarzını değiştireceğidir (73).

#### **3.13.1. Örneklerin Hazırlanması ve Elektroforez**

PCR ve enzim kesimi ile elde edilen ürünler SSCP yöntemiyle incelenmek üzere poliakrilamid jellere yüklendi. Ürünleri yüklemek için ticari poliakrilamid jeller (Amersham Biosciences) kullanıldı. Ürünler jele yüklenmeden önce 95 °C'de 4 dakika boyunca denatüre edildi. Jellere yürütme tamponu ile birlikte yüklenen denatüre örnekler 232 voltta 15 °C'de yürütüldü. Yükleme tamponunda bulunan ve örnekle birlikte jele yüklenen brom fenol mavisi ve ksilen siyanol boyalarının yürüyüşleri, düzeneğin voltajı, direnci ve sıcaklığı takip edilerek elektroforez kontrol edildi. Belirli bir süre sonunda elektroforez işlemi durduruldu ve jeller boyama için elektroforez düzeneğinden alındı.

#### **3.11.2. Gümüş Boyama**

Elektroforez cihazından alınan jeller PlusOne™ DNA Silver Straining Kit (instructions Genomics) kullanılarak boyanmıştır. Boyanan jellerin görüntüsü scanner cihazıyla taranarak kaydedilmiştir.

### 3.12 D Z LEME

SSCP yöntemiyle incelenen örnekler arasında farklı morfoloji gösterenler REF GEN (Teknokent ODTÜ) Laboratuvarında sekanslandı.

.Ü. Su Ürünleri Fakültesi İçsular Biyolojisi ABD Toksik Cyanobacteria Alg Kültürü Laboratuvarı'nda bulunan *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 su undan elde etti imiz *mcyB* gen dizisi ve NCBI gen identifikasyon (gi) numarası 159029556 olan *Microcystis aeruginosa* PCC 7806'nın DNA dizisi referans dizi olarak kullanıldı. DNA sekans sonuçları her iki referans DNA dizisiyle de karşılaştırıldı.

## 4. BULGULAR

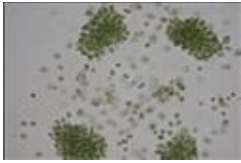
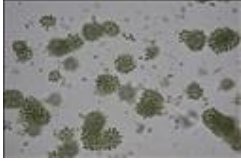







### 4.1. *M. CROCYSTIS* SU LARININ TANIMLANMASI

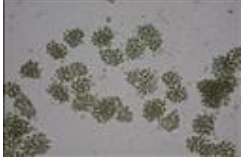
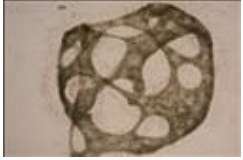
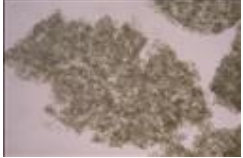



Küçükçekmece Gölü'nden alınan su örneklerinden izole edilen *Microcystis* spp. kolonilerinin BG11 besi ortamında çoğalmaları sağlandı. Bazı *Microcystis* sularının kontamine olduğu görüldü ve izolasyon amaçlı tekrar edildi. Ancak yeniden izolasyonu yapılan suların bir kısmı canlılığını yitirdi bir kısmı da monoklonal hale getirilemedi. Aynı zamanda kontaminasyon sorunu olmayan suların bazıları zaman içinde canlılıklarını kaybetti. İzolasyon ve kültür amaçlarının sonunda 15 *Microcystis* suyu elde edildi. Çalınan maddeler kullanılarak 15 su çeşitli derinliklerden alınan örnekler (Mic 1, 2, 3, 4, 5) ile yüzey örneklerinden (Mic 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, ) izole edilen suların olduğu görülmektedir. Ayrıca Küçükçekmece ve Taşlısu Gölleri'nden 2005 yılında izole edilen *Microcystis* genusuna ait 3 su daha çalınan maya eklendi. Bu suların tür tayin anahtarları yardımıyla *Microcystis* genusuna ait oldukları tespit edildi (47,74).

*Microcystis aeruginosa* PCC 7806 ile Küçükçekmece ve Taşlısu Gölleri'nden izole edilen örnekler (mic16, 17, 18) uzun süre kültür koşullarında kaldıklarından dolayı koloni yapıları bozulduğundan koloni formları görüntülenemedi. Suların hücre çapları ölçüldü ve hücre boyutlarının ortalama 5.4 µm olduğu belirlendi. Hücre çapları ölçülürken her su için ortalama 50 hücre sayıldı (Tablo 4.1).

Tüm suların DNA izolasyonları lizozim ve fenol-kloroform kullanılarak gerçekleştirildi. DNA izolasyonlarının ardından yapılan PCR'lar sonucunda Taşlısu Gölü'nden izole edilen Mic 18 suunda *mcyB* geni tespit edilemedi ve bu suyun toksik olmadığı düşünüldü. Bu nedenle çalınan maya diğer 17 suyla devam edildi. Daha önceki çalınan maddelerde *Microcystis aeruginosa* PCC 7806'nın microcystin gen kümesi dizilendi ve *mcyB* geninin gen ve protein dizisi tespit edildiği için *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 referans suyu olarak kullanıldı (75).

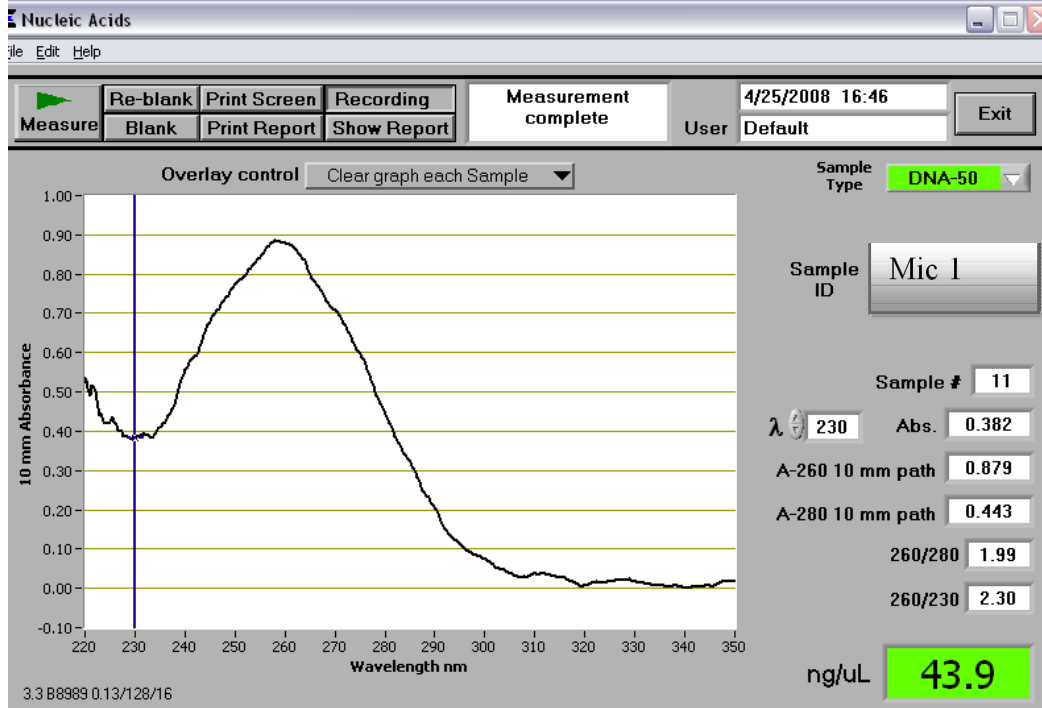
Tablo 4.1 : *Microcystis* spp. su ları ve özellikleri

Su Adı	Tür	Tarih	Hücre Çapı	Koloni Yapısı
PCC 7806	<i>Microcystis aeruginosa</i>	-	-	-
Mic 1	<i>Microcystis</i> spp.	08.11.2006	5.4µ	
Mic 2	<i>Microcystis</i> spp.	08.11.2006	5.4µ	
Mic 3	<i>Microcystis</i> spp.	08.11.2006	5.4µ	
Mic 4	<i>Microcystis</i> spp.	08.11.2006	5.4µ	
Mic 5	<i>Microcystis</i> spp.	06.12.2006	5.4µ	
Mic 6	<i>Microcystis</i> spp.	24.07.2007	5.4µ	
Mic 7	<i>Microcystis</i> spp.	24.07.2007	5.4µ	
Mic 8	<i>Microcystis</i> spp.	24.07.2007	5.4µ	
Mic 9	<i>Microcystis</i> spp.	24.07.2007	5.4µ	

Mic 10	<i>Microcystis</i> spp.	23.05.2007	5.4μ	
Mic 11	<i>Microcystis</i> spp.	23.05.2007	5.4μ	
Mic 12	<i>Microcystis</i> spp.	25.09.2007	5.4μ	
Mic 13	<i>Microcystis</i> spp.	25.09.2007	5.4μ	
Mic 14	<i>Microcystis</i> spp.	25.09.2007	5.4μ	
Mic 15	<i>Microcystis</i> spp.	25.09.2007	5.4μ	
Mic 16	<i>Microcystis</i> spp.	2005	-	-
Mic 17	<i>Microcystis</i> spp.	2005	-	-
Mic 18	<i>Microcystis</i> spp.	2005	-	-

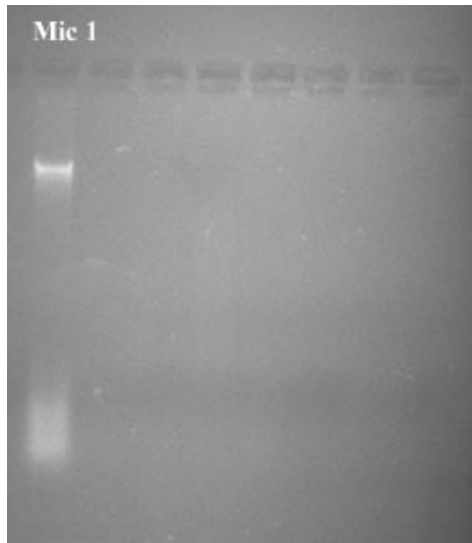
## 4.2. DNA ZOLASYON SONUÇLARI

*Microcystis* su larından yapılan DNA izolasyonu sonucunda PCR i lemi için yeterli saflıkta ve miktarda DNA elde edilip edilmedi ini anlamak için izol e edilen DNA'ların spektro de erlerine bakıldı ( ekil 4.1). TE tamponu içinde çözülen DNA'nın 260 nm dalga boyunda pik verdi i görüldü. Ayrıca OD 260/280 oranı 1.8 ile 2.1 de erlerinin arasında oldu u için herhangi bir protein veya RNA kontaminasyonunun ol madı ı dü ünüldü (76).



ekil 4.1 : Mic 1 su una ait DNA konsantrasyon de erleri

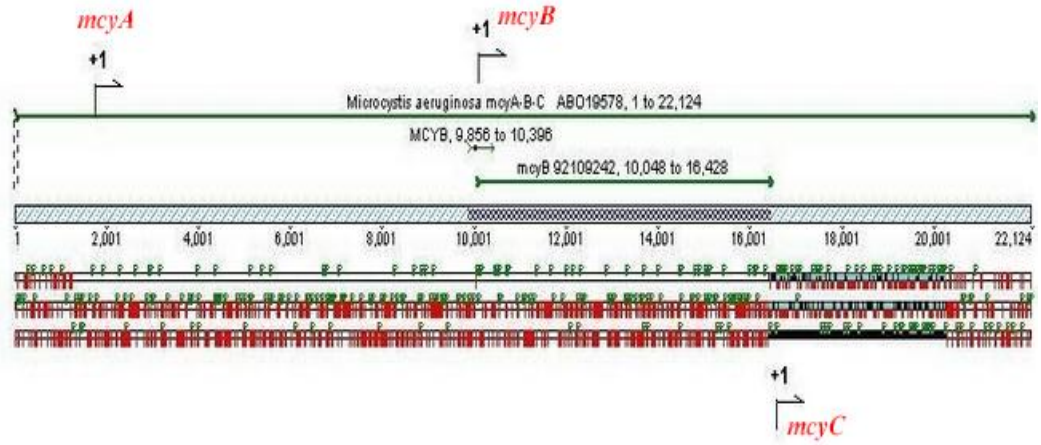
zole edilen DNA'ların spektro de erlerine bakıldıktan sonra agaroz jel elektroforeziyle genomik DNA görüntülendi ( ekil 4.2).



ekil 4.2 : Mic 1 genomik DNA'sının agaroz jel görüntüsü

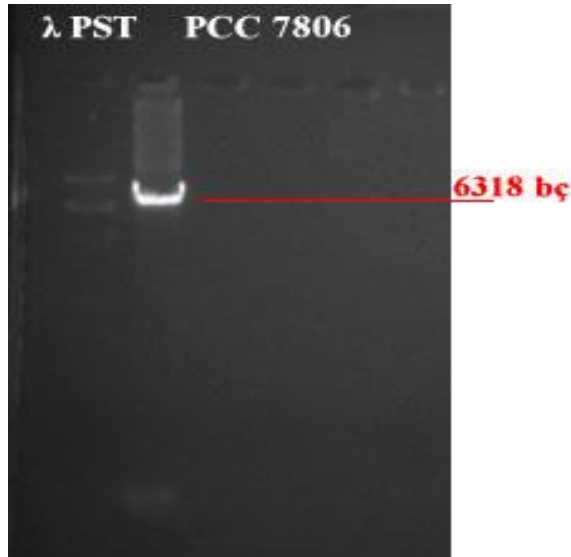
### 4.3. PCR SONUÇLARI

İlk olarak 6318 baz çiftlik *mcyB* geninin tamamı long PCR yöntemiyle referans su olarak kullanılan *Microcystis aeruginosa* PCC 7806'dan amplifiye edildi. Ço altılan bölgenin ematik görünümü ekil 4.3'te gösterildi i gibi dir.



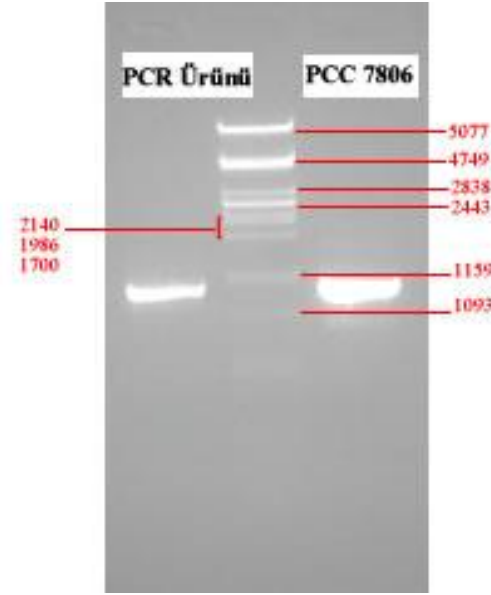
ekil 4.3 : *mcyB* geninin genomik organizasyonu

Amplifiye edilen *mcyB* geni agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi ( ekil 4.4).



ekil 4.4 : *Microcystis aeruginosa* PCC 7806'dan izole edilen *mcyB* geninin agaroz jel görüntüsü. PST : Marker.

PCR yöntemiyle ço altılan bölgenin hedefledi imiz bölge olup olmadı ndan emin olmak amacıyla Nested PCR yapıldı. Bu kez örnek olarak hem ço altılan PCR ürünü hem de *Microcystis aeruginosa* PCC 7806'dan izole edilen DNA kullanıldı ve her iki ürünün agaroz jel elektroforezinde yakla ık 1000 bazlık bir bant görüntüsü vermesi beklendi ( ekil 4.5).



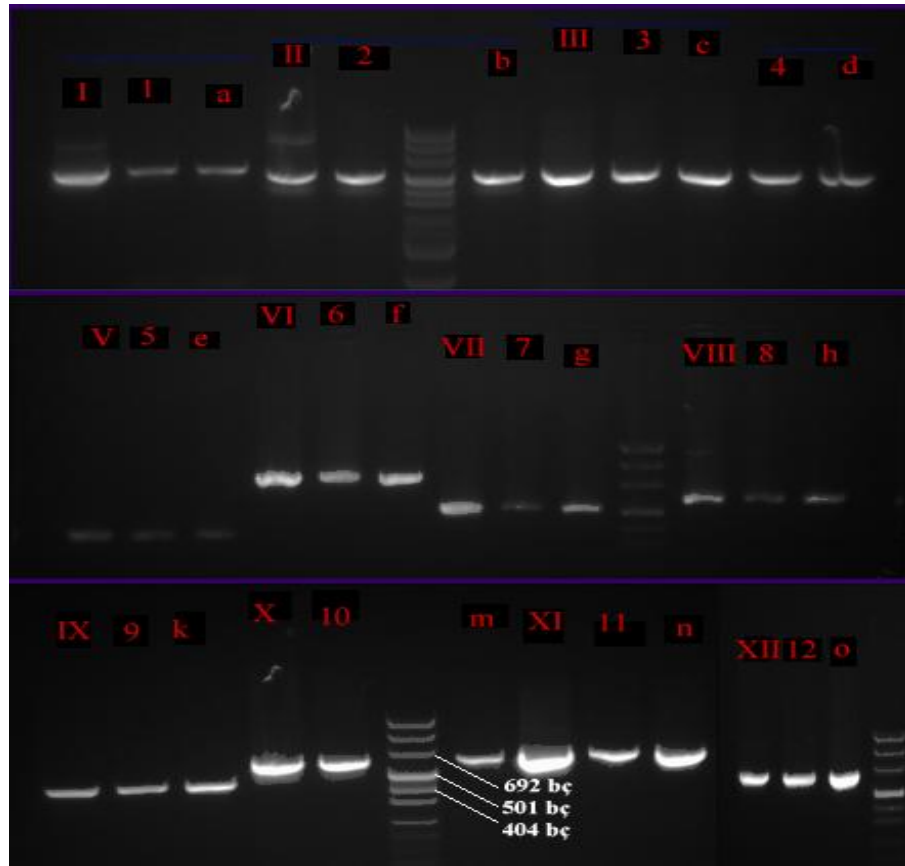
ekil 4.5: *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 ve *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 PCR ürününün (6318 bç) agaroz jel görüntüsü. Marker: PST

ekil 4.5'te de görüldü ü gibi bant boyları aynı olan PCR ürünleri amplifiye edilen bölgenin hedef bölge oldu unu göstermektedir. Bu a amadan sonra *Microcystis aeruginosa* PCC 7806'dan ço altılan *mcyB* geni klasik PCR'lar için pozitif kontrol olarak kullanıldı.

*mcyB* geni PCR reaksiyonlarıyla 12 bölgeye ayrıldı (Tablo 4.2). Her bölgenin PCR sonuçları agaroz jel elektroforezi ile de erlendirildi. Agaroz jel elektroforezi görüntüleri de erlendirildi inde herhangi bir non -spesifik bant olu umu görülmeydi. Ayrıca pozitif kontrolün bant boyutuyla di er ürünlerin bant boyutları arasında farklılı a rastlanmadı. Böylece PCR i leminin optimizasyonu tamamlanmı oldu ( ekil 4.6).

Tablo 4. 2: PCR reaksiyonları sonucunda elde edilen ürün boyları

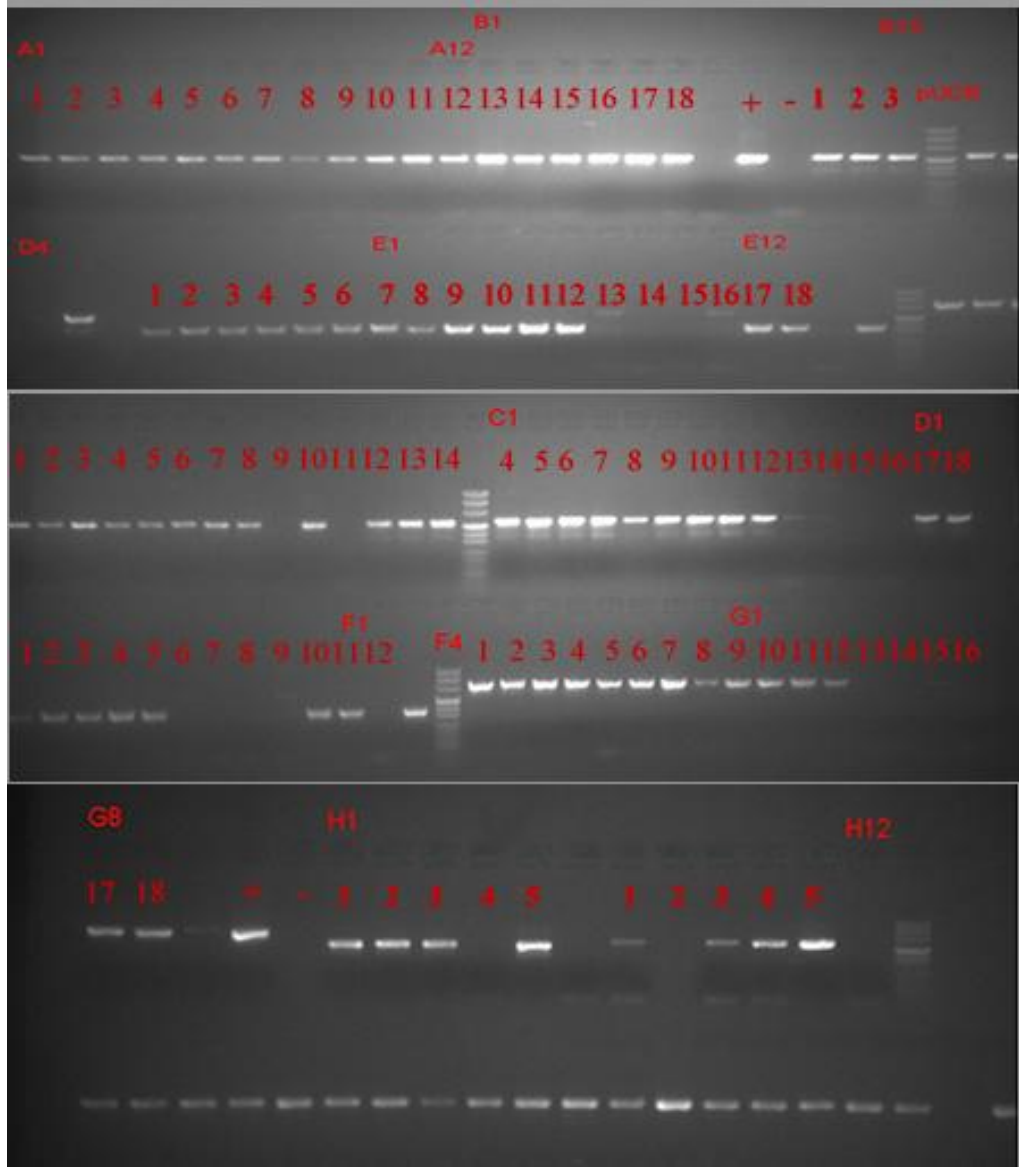
Primerler	Ürün boyu	Bölge
Primer 1F – 1R	557 bç	1
Primer 2F – 2R	482 bç	2
Primer 3F – 3R	515 bç	3
Primer 4F – 4R	523 bç	4
Primer 5F – 5R	324 bç	5
Primer 6F – 6R	711 bç	6
Primer 7F – 7R	477 bç	7
Primer 8F – 8R	564 bç	8
Primer 9F – 9R	429 bç	9
Primer 10F – 10R	592 bç	10
Primer 11F – 11R	602 bç	11
Primer 12 F – 12R	617 bç	12



ekil 4.6 : *mcvB* genine ait PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri. Roma rakamları: Pozitif kontrol (*Microcystis aeruginosa* PCC 7806). Rakamlar: Mic1; Harfler: Mic2; Marker: pUC 8.

PCR optimizasyonu tamamlandıktan sonra tüm örneklerin PCR i lemüne geçildi. Ço altılan bölgelerin görüntüleri alındı nda bazı örneklerin PCR reaksiyo nunun gerçekleşmedi i görüldü ( ekil 4.7). Bu nedenle ço altılamayan bölgelerden yeni

PCR'lar yapıldı. Bazı örneklerin PCR optimizasyonları tekrar edildi ve sonuçta izole edilen DNA örneklerinin tüm bölgeleri çoğaltıldı. Elde edilen ürünler -20 °C'de muhafaza edildi.



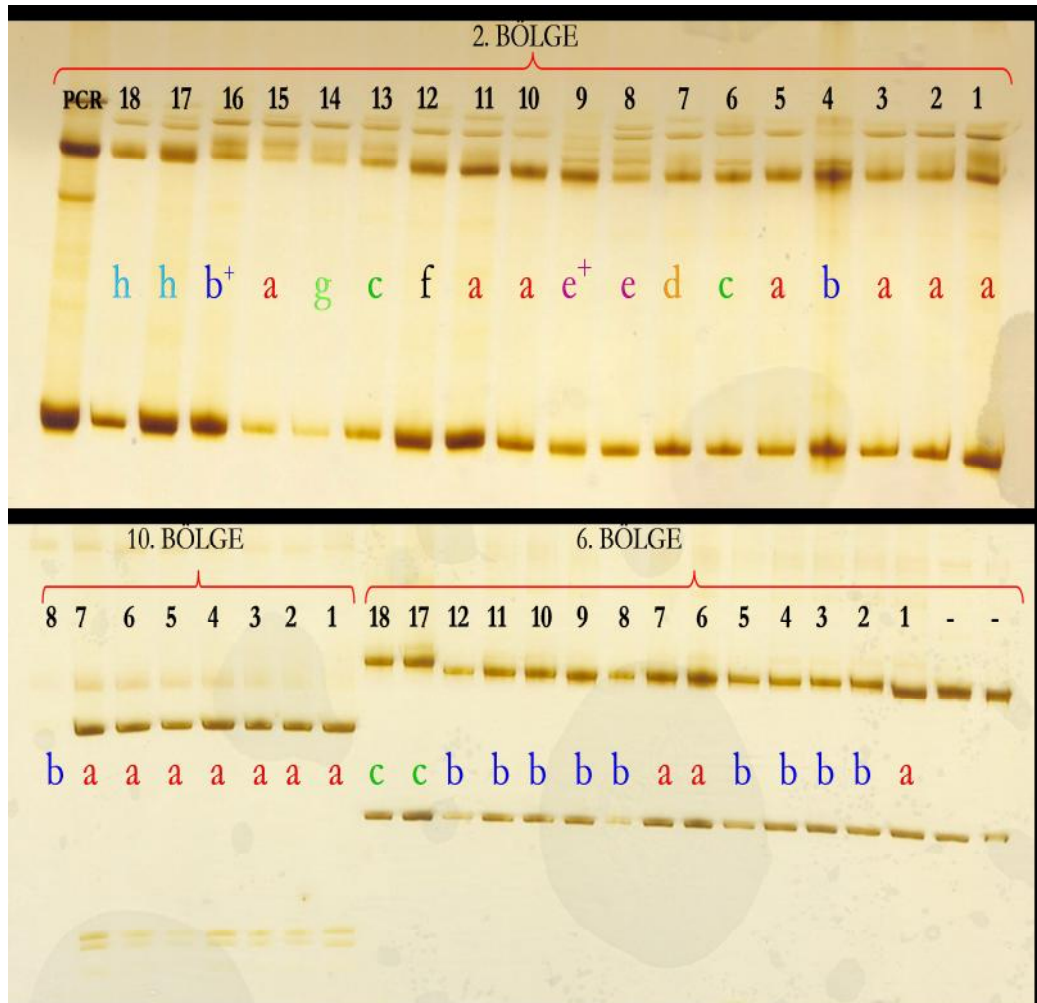
ekil 4.7 : *Microcystis* su larının PCR görüntüleri. Rakamlar *Microcystis* su larını temsil etmektedir.

PCR reaksiyonları tamamlandıktan sonra 500 baz çiftinin üzerinde uzunluğa sahip olan PCR ürünleri enzim kesimi ile daha küçük bölgelere ayrıldı ve SSCP uygulaması için

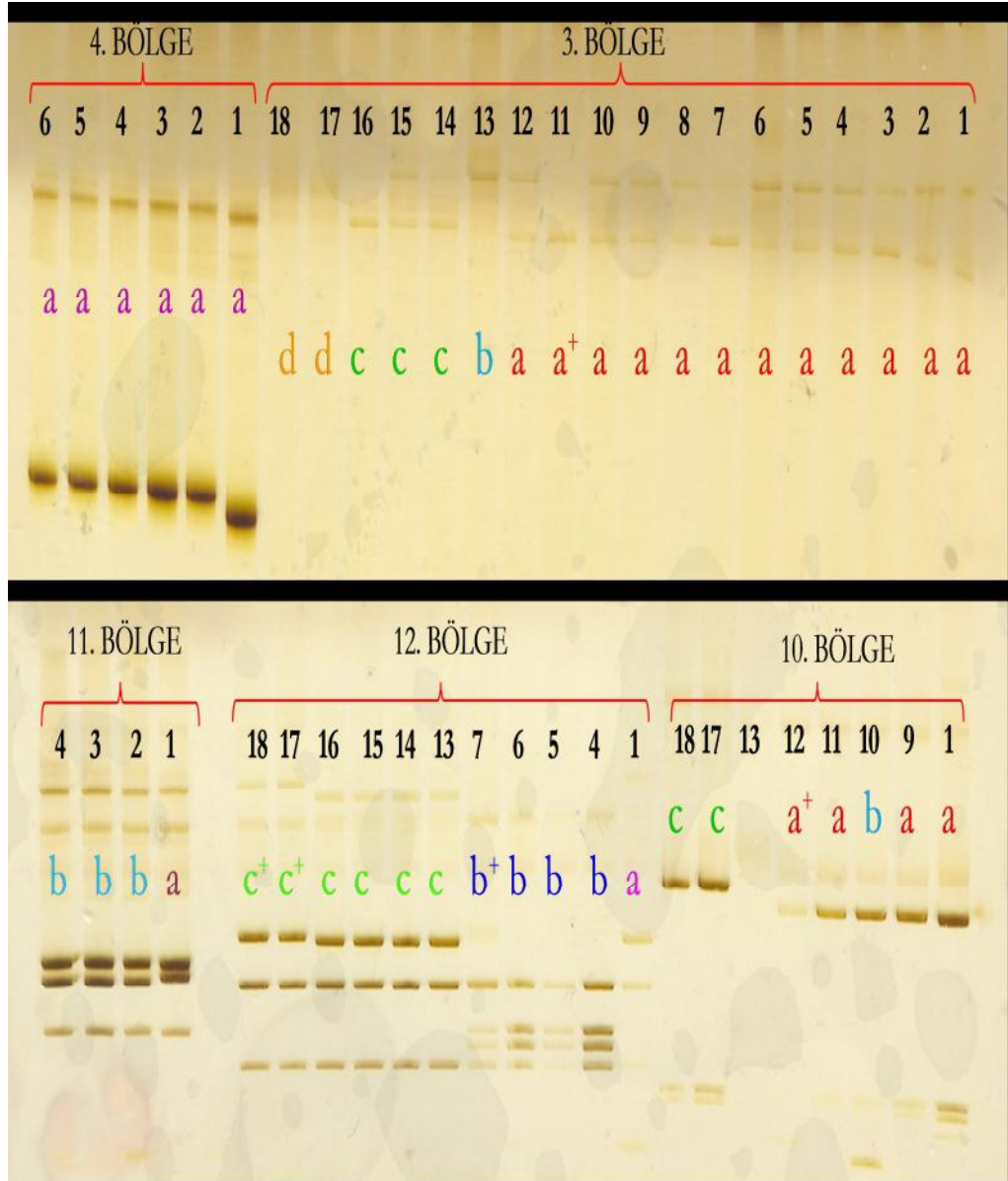
poliakrilamid jellere yüklendi. 500 baz çiftinin altında olan örnekler enzime kesimi uygulanmadı.

#### 4.4. SSCP VE DİZİLEME SONUÇLARI

SSCP yöntemiyle incelenen 17 *Microcystis* suunun bir kısmında herhangi bir görünüm farklılığına rastlanmazken bir kısmında görünüm farklılıkları tespit edildi. SSCP jel taramalarında gen dizisi bilinen *M. aeruginosa* PCC 7806 referans olarak alındı ve bu su tan farklı bant görünümü gösterenler dizileme analizi için REF GEN (Teknokent ODTÜ) Laboratuvarına gönderildi (ekil 4.8, 4.9).

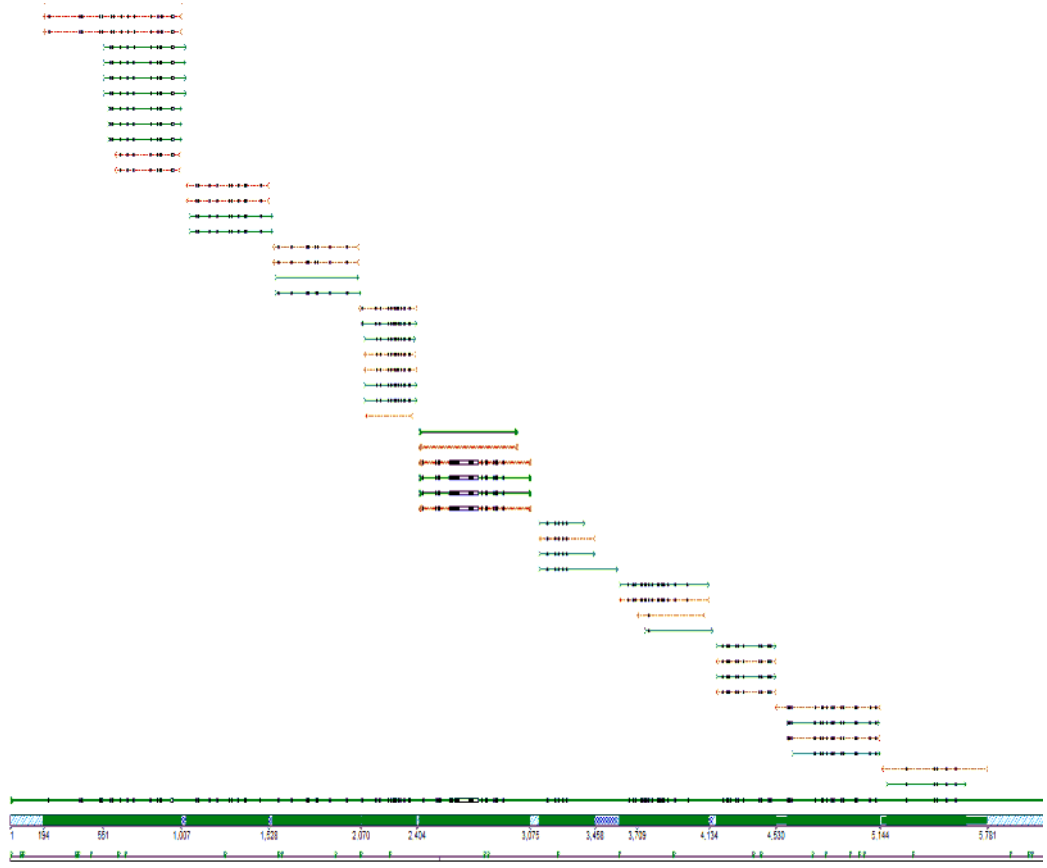


ekil 4.8 : *mcyB* geni 2, 6 ve 10. bölgeye ait SSCP jel görüntüleri. 1; *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, diğer rakamlar; *Microcystis* suuları, harfler; farklı bant görünümünü temsil etmektedir.



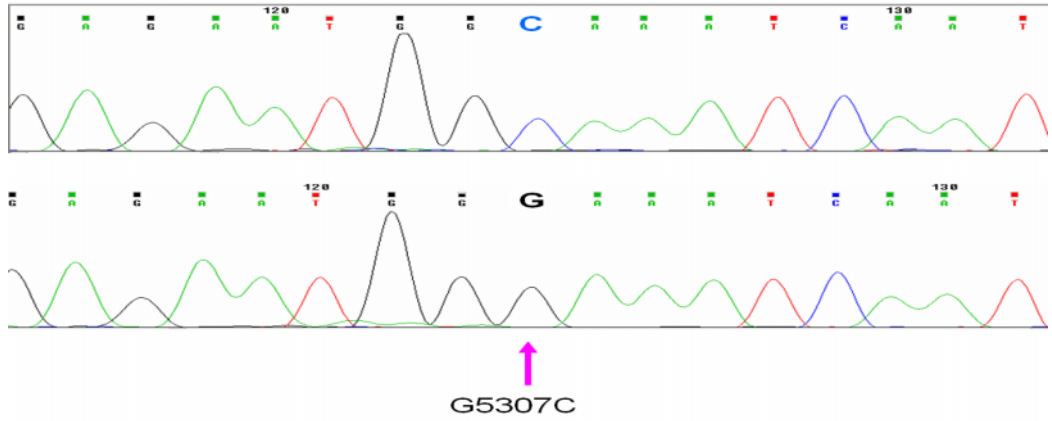
ekil 4.9. *mcyB* geni 3, 4, 10, 11 ve 12. bölgeye ait SSCP jel görüntüsü. 1; *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, diğer rakamlar; *Microcystis* suşları, harfler; farklı bant görünümelerini temsil etmektedir.

SSCP jel görüntüleri incelendi inde birçok farklı jel görünümüyle karşılaştık. Bu görünüm farklılıklarının birçok varyasyona neden olduğunu düşünüldü. Dizileme analizlerinin sonuçları incelendi inde çok sayıda tek nükleotid mutasyonları ile karşılaştık ( ekil 4.10).



ekil 4.10 : DNA dizileme sonuçlarının ematik görünümü .

Varyasyonların büyük çoğunluğunun tek nükleotid de i imlerinden kaynaklandığı belirlendi ( ekil 4.11).



ekil 4.11 : Nükleotid de i ikli ini gösteren kromotogram.

Nükleotid de i ikliklerinin bir kısmının amino asit de i ikliklerine neden olmayarak sessiz mutasyonlara neden oldu u gözlemlendi. Nükleotid dizilerinde meydana gelen de i imlerin neden oldu u herhangi bir de lesyona veya in sersiyona rastlanmadı.

Dizileme sonuçlarına göre *Microcystis* su larının birçok varyasyon içerdi i ve bu su larda bulunan *mcyB* genlerinin baz dizilerinde bazı amino asit de i ikliklerinin meydana geldi i görüldü (Tablo 4.3). Amino asit de i ikliklerinin *mcyB* geninde bulunan adenilasyon, kondensasyon ve tiolasyon domeynlerinin fonksiyonel dizilerinde de i ikli e neden olmadı ı anlaşıldı.

Nükleotid Dizisi ve Aminoasit Sırası	
1	TTA TTA ACA CAT TCT GAA GTG GAA AAA GCC GTA GTT ATT TTG L E T H S E V E K A V V I L
2	TTA GAA ACT CAT CCC AAC GTT GAA CAA ACT GTT GTG ATT ATG L E T H P N V E Q T V V I M

ekil 4.12 : Mic 17 su unun *mcyB* geninde olu an varyasyonlar. 1: *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, 2: Mic 17. Kırmızı renkle gösterilen bazlar dizide olu an varyasyonları, mavi renkle gösterilen harfler amino asit de i ikliklerini göstermektedir. A : Alenin, E : Glutamik Asit, H : Histidin, I : zölösün, K: Lizin, L : Lösün, M : Metionin, N : Asparajin, P : Prolin, Q : Glutamin, S : Serin, T : Treonin, V : Valin

## 5. TARTI MA VE SONUÇ

Mavi ye il algerin a ırı artı gösteren toksik türleri kozmopolitan bir da ılı gösterirler ve tüm habitatlarda bulunurlar. Taksonomistlerin yakın zamana kadar mavi ye il alg türlerinin tanımlanmasını geleneksel olarak morfoloji temelli yöntemlerle yapmaları nedeniyle farklılıklar genellikle genus seviyesinde kalmakta ydı ve türe özel bilgiler elde edilememekteydi. Bununla birlikte yapılan ara tırmalarda mavi ye il alg türlerinin toksin üretiminde tür seviyesinde bile farklılıklar gösterdi i tespit edilmi tir. Örne in bir çalı mada aynı türe ait farklı su ların bir kısmının toksin üretirken bir kısmının toksin üretmedi i ve bu durumun klasik mikroskopik yöntemlerle tespit edilemeyece i rapor edilmi tir (77). Genetik temelli toksin tespit etme yöntemleri di er yöntemler ile kıyaslandı nda oldukça hassastır. Yapılan bir çalı mada uygulanan moleküler tekniklerle mikroskopik inceleme esnasında gözlemlenemeyen bazı mavi -ye il alg türlerinin varlı ı saptanmı tır (78).

Microcystin, tüm canlılar üzerinde toksik etki gösteren, Protein Fosfataz 1 ve 2A inhibitörü olan ve yedi amino asitten olu an halkasal yapılı bir sekonder metabolittir. Microcystinin olumsuz etkilerinden korunabilmek için yapısı, sen tez mekanizması ve organizmalar üzerindeki etkisi iyi bilinmelidir. Bunun için öncelikle microcystinin varlı ının tespit edilebilmesi gerekir. *Microcystis* genuslarının üretti i toksik bile enler microcystin üretim miktarı ve toksin üretme potansiyeli mikro skobik analizlerle belirlenemez. Microcystinler, HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) gibi analitik teknikler ile PP1, PP2A (Protein Phosphatase Inhibition Assays 1, 2A) ve ELISA gibi immünoölojik yöntemler kullanılarak tespit edilebilmektedir ( 77, 79). Bir çalı mada *Microcystis* türlerinin toksik olup olmadı ını tespit etmek için PCR, ELISA, HPLC ve Biyoassay yöntemleri kar ıla tırmalı olarak kullanılmı ve yöntemlerin hassasiyetleri kar ıla tırılmı tır. PCR dı ndaki üç yöntemin içi nde en hassas olanının ELISA yöntemi oldu u tespit edilmi ancak bu yöntemin bazı örneklerde yalancı pozitiflik verdi i görülmü tür (Tablo 5.1).

Tablo 5.1 : Cyanobacteria türlerinde toksisite tespiti için PCR, HPLC, ELISA ve Bioassay yöntemlerinin karılaştırılması. (+) : Toksik (HPLC, ELISA ve Bioassay) veya spesifik bant çöalması (PCR) görüldü; (-) : Non-toksik (HPLC, ELISA ve Bioassay) veya spesifik bant çöalması (PCR) görülmedi; (/) : Tespit edilemedi (80).

Sular	PCR1	PCR2	HPLC	Bioassay	Elisa
<i>Microcystis aeruginosa</i> FACHB (Wuda'erchi)	+	+	+	+	+
<i>Microcystis aeruginosa</i> FACHB (Dianshanhu)	+	+	+	+	+
<i>Microcystis aeruginosa</i> FACHB (Bao'anhu)	+	+	+	+	+
<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-101	-	-	-	/	-
<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-90	+	+	+	+	+
<i>Microcystis aeruginosa</i> FACHB8641	+	+	+	+	+
<i>Microcystis</i> sp. FACHB10	+	+	+	+	+
<i>Microcystis aeruginosa</i> FACHB86	+	+	+	+	+
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806	+	+	+	/	+
<i>Microcystis viridis</i> FACHB (Dianchi-1)	+	+	+	+	+
<i>Microcystis aeruginosa</i> UTEX2061	-	-	-	-	-
<i>Microcystis</i> sp. FACHB20	-	-	-	-	-
<i>Microcystis wesenbergii</i> FACHB574	+	+	-	+	-
<i>Microcystis aeruginosa</i> FACHB (Dianchi-1)	+	+	+	+	+
<i>Microcystis aeruginosa</i> FACHB (Dianchi-3)	/	+	+	+	+
<i>Microcystis viridis</i> FACHB (Dianchi-2)	/	+	+	+	+
<i>Microcystis aeruginosa</i> FACHB (Wuda'erquan)	/	+	+	+	+
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7820	+	+	/	/	+
<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-98	-	-	-	/	-
<i>Microcystis</i> sp. FACHB434	/	+	/	/	+
<i>Microcystis</i> sp. FACHB573	/	-	/	/	-
<i>Microcystis</i> sp. FACHB572	/	-	/	/	-
<i>Microcystis</i> sp. FACHB525	/	+	/	/	+
<i>Microcystis</i> sp. FACHB526	/	-	/	/	-
<i>Microcystis</i> sp. FACHB569	/	+	/	/	+
<i>Microcystis</i> sp. FACHB469	/	-	/	/	-
<i>Microcystis</i> sp. FACHB502	/	-	/	/	-
<i>Microcystis</i> sp. FACHB575	/	-	/	/	-
<i>Microcystis elabens</i> NIES-42	-	-	/	/	-
<i>Microcystis holsatica</i> NIES-43	-	-	/	/	-
<i>Oscillatoria agardhii</i> NIES- 595	-	-	+	/	+

Çalı mada PCR reaksiyonları için iki farklı primer çifti kullanılmı ve böylece iki farklı *mcyB* fragmanı ço altılmı tır. Tablo 5.1’de gösterildi i gibi bu primerler kullanılarak yapılan PCR reaksiyonları sırasıyla PCR1 ve PCR2 olarak adlandırılmı tır. PCR2 reaksiyonu sonucunda elde edilen sonuçların PCR1’e oranla daha hassas oldu u görülmü tür. Bu nedenle daha sonraki deneylerde PCR2 reaksiyonunda kullanılan primerlerin kullanılaca ı belirtilmi tir. Çalı m anın sonucunda PCR yönteminin di er yöntemlere oranla kolay, etkili, hassas oldu u ve liyofilize örneklerin, sediman ve yüzey suyu örnekleri ile laboratuvar kültür örneklerinin tamamında uygulanabilecek bir yöntem oldu u rapor edilmi tir (80).

Microcystin konsantrasyonunun de i kenlik göstermesi mavi ye il alg biyomasının de i kenli ine, türlerin fizyolojik ve genotip kompozisyonlarının farklılı na ba lıdır. Laboratuvar kültürlerinde ortam artları stabil tutulabildi i için tek bir çevresel faktörün microcystin üretimi üzerine etkisi incelenebilmektedir. Bu tarz çalı maların sonucunda optimal ık ve besin tuzu miktarının yüksek microcystin üretimine neden oldu u anlaşılmı tır. zole edilen su lar üzerinde yapılan çalı malar göstermi tir ki ık, sıcaklık, pH, nitrojen, fosfor ve demir miktarı microcystin üretimini etkilemektedir. Hüresel microcystin içeri indeki de i iklikler genlerin tra nskripsiyonundaki de i ikliklerine (üretilen mRNA kopyalarının sayısı), mRNA’nın translasyonuna ve microcystin sentetaz kompleksine tutunmasına, microcystin üretimi için sentetaz kompleksinin spesifik aktivitesine ve potansiyel microcystin turnoverına ba lıdır. Çe itli çalı malar mavi ye il alg gruplarındaki genotip kompozisyon de i ikliklerinin göllerdeki microcystin konsantrasyon de i ikliklerini etkiledi ini göstermi tir (64).

Günümüzde moleküler ve genetik yöntemler bilim dünyasına pek çok konuda büyük kolaylıklar sa lamakta ve klasik yöntemlerle çözümlenemeyen bir çok sorunu ortadan kaldırmaktadır. Bir çok çalı ma toksik mavi ye il alg hücrelerindeki microcystin varlı ı ile microcystin sentetaz genleri arasındaki ili kileri tespit etmi tir. Ayrıca toksik olmayan *Microcystis* su larının microcystin sentetaz genlerini içermedi i belirlenmi tir. Bu durum microcystin üreten türlerin toksigenitesinin tespiti için moleküler problemlerin geli mesini sa lamı tır. Bu moleküler problemlerden biri olan *mcyB*, toksin üreten türlerin tespitinde önemli bir belirteçtir (77, 78).

Bu ara tırmada 18 *Microcystis* su u kullanılarak PCR yöntemiyle *mcyB* geninin izolasyonu yapılmı tır. Ancak 18 *Microcystis* su undan 17'sinde *mcyB* geni izole edilebilmi tir. Mic 18 su undan *mcyB* geninin izole edilememesi bu su un toksik bir tür olmamasına ba lanmı tır. Bir çok çalı ma toksik olmayan türlerde microcysti n sentetaz genlerinin bulunmadı ını göstermektedir. Potansiyel toksin üretme yetene i olan *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Nodularia*, *Nostoc* ve *Planktothrix* genusları anahtar genuslar olarak kullanılmaktadır (64). Bu genuslar temel alınarak çe itli moleküler yöntemlerle hızlı bir ekilde toksin tayini yapılabilir. Bu durum su kaynaklarının yönetiminden sorumlu birimler için çok önemlidir. Çünkü içme suyu kaynaklarındaki olası toksin üretiminin cyanobacterial artı gerçekte meden ö renilmesi halk sa lı ı açısından dikkate alınması gereken bir konudur. Bu ekilde toksinlerin olumsuz etkilerinden korunmak için gerekli önlemler alınabilir (81).

Bu çalı mada Küçükçekmece Gölü'nün tüm bölgelerini kapsayacak ekilde örnekleme yapılmı tır. zole edilen su ların hemen hemen tamamında toksin üretimi PCR yöntemiyle tespit edilmi ve gölün tamamında toksik *Microcystis* türlerinin bulundu u görülmü tür. Amerika'da Erie Gölü'nde 1983-1987 yılları arasında yapılan bir çalı mada gölün orta ve batı bölgelerinde mikroskopik yöntemle *Microcystis* varlı ı tespit edilirken gölün do u bölgesinde *Microcystis* türlerine rastlanmamı tır. PCR yöntemiyle gölün do u bölgesinde tarama yapıldı ında (23 istasyon) ise bu bölgede toksik *Microcystis* türlerinin bulundu u anla ılmı tır (81).

Küçükçekmece Gölü'nde kış aylarında genellikle a ırı *Microcystis* ço alması gerçekte memektedir. Bu dönemde yapılan örneklemelelerde yüzey suyunda *Microcystis* hücrelerine rastlanmazken, sediman örneklerinin microcystin sent etaz genlerini içerdi i genetik yöntemlerle tespit edilmi tir. Bu nedenle Küçükçekmece Gölü'nde yaz aylarında toksik *Microcystis* a ırı artı larının gerçekte ebilece ini önceden söylemek gerçeki bir yakla ım olarak kabul edilmelidir. Nitekim yaz aylarında a ırı *Microcystis* artı larıyla kar ıla ılmı ve bu artı ların toksik oldu u yapılan PCR deneyleriyle kanıtlanmı tır.

Genetik çe itlilik geleneksel olarak popülasyon örneklerindeki farklı genotiplerin yüzdesi olarak tarif edilir. *Microcystis* popülasyonlarında önemli genetik varyasyonlar görülmektedir. Yapılan bir çalı mada *Microcystis aeruginosa*'da meydana gelen varyasyonların % 41'i farklı göller arasındaki varyasyonla açıklanabilirken % 59'u popülasyon içindeki varyasyonlarla açıklanabilmi tir ( 82). Almanya'daki Wannsee Gölü'nde yapılan çalı mada gölün *Microcystis* popülasyonunun genel olarak *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis flos-aquae*, *Microsystis ichthyoblabe* türlerinden olu tu u tespit edilmi tir. Bu gölden alınan sediment örneklerinde *mcyB* geni tespit edilmi ve *mcyB*'nin genotipinin *Microsystis* morfolojisiyle ili kili oldu u görülmü tür. Bu göldeki türler farklı *Microcystis* genotiplerine sahiptir. Örne in *Microcystis aeruginosa* kolonilerinin % 73'ünde *mcyB* geni bulunurken *Microsystis ichthyoblabe* kolonilerinin yalnızca % 16'sının bu geni içerdi i tespit edilmi tir. *Microcystis aeruginosa* sıklıkla geni ve sıkı koloniler ekinde görülürken, *Microcystis ichthyoblabe* tipik olarak küçük ve kırılğan kolonilere sahiptir. Bu durum büyük *Microcystis* kolonilerinin (>100 µ) yüksek *mcyB* oranına sahip oldu unu belirten görü le örtü mektedir (83).

*mcyB* geninin içerdi i varyasyonlar üretilen microcystin türlerini etkilemektedir. Yapılan bir ara tırmada *mcyBI*'in adenilasyon domeyni dizilenmi tir. Bu çalı mada kullanılan su ların *mcyBI* adenilasyon domeynleri *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 ve *Microcystis aeruginosa* HUB 524 su larına benzer varyasyonlar göstermi tir. Bu nedenle bu su lardan PCC 7806'ya benzeyenlere B tipi, HUB 524'e benzeyenlere C tipi denilmi tir. *mcyBI*'in B tipi varyantları çe itli microcystin-LR izoformlarını ve microcystin-YR'yi üretmektedir. *mcyBI*'in C tipi varyantları microcystin-RR ve LR'yi üretmektedir. Görüldü ü gibi *mcyBI* modülündeki genetik varyasyonlar farklı microcystin izoformlarının üretilmesine neden olmaktadır. Çünkü *Microcystis* su ları *mcyBI* modülünde farklı adenilasyon domeynlerine sahip olabilmektedir. *mcyBI* modülünün varyasyonlarının mRNA ve microcystin sentetaz genlerinin fonksiyonunu etkiledi ini gösteren herhangi bir bulgu yoktur (84). Tüm bu çalı malarda görüldü ü gibi *mcyB* geninin sahip oldu u varyasyonlar morfolojik karakterleri ve toksin yapısını etkilemektedir.

Bu ara tırmada izole edilen *mcyB* genleri SSCP yöntemiyle incelendikten sonra farklılık gösteren bölgeler için dizileme analizlerinden faydalanılmı tır. Dizileme analizleri sonucunda *mcyB* geninde bir çok varyasyon görülmü tür. Bu varyasyonların bir ço onunun tek nükleotid de i imlerinden kaynaklandı ı belirlenmi tir. Nükleotid dizilerinde meydana gelen de i imlerin bir kısmı amino asit de i ikliklerine neden olmu tur. Ancak herhangi bir delesyona veya insersiyona rastlanmamı tır.

Microcystin biyosentezinin evrimini daha iyi anlayabilmek için *mcy* gen kümesinin ve *mcy* genlerinin modülleri ile domeynlerinin dizileme anali zlerinin yapılması gerekti i dü ünülmektedir. Microcystinin yapısındaki büyük varyasyonların olu abilmesi için bu enzimler ve domeynlerde hızlı bir evrimin meydana gelmi olması gerekti i belirtilmektedir. *mcyB* gen kümesinde meydana gelen varyasyonların bi rço u amino asit pozisyonlarında farklılıklara yol açarken, ADDA amino asidinin yüksek derecede korunmu oldu u görülmü tür (64).

*mcyB* geni adenilasyon, kondensasyon ve tiolasyon domeynlerinden olu ur. *mcy* genlerinde bulunan adenilasyon domeynleri amino a sitleri tanıyıp aktive eder ve hangi amino asidin modüllere ba lanaca ını belirler. Adenilasyon bölgesinin büyük kısmı çok iyi korunmu amino asit dizilerinden meydana gelmektedir. Adenilasyon bölgesinin özgül dizilerinde meydana gelebilecek bir varyasyon ba lanacak amino asidi de i tirebilece inden toksin yapısında da varyasyona neden olabilmektedir. Kondensasyon bölgesinde ise peptid ba ı olu umu gerçekte ir. Fosfopantetein grubuna tiyoester ba ıyla ba lı olan amino asit, fosfopantetein grubunun ileri geri salınım yapan kolu yardımıyla bir kondensasyon bölgesindeki alıcı konumuna ta ınır. Bir önceki modülün fosfopantetein ta ıyıcısı tarafından verici konumuna yerle tirilmi olan amino asit veya peptidil grubu ile kondensasyon, yani peptid ba ı olu umu ger çekte ir. Tiolasyon bölgesinde bulunan 4 -fosfopantetein grubu bu bölgedeki bir serinin hidroksiline kovalent olarak ba lanmı tır ve ileri geri hareket ederek, aminoasitleri adenilasyon bölgesinden kondensasyon bölgesine ta ıyan bir manivela görevi görür. Kondensasyon ve tiolasyon domeynlerinde de korunmu dizi motifleri bulunmaktadır. Korunmu dizi motifleri evrimsel süreçte büyük oranda de i ikli e u ramadan günümüze kadar gelebilmi lerdir. Tablo 5.2 ve ekil 5.1’de peptid sentetaz genlerinde bulunan bazı korunmu dizi motifleri gösterilmektedir. Bu dizi motiflerinin modüler

yapıdaki peptid sentetazların fonksiyonel bölgelerini oluşturan bölümler (18, 22, 46, 52, 64, 85).

Tablo 5.2 : Peptid sentetazların katalitik domainlerinin yüksek derecede korunmuş diziler ve motifleri. Çekirdek Diziler 1 peptid sentetazların genel motiflerini; Çekirdek Diziler 2 *mcyB* geninin diziler motiflerini göstermektedir. PCC: *Microcystis aeruginosa* PCC 7806'ya ait çekirdek dizileri (52, 85, 86, 87).

Domeynler		Çekirdek diziler 1		Çekirdek diziler 2
Adenilasyon	A1	L(TS)YxEL	A1	SYQEL
	A2	LKAGxAYL(VL)P(L)D	A2	LKAGGAYVPLD
	A3	LAYxxYTSG(ST)TGxPKG	A3	LAYVIYTSGSTGKPKG
	A4	FDxS	A4	FDLS
	A5	NxYGPTE	A5	NNYGPTE
	A6	GELxIxGxG(VL)ARGYL	A6	GELHISSVGLARGYL
	A7	Y(RK)TGDL	A7	YKTGDL
	A8	GRxDxQVKIRGxRIELGEIE	A8	GRIDNQVKLRGLRIELGEIE
	A9	LPxYM(IV)P	A9	LP YMQP
	A10	NGK(VL)DR	A10	NGK DR
Tiolasyon	T	DxFFxxLGG(HD)S(LI)	T	DNFFELGGHSL
Kondensasyon	C1	SxAQxR(LM)(WY)xL	C1	SPMQEGLMFH SHAQRRFYVL
	C2	RHExLRTxF	C2	RHSVLRTSF RHESLRTSF
	C3	MHHxISDG(WV)S	C3	HHHILDGWS IHHICDGWS
	C4	YxD(FY)AVW	C4	YQDYIVW YKDYAGW
	C5	(IV)GxFVNT(QL)(CA)xR	C5	VGLFINTLPRV IGLFLNTLVIR
	C6	(HN)QD(YV)PFE	C6	YAYVSLA HSDYFPD
	C7	RDxSRNPL	C7	DIPPGVPL REINRTPL
Tioesteraz	TE	G(HY)SxG		
Epimerizasyon	E1	PIQxWF		
	E2	HHxISDG(WV)S		
	E3	DxLLxAxG		
	E4	EGHGRE		
	E5	RTVGWFTxxYP(YV)PFE		
	E6	PxxGxGYG		
	E7	FNYLG(QR)		
N-metilasyon	M1	VL(DE)GxGxG		
	M2	NELxYRYxAV		
	M3	VExSxARQxGxLD		

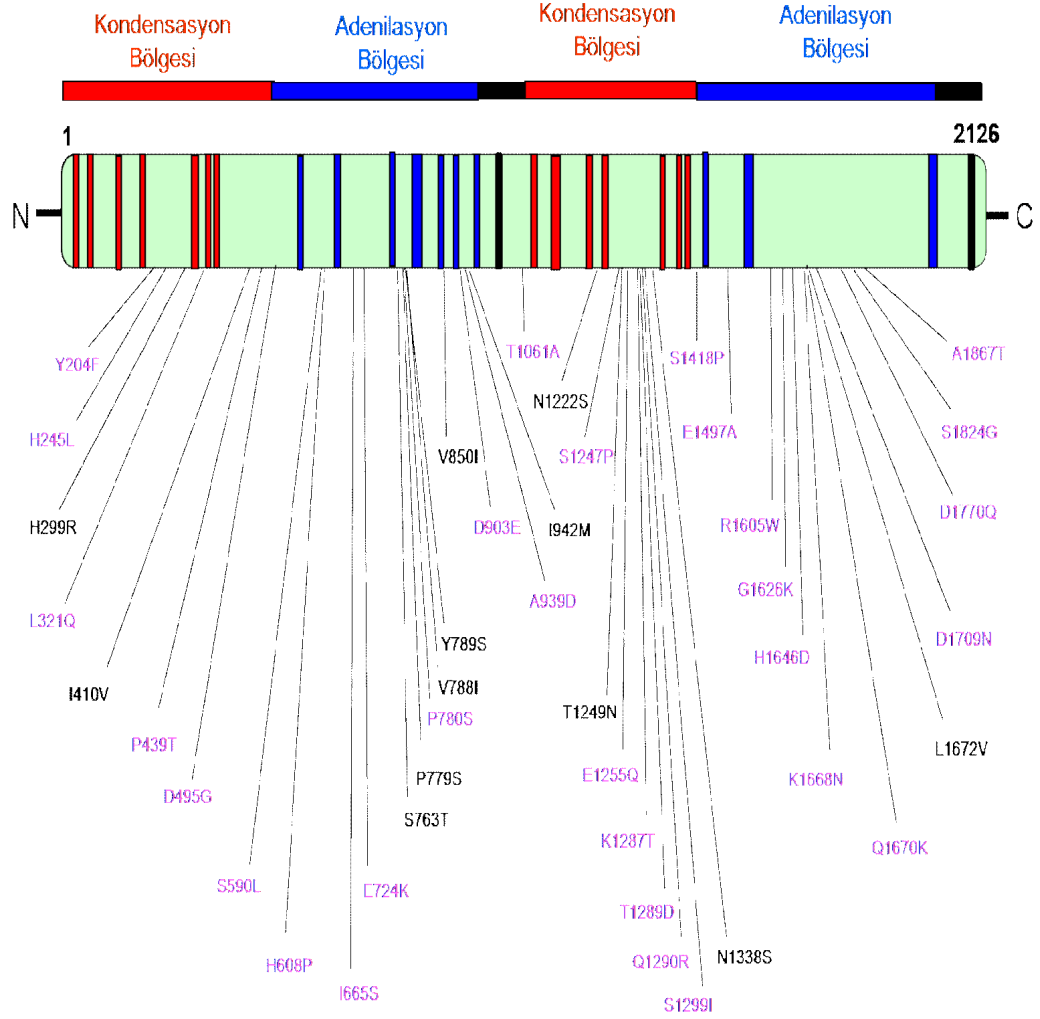
```

1 madtknqpaknvesiypplsmpaqegmalfhsllytpdsgiycsqtli tlegeinltvfrqawe
61 kvverhsvlrtrtlflwekrekplqivrkkvdlpwydqdwrnlspteqqqrldlllqterqq
121 gfefkvaplmrclmiqlsdqtykflcrhhhiildgwsmpiiyqevlgfyeagiqgkshhl
181 psprpyqdyvlwqlqeqnpsvaeesywqrtelegfmpptplr vdrllqmksegkptykeynch
241 lsaslskdllqslaqkhmltstlvqaawaillsr ysgesevlfvgvtvsgrphdlsgrerr
301 vglfintlplrvsiresdlllswlqelqqkqaeiqdya yvsla eiqrldsippgvplfes
361 lvvfenyprealsrdsrqlrvkdvenfeetnypltvvai prqelliqliydtserftqdt
421 iemaghlqttiltgivtdprqrvtqlpilttqeqhqllvewmteadypldkslhqlfee
481 qaaqnpqgia vifedqklt yqqlnnrgnqlahclrdkvgvpeslvgi fmersl emvigll
541 gilkaggayvpldpdypterlrgdilsdsgvslvltqeslgdflpqtg aeslcldr dweki
601 atyspenhfnl ttpenlayviytagstgkpkgvl ishrglmnl icwhqdafeitpldkit
661 qlariafdaavw elwpc ltagaslvlvkpeimqspddlrdwli aqei tvsflptplveki
721 lslewdenia lriiltggdkllhhypsglmpfklinnygptensvvtsglvrdyeegnp
781 spsigkpvyntkiyildqnlqplpigvpgelhi ssvglargylnrleltqekfisn pfn
841 gilyktgd lvrylpegnieflgridnqvk lrglrielgeieavlethsevekavvilred
901 tsdnqrlvayivrksp slgigelrrflqqqlpaymvpsafvil sdfplnngkidrkklp
961 vpdetsiiesayiaprnek esllaqiwqdv lqvskigvsdnff elggshlkaislvskiq
1021 eklgqslpikqvfa hptiaeqavllstvtpltvatiplvstqet yetshaqrrfyvlqqm
1081 dlannvayhivstlkiagdfspdvfekaiql llsrheslrtsfilingepqgkilqnrpfd
1141 wfkdwtnkpd eeiletiakerkafdlek splvrskiyklspneyile eihhiicdgws
1201 msllakeclqyysdlakglqpnieplpiqykdyagwqnnllrsennsktldywrekldng
1261 qltrvhlp tdfkrpqiktfkgshlswkftqetisklrkscqeneitl fmalvaavkilly
1321 rysgqhdi tigteiatrnhpqlqsligl flntlvir d qiepekgyknllakvrqtvt eal
1381 ehady pfdilveklavsr einrtplfdtlvllqnfeqsvgl eniqikslsdl tptskfdl
1441 sfvfse deeklrl eliyntdlfqeermkkclihfdkllneml snpaqpvkdi sllse aet
1501 afianfinpiprletrtv ihdfidqveatpektsiiy pggkfsyqelheltnfwayalke
1561 lgvekd kvcvll egdyrqliamlavfkagg iyplrldepeerrqrmniktspe ilva
1621 aenlegikpqls alekpphilvka hkiqyqhqwngmdyqefpcqlsklqpll amp dadd
1681 snyimftsgstgepkailgshgslrhfidwekrefgineswrc lqiaqinfd aylretcv
1741 tlcsggtlyipesteredlellllrigewdinllhtvpsvmrlflkigrqlv nahnlks
1801 lrifvlgg eplfvkelaewhqifssqtefvniy gasettfvkhfyripnpnnipyervpg
1861 gqtlpdaayavvdgnraraigevgevfvk spyltkgyyqdeslthsvfvnpn lnggrdiv
1921 yrtgd lgrillpdl tlevigrsdnqiklngvri elgeiedv lsgiegv ekalvman kkeel
1981 vtviayyqaedtvhqeyirgkllkql lpiymqpsflmrl ea fpllpngkihr lalpkpeen
2041 itnstnqv pdfnpqealla slwgelleaevsnq sffelggns l kamrlvsaqir nqfgv
2101 slrlreif thntlkeqavliqsrqkr

```

ekil 5.1 : *mcyB* genindeki dizi motiflerinin lokasyonu

*mcyB* geninde bulunan varyasyonlardan amino asit de i ikli ine neden olanların fonksiyonel motifler di ndaki bölgelere da ıldı ı görülmü tür ( ekil 5.2). Fonksiyonel motifler içinde tespit edilen varyasyonların ise amino asit de i imine yol açmadı ı anlaşılmı tır. Bu sonuçlar tahmin edildi i gibi söz konusu motiflerin i levsel olarak önemli oldu unu ve bu nedenle korunmu oldu unu göstermektedir. Korunmu dizi motiflerinin di nda kalan amino asit de i ikliklerinin olu turabilece i de i imler için daha ayrıntılı çalı malar yapılması gerekmektedir.



ekil 5.2 : *mcvB* geninde bulunan nükleotid farklılıklarının neden olduğu aminoasit değişiklikleri. Kimyasal grup farklılığı olan amino asit değişimleri pembe renkle gösterilmiştir.

Yapılan bir çalışmada çalışılan *Microcystis* suşlarından altısının *mcvB* gen bölgesinde DALLFGFV özel dizisi görülmüştü ve bu altı suşta Homotirozin ve Lösin ile olan korelasyon Argininle görülmemiştir. Çünkü suşun *mcvB* geninde DAWAFGLV özel dizisi bulunurken, üç suşta DALFFGVV özel dizisi bulunmakta ve her iki küme de Argininle korelasyon göstermektedir. Çalışmada kullanılan diğer 10 suşta açık bir genetik farklılık olmaksızın DALFFGLV özel dizisi bulunmaktadır ve bu suşlar Arginin ve Lösin'i üretmektedir. Bu çalışmada adenilasyon domenyinin spesifik bölgelerinde DNA poliforfizmleri gösterilmiştir ve spesifik microcystin varyantlarının sentezleriyle ilişkilendirilmiştir (88).

*mcyB* geni microcystin sentetaz gen kümesinin 10 açık okuma düzeninden biridir. *mcyB* geninin özel dizilerinde meydana gelen varyasyonlar sonucunda çeşitli microcystin varyantları oluşmaktadır ve bu varyantların yapısı toksisiteyi etkilemektedir. Örneğin microcystin-LR şu ana kadar tespit edilen varyantlar arasında en toksik olanıdır. Bu nedenle Dünya Sağlık Örgütü içme suyunda bulunabilecek en yüksek microcystin düzeyini microcystin-LR üzerinden tespit etmiş ve bu miktarı 1µg/l olarak düzenlemiştir. Bu çalışmada yeni bir microcystin varyantı bulunamamakla birlikte Türkiye su kaynaklarında olası yeni microcystin varyantlarının tanımlanabileceği düşünülmektedir. Çünkü ülkemizde cyanotoksinlerle ilgili genetik düzeyde yapılan herhangi bir çalışma olmadığından bu konuda büyük bir boşluk bulunmaktadır. Ayrıca cyanobacterial metabolitlerin yapılarının coğrafik orjinlerine ve ait oldukları gruba göre çok büyük farklılıklar gösterdiği bilinmektedir.

*Microcystis* sularında *mcyB* genlerinin tespiti, türlerin toksik olup olmadığını konusunda hassas ve hızlı bir teknik olarak kullanılabilir. Böylece su kaynaklarının kullanımından sorumlu olan belediyeler için erken uyarı sistemleri geliştirilerek halk sağlığının korunması sağlanabilir. Bu çalışma Türkiye’de oluşturulabilecek erken uyarı sistemlerinin temelini oluşturabilir.

Microcystinin yapısını, sentez mekanizmasını ve etkisini anlayabilmek için yapılan birçok çalışma mevcuttur. Ancak ülkemizde bu konudaki çalışmalar yetersiz kalmakla birlikte genetik düzeyde yapılan herhangi bir çalışma da bulunmamaktadır. Oysa ki insanlar dahil bütün canlılar üzerinde olumsuz etkiler oluşturan bu toksinin incelenmesi, üretilme mekanizması ile ilgili detayların araştırılması oldukça önemlidir. Bu çalışmada *mcyB* geninde meydana gelebilecek olası varyasyonlar ortaya konarak microcystinin yapısının daha iyi anlaşılması ve oluşabilecek yeni durumların gözlemlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmanın gelecek yıllarda ülkemizde genetik düzeyde yapılacak cyanotoksin çalışmalarına bir temel oluşturacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

1. KAYAR, V.N., ÇELİK, A., 2003, Gediz nehri kirlilik parametrelerinin tayini ve su kalitesinin belirlenmesi, *Ekoloji Çevre Dergisi*, 12 (47), 17-22.
2. ATICI, T., 1994, Sakarya nehri kirliliği ve algler, *Ekoloji Çevre Dergisi*, 24, 28-32.
3. ÜNLÜ, A., TUNÇ, M.S., 2007, Eysel atıksu de arji öncesinde ve sonrasında Kehli Dere'sinin su kalitesi de i iminin incelenmesi, *TÜ Dergisi/e*, 17, 65-75.
4. KARA, C., ÇÖMLEKÇİ O LU, U., 2004, Karaçay (Kahramanmaraş)'ın kirliliğinin biyolojik ve fiziko-kimyasal parametrelerle incelenmesi, *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 7 (1), 1-7.
5. RICHARDSON, L.L., SEKAR, R., MYERS, J.L., GANTAR, M., VOSS, J.D., KACMARSKY, L., REMILY, E.R., BOYER, G.L., ZIMBA, P.V., 2007, The presence of the cyanobacterial toxin microcystin in black band disease of corals, *FEMS Microbiology Letters*, 272, 182-187.
6. GÜRBÜZ, H., KIVRAK, E., SÜLÜN, A., 2002, Porsuk göleti (Erzurum, Türkiye) Fitoplankton'u üzerine bir ara tırma, *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 19, 53-61.
7. KOÇUM, E., 2005, Çanakkale bo azında klorofil a ve çözünmüş mineral besin elementi miktarlarının analizi, *Ekoloji Çevre Dergisi*, 14 (57), 1-6.
8. HARADA, K., 2004, Production of secondary metabolites by freshwater cyanobacteria, *Chem. Pharm. Bull*, 52 (8), 889-899.
9. KASTING, J.F., SIEFERT, J.L., 2002, Life and the evolution of earths atmosphere, *Science*, 296, 1066-1067.
10. ZURAWELL, R.W., CHEN, H., BURKE, J.M., PREPASS, E.E., 2005, Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 8, 1-37.
11. POURIA, S.A., BARBOSA, J., CAVALCANTI, R.L., BARRETO, V.T.S., WARD, C.J., PREISER, W., POON, G.K., NEILD, G.H., CODD, G.A., 1998, Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil, *The Lancet*, 352, 21-25.

12. GUPTA, N., PANT, S.C., VIJAYARAGHAVAN, R., RAO, P.V.L., 2003, Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice, *Toxicology*, 188, 285-296.
13. FAWELL, J.K., MITCHELL, R.E., EVERETT, D.J., HILL, R.E., 1999, The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I Microcystin-LR, *Human and Experimental Toxicology*, 18, 162-167.
14. SAKER, M.L., JUNGBLUT, A.D., NEILAN, B.A., RAWN, D.F.K., VASCONCELOS, V.M., 2005, Detection of microcystin synthetase genes in health food supplements containing the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*, *Toxicon*, 46, 555-562.
15. METCALF, J.S., BEATTIE, K.A., PFLUGMACHER, S., CODD, G.A., 2000, Immuno-crossreactivity and toxicity assessment of conjugation products of the cyanobacterial toxin microcystin-LR, *FEMS Microbiology Letters*, 189, 155-158.
16. MBEDI, S., WELKER, M., FASTNER, J., WIEDNER, C., 2005, Variability of the microcystin synthetase gene cluster in the genus *Planktothrix* (Oscillatoriales, Cyanobacteria), *FEMS Microbiology Letters*, 245, 299-306.
17. RINTA-KANTO, J.M., QUELLETTE, A.J.A., BOYER, G.L., TWISS, M.S., BRIDGEMAN, T.B., WILHELM, S.W., 2005, Quantification of toxic *Microcystis* spp. during the 2003 and 2004 blooms in Western Lake Erie using quantitative real-time PCR, *Environ. Sci. Technol.*, 39, 4198-4205.
18. DITTMANN, E., NEILAN, B.A., BORNER, T., 2001, Molecular biology of peptide and polyketide biosynthesis in cyanobacteria, *Appl Microbiol Biotechnol*, 57, 467-473.
19. SANGOLKAR, L.N., MASKE, S.S., CHAKRABARTI, T., 2006, Methods for determining microcystins (peptide hepatotoxins) and microcystin-producing cyanobacteria, *Water Research*, 40, 3485-3496.
20. ALBAY, M., AKÇAALAN, R., AYKULU, G., TUFEKÇI, H., BEATTIE, K.A., CODD, G.A., 2003, Occurrence of toxic cyanobacteria before and after copper sulphate treatment in a water reservoir, Istanbul, Turkey, *Archiv für Hydrobiologie Suppl. Algological Studies*, 109, 67-78.
21. ALBAY, M., AKÇAALAN, R., TUFEKÇI, H., METCALF, J. S., BEATTIE, K. A., CODD, G.A., 2003, Depth profiles of cyanobacterial hepatotoxins (microcystins) in three Turkish freshwater lakes, *Hydrobiologia*, 505, 89-95.
22. ALBAY, M., MATTHIENSEN, A., CODD, G. A., 2005, Occurrence of toxic Blue-Green Algae in Kucukcekmece Lagoon, Istanbul, Turkey, *Environmental Toxicology*, 20, 277-284.

23. AKÇAALAN, R., YOUNG, F.M., METCALF, J.S., MORRISON, L.F., ALBAY, M., CODD, G.A., 2006, Microcystin analysis in single filaments of *Planktothrix* spp. in laboratory cultures and environmental blooms, *Water Research*, 40, 1583-1590.
24. AKIN, G., 2007, Küresel çevre sorunları, *C.Ü. Sosyal Bilimler Dergisi*, 31 (1), 43-54.
25. TA , B., 2006, Derbent baraj gölü (Samsun) su kalitesinin incelenmesi, *Ekoloji Çevre Dergisi*, 15 (61), 6-15.
26. SANDALCI, M., YÜKSEL, ., 2007, Su Kaynakları Kullanımının iklim Değişikliği Üzerindeki Etkisi, *1. Türkiye İklim Değişikliği Kongresi, T KDEK, 11-13 Nisan TÜ, İstanbul, Türkiye*, 2007, 447-453.
27. SÜHER , S., TOPAK, R., 2005, Konya ovasındaki sulama örgütlerinin işletmecilik yönünden karşılaştırılması, *S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19 (37), 79-86.
28. ALKAN, U., ÇALIŞKAN, S., MESCOĞLU, Ü., 1999, Uluabat Gölü' nün mikrobiyolojik kirlilik seviyesinin belirlenmesi, *Ekoloji Çevre Dergisi*, 9 (33), 3-5.
29. ÜNLÜ, A., ÇOBAN, F., TUNÇ, M.S., 2008, Hazar gölü su kalitesinin fiziksel ve inorganik kimyasal parametreler açısından incelenmesi, *Gazi Üni. Müh. Mim. Fak. Der.*, 23 (1), 119-127.
30. ERKAN, M.E., VURAL, A., 2006, Dicle Nehri'nin hijyenik kalitesi üzerine bir araştırma, *Dicle Tıp Dergisi*, 33 (4), 205-209.
31. OCAK, A., ÇEKİÇ, A., ZEYTONLU, H., MERCANGÖZ, A., 2002, Porsuk Çayı suyunun bazı tarım bitkileri üzerindeki ekotoksikolojik etkileri, *Ekoloji Çevre Dergisi*, 11 (45), 9-13.
32. AKKÖZ, C., GÜLER, S., 2004, Topçu Göleti (Yozgat) alg florası I: Epilitik ve epifitik algler, *S.Ü. Fen Ed. Fak. Fen Derg.*, 23, 7-14.
33. SOLAK, C.N., BARLAS, M., PABUÇCU, K., 2007, Akçay'ın (Büyük Menderes-Muğla) Bacillariophyta sınıfındaki epilitik algleri, *Ekoloji Çevre Dergisi*, 16 (62), 16-22.
34. NUHOĞLU, Y., ÖYMEN, T., 1993, Doğu Karadeniz bölgesi (bölümü) su kaynakları kirliliği ile balık popülasyonları arasındaki ilişkinin incelenmesi, *Çevre Dergisi*, 6, 28-33.
35. POLAT, S., OLGUNOĞLU, M.P., AKAY, A.A., KORAY, T., 2006, Kuzeydoğu Akdeniz kıyısındaki sularında (Skenderun Körfezi) dağınık gösteren potansiyel zararlı fitoplankton türleri, *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 23(1-2), 169-172.

36. OBERHOLSTER, P.J., BOTHA, A.M., GROBBELAAR, J.U., 2004, *Microcystis aeruginosa*: source of toxic microcystins in drinking water, *African Journal of Biotechnology*, 3 (3), 159-168.
37. KAEBERNICK, M., NEILAN, B.A., 2001, Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production, *FEMS Microbiology Ecology*, 35, 1-9.
38. ORTELLI, D., EDDER, P., COGNARD, E., JAN, P., 2008, Fast screening and quantitation of microcystins in microalgae dietary supplement products and water by liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 617, 230-237.
39. CHORUS, I., FALCONER, I.R., SALAS, H.J., BARTRAM, J., 2000, Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 3, 323-347.
40. ARAOZ, R., NGHIEM, H., RIPPKA, R., PALIBRODA, N., MARSAC, N.T., HERDMAN, M., 2005, Neurotoxins in axenic oscillatorian cyanobacteria : coexistence of anatoxin-a and homoanatoxin-a determined by ligand-binding assay and GC/MS, *Microbiology*, 151, 1263-1273.
41. GUPTA, N., BHASKAR, A.S.B., RAO, P.V.L., 2002, Growth characteristics and toxin production in batch cultures of *Anabaena flos -aquae*: effects of culture media and duration, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 29-35.
42. JAMES, K.J., FUREY, A., SHERLOCK, I.R., STACK, M.A., TWOHIG, M., CAUDWELL, F.B., SKULBERG, O.M., 1998, Sensitive determination of anatoxin-a, homoanatoxin-a and their degradation products by liquid chromatography with fluorimetric detection, *Journal of Chromatography A*, 798, 147-157.
43. MOHAMED, Z.A., EL-SHAROUNY, H.M., ALI, W.S.M., 2006, Microcystin production in benthic mats of cyanobacteria in the Nile River and irrigation canals, Egypt, *Toxicon*, 47, 584-590.
44. TENEVA, I., DZHAMBASOV, B., KOLEVA, L., MLADENOV, R., SCHIRMER, K., 2005, Toxic potential of five freshwater *Phormidium* species (Cyanoprokaryota), *Toxicon*, 45, 711-725.
45. WELKER, M., DOHREN, H.V., 2006, Cyanobacterial peptides Nature's own combinatorial biosynthesis, *FEMS Microbiol REV.*, 30, 530-563.
46. BÜBER, E., AÇAN, N.L., 2004, Ribozom dı ı yolla sentezlenen biyoaktif peptidiler, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 35, 43-48.
47. WATANABE, M.F., HARADA, K., CARMICHAEL, W.W., FUJUKI, H., 1996, *Toxic Microcystis*, CRC Press, Florida, 0-8493-7693-9

48. VAN DEN HOEK, C., MANN, D.G., JAHNS, H.M., 1995, Algae an introduction to phycology, *Cambridge University Press*, ngiltere, 0521 316871.
49. ETTL, H., GARTNER, G., HEYNIG, H., MOLLENHAUER, D., KOMAREK, J., ANOGNOST D S, K., 1999, Cyanoprokaryota, *Spektrum Akademischer Verlag GmbH*, 3 8274 0890 3.
50. HUANG, W.M., XING, W., LI, D.H., LIU, Y.D., 2008, The Role of glutathione metabolism in tolerance of tobacco BY-2 suspension cells to microcystin-RR, *Bull Environ Contam Toxicol*, 80, 215-219.
51. BOURNE, D.G., JONES, G.J., BLAKELEY, R.L., JON ES, A., NEGRI, A.P., RIDDLES, P., 1996, Enzymatic Pathway for the Bacterial Degradation of the Cyanobacterial Cyclic Peptide Toxin Microcystin LR, *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 4086-4094.
52. TILLET, D., DITTMANN, E., ERHARD, M., DOHREN, H., BO RNER, T., NEILAN, B.A., 2000, Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated eptide polyketide synthetase system, *Chemistry and Biology*, 7 (10), 753-764.
53. JAYARAJ, R., RAO, P.V.L., 2006, Protein phospho rylation profile and adduct formation in liver and kidney of microcystin -LR-treated mice, *Toxicon*, 48, 272-277.
54. NISHIZAWA, T., ASAYAMA, N., FUJII, K., HARADA, K., SHIRAI, M., 1999, Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide Microcystin in *Microcystis* spp., *J.Biochem*, 126, 520-529.
55. JUNGBLUT, A., HOEGER, S.J., MOUNTFORT, D., HITZFELD, B.C., DIETRICH, D.R., NEILAN, B.A., 2006, Characterization of microcystin production in an antarctic cyanobacterial mat community, *Toxicon*, 47, 271-278.
56. BAIER, W., LOLEIT, M., FISCHER, B., JUNG, G., NEUMANN, U., WEIB, M., WECKESSER, J., KOFFMANN, P., BESSLER, W.G., MITTENBUCHLER, K., 2000, Generation of antibodies directed against the low-immunogenic peptide-toxins microcystin-LR/RR and nodularin, *International Journal of Immunopharmacology*, 22, 339-353.
57. ELMACI, A., OBALI, O., 1997, Fitoplankton zooplankton ili kileri, *Ekoloji Çevre Dergisi*, 23, 16-20.
58. FIGUEIREDO, D.R., AZEITEIRO, U.M., ESTEVES, S.M., GONZALER, F.J.M., PEREIRA, M.J., 2004, Microcystin-producing blooms a serious global public health issue, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59, 151-163.
59. HOGER, S.J., 2003, *Problems during drinking water treatment of cyanobacterial-loaded surface waters: Consequences for human health*, PhD Thesis, Konstanz Üniversitesi.

60. ALBAY, M., AKÇAALAN, R., GUREVIN, C., AYKULU, G., 2004, Küçükçekmece Gölü'nde Microcystin'in dikey dağılımı ve çevresel parametreler ile olan ilişkilerinin incelenmesi, *Küçükçekmece Gölü ve Havzası için Çevre Yönetim Biriminin Oluşturulma Süreci ve Bölgeye Katkıları Çalışması*, 20-22 Ekim 2004, İstanbul, 35-40.
61. CODD, G.A., 2000, Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control, *Ecological Engineering*, 16, 51-60.
62. AZEVEDO, S.M.F.O., CARMICHAEL, W.W., JOCHIMSEN, E.M., RINEHART, K.L., LAU, S., SHAW, G.R., EAGLESHAM, G.K., 2002, Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru, Brazil, *Toxicology*, 181-182, 441-446.
63. COHEN, Y., GUREVITZ, M., 2006, The Cyanobacteria - ecology, physiology and molecular genetics, *Prokaryotes*, 4, 1074-1098.
64. HUISMAN, J., MATTHIJS, H.C.P., VISSER, P.M., 2005, *Harmful cyanobacteria*, Springer, Netherlands, 978-1-4020-3009-3
65. PAN, H., SONG, L., LIU, Y., BORNER, T., 2002, Detection of hepatotoxic Microcystis strains by PCR with intact cells from both culture and environmental samples, *Arch Microbiol*, 178, 421-427.
66. NEILAN, B.A., DITTMANN, E., ROUHIAINEN, L., BASS, R.A., SCHAUB, V., SIVONEN, K., BORNER, T., 1999, Nonribosomal peptide synthesis and toxicogenicity of cyanobacteria, *Journal of Bacteriology*, 181, 4089-4097.
67. KANEKO, T., NAKAJIMA, N., OKAMOTO, S., SUZUKI, I., TANABE, Y., TAMAOKI, M., NAKAMURA, Y., KASAI, F., WATANABE, A., KAWASHIMA, K., KISHIDA, Y., ONO, A., SHIMIZU, Y., TAKAHASHI, C., MINAMI, C., FUJISHIRO, T., KOHARA, M., KATOH, M., NAKAZAKI, N., NAKAYAMA, S., YAMADA, M., TABATA, S., WATANABE, M.M., 2007, Complete genomic structure of the bloom-forming toxic cyanobacterium Microcystis aeruginosa NIES-843, *DNA Research*, 14, 247-256.
68. JANSE, I., KARDINAAL, W.E.A., MEIMA, M., FASTNER, J., VISSER, P.M., ZWART, G., 2004, Toxic and nontoxic Microcystis colonies in natural populations can be differentiated on the basis of rRNA gene internal transcribed spacer diversity, *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3979-3987.
69. STANIER, R.Y., KUNISAWA, R., MANDEL, M., COHEN-BAZIRE, G., 1971, Purification and properties of unicellular Blue-Green Algae (Order Chroococcales), *Bacteriological Reviews*, 35, 171-205.
70. NEILAN, B.A., 2002, The molecular evolution and DNA profiling of toxic Cyanobacteria, *Curr. Issues Mol. Biol.*, 4, 1-11.

71. B RBEN, E., 2006, Polimeraz zincir reaksiyonu, *Astım Allerji İmmünoloji*, 4 (2), 92-94.
72. BUJNICKI, J.M., 2000, Phylogeny of the restriction endonuclease -like superfamily inferred from comparison of protein structures, *J Moll Evol*, 50, 39-44.
73. SEL, S.K., KASAP, H., KOÇ, F., GÜZEL, A. ., HERGÜNER, Ö., SARICA, Y., 2006, Spinal müsküler atrofi hastalarında SMN geni ekzon 7 ve 8'in moleküler analizi , *Türk Nöroloji Dergisi*, 12 (5), 353-361.
74. ORDORIK, L., FASTNER, J., KURMAYER, R., HISBERGUES, M., DITTMANN, E., KOMAREK, J., RHARD, M., CHORUS, I., 2004, Distribution of Microcystin-Producing and Non-Microcystin-Producing Microcystis sp. in European Freshwater Bodies: Detection of Microcystins and Microcystin Genes in Individual Colonies, *System. Appl. Microbiol.*, 27, 592-602.
75. FRANGEUL, L., QUILLARDET, P., CASTETS, A.M., HUMBERT, J.F., MATTHIJS, H.C.P., CORTEZ, D., TOLONEN, A., ZHANG, C., GRIBALDO, S., KEHR, J., ZILLIGES, Y., ZIEMERT, M., BECKER, S., TALLA, E., LATIFI, A., BILLAUT, A., LEPELLETIER, A., DITTMANN, E., BOUCHIER, C., MARSAC, N.T., 2008, Highly plastic genome of *Microcystis aeruginosa* PCC7806, a ubiquitous toxic freshwater cyanobacterium, *BMC Genomics*, 9, 1-60.
76. NEVELEC, M., BOUT, D., DESOLME, B., MARCHAND, H., MAGNE, R., BRUNEEL, O., GATEL, D., 2005, Evaluation of protective effect of DNA vaccination with genes encoding antigens GRA4 and SAG1 associated with GM-CSF plasmid, against acute, chronic and congenital toxoplasmosis in mice, *Vaccine*, 23, 4489-4499.
77. BAKER, J.A., NEILAN, B.A., ENTSCH, B., MCKAY, D.B., 2001, Identification of Cyanobacteria and their toxigenicity in environmental samples by rapid molecular analysis, *Environmental Toxicology*, 16 (6), 472-482.
78. SAKER, M.L., VALE, M., KRAMER, D., VASCONCELOS, D.M., 2007, Molecular techniques for the early warning of toxic cyanobacteria blooms in freshwater lakes and rivers, *Appl Microbiol Biotecnol*, 75, 441-449.
79. MCELHINEY, J., DREVER, M., LAWTON, L.A., PORTER, A.J., 2002, Rapid Isolation of a Single-Chain Antibody against the Cyanobacterial Toxin Microcystin-LR by phage display and Its use in the immunoaffinity concentration of Microcystins from water, *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5288-5295.
80. PAN, H., SONG, L., LIU, Y., BORNER, T., 2002, Detection of hepatotoxic *Microcystis* strains by PCR with intact cells from both culture and environmental samples, *Arch Microbiol*, 178, 421-427.

81. OUELLETTE, A.J.A., HANDY, S.M., WILHELM, S.W., 2006, Toxic Microcystis is widespread in Lake Erie: PCR detection of toxin genes and molecular characterization of associated Cyanobacterial communities, *Microbial Ecology*, 51, 154-165.
82. WILSON, A.E., SARNELLE, O., NEILAN, B.A., SALMON, T.P., GEHRINGER, M.M., HAY M.E., 2005, Genetic variation of the bloom-forming Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* within and among Lakes: implications for harmful algal blooms, *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (10), 6126-6133.
83. INNOK, S., MATSUMURA, M., BOONKERD, N., TEAUMROONG, N., 2005, Detection of *Microcystis* in lake sediment using molecular genetic techniques, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 1559-1568.
84. MIKALSEN, B., BOISON, G., SKULBERG, O.M., FASTNER, J., DAVIEZ, W., GABRIELSEN, T.M., RUDI, K., JAKOBSEN, K.S., 2003, Natural variation in the Microcystin synthetase operon *mcyABC* and impact on microcystin production in *Microcystis* strains, *Journal Of Bacteriology*, 185, 2074-2785.
85. MARAHIEL, M.A., STACHELHAUS, T., MOOTZ, H.D., 1997, Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis, *Chemical Reviews*, 97, 2651-2673.
86. NISHIZAWA, T., ASAYAMA, M., FUJII, K., HARADA, K., SHIRAI, M., 1999, Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide Microcystin in *Microcystis* spp. *J. Biochem*, 126, 520-529.
87. YOSHIDA, T., YUKI, Y., LEI, S., CHINEN, H., YOSHIDA, M., KONDO, R., HIROISHI, S., 2003, Quantitative detection of toxic strains of the cyanobacterial genus *Microcystis* by competitive PCR, *Microbes and Environments*, 18, 16-23.
88. KURMAYER, R., CHRISTIANSEN, G., GOOMPENBERGER, Y., FASTNER, J., 2005, Genetic identification of microcystin ecotypes in toxic cyanobacteria of the genus *planktothrix*, *Microbiology*, 151, 1525-1533.

## ÖZGEÇM

1979 yılında stanbul'da do dum. lkokulu Eyüp Halit Dervi brahim lkokulu 'nda, ortaokulu Ebu Suud Ortaokulu 'nda ve lise e itimimi ehremini Lisesi 'nin yabancı dil a ırlıklı bölümünde tamamladım. 1997 yılında stanbul Üniversitesi Tıbbi Laboratuvar Programı'na girdim ve 1999 yılında mezun oldum. 1999 yılında ba ladı ım stanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'nden 2004 yılında mezun olduktan sonra stanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü çşular Biyolojisi Programı 'na kayıt oldum. Ardından stanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Böl ümü'nden 2005 yılında Çift Anadal ö renimimi tamamlayarak mezun oldum. Aynı zamanda 1999 yılından bu yana stanbul Üniversitesi Cerrahpa a Tıp Fakültesi Fikret Biyal Merkez Ara tırma Laboratuvarı'nda Laborant ünvanı ile görev yapmaktayım.