

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Zostera* spp. EKSTRAKTI UYGULANAN *Artemia* LARVALARINA AİT
BASKIN BAKTERİ TÜRLERİNİN DNA BARKODLAMA TEKNİĞİ İLE
ANALİZİ**

Sevgi KAYNAR

SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2016**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Sevgi KAYNAR tarafından hazırlanan “*Zostera* spp. ekstraktı Uygulanan *Artemia* Larvalarına Ait Baskın Bakteri Türlerinin DNA Barkodlama Tekniği ile Analizi” adlı tez çalışması 20/07/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Hijran YAVUZCAN

Ankara Üniversitesi Su Ürünleri Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Hijran YAVUZCAN

Ankara Üniversitesi Su Ürünleri Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Emre KESKİN

Ankara Üniversitesi Su Ürünleri Anabilim Dalı

Üye : Yrd. Doç Dr. Ferhat ÇAĞILTAY

İstanbul Üniversitesi SUFAK Yetiştiricilik Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. İbrahim DEMİR

Enstitü Müdürü V.

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

20.07.2016

Sevgi KAYNAR

ÖZET

Yüksel Lisans Tezi

Zostera spp. EKSTRAKTI UYGULANAN *Artemia* LARVALARINA AİT BASKIN BAKTERİ TÜRLERİNİN DNA BARKODLAMA TEKNİĞİ İLE ANALİZİ

Sevgi KAYNAR

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hijran YAVUZCAN

Çalışma kapsamında, kıyıya vurmuş *Zostera* spp. deniz çayırlarından elde edilen ekstraktların, *Artemia* larvaları üzerindeki baskın bakteri türlerine olan etkileri moleküler teknikler kullanılarak analiz edilmiştir.

Ege Denizi kıyılarından toplanan *Zostera* spp. yapraklarından maserasyon yapılarak metanol, hekzan ve etil asetat içerikli 3 farklı ekstrakt elde edilmiştir. Hazırlanan 3 ekstraktın antimikrobiyal etkisinin ölçümü için rutin olarak kullanılan bakteri suşları ile ekstraktların MIC (en düşük önleyici konsantrasyon) değerleri hesaplanmıştır. Ticari olarak temin edilen *Artemia* kistleri hazırlanan yapay steril deniz suyunda (YSDS) 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Tespit edilen ekstrakt değerleri kistlerden çıkan *Artemia* larvalarına uygulanmış ve canlıların yaşama oranı hesaplanmıştır. Mortalite deneyleri, metanol ve etil asetat ile çözdürülmüş 2 ekstraktın *Artemia* larva çalışmalarına uygun olduğunu göstermiştir. Analizler doğrultusunda 2 ekstraktın ayrı ayrı uygulandığı ve herhangi bir maddeye maruz bırakılmayan larvaların bulunduğu 3 farklı deney düzeneği oluşturulmuştur. Deney sistemi 24 saatlik inkübasyona bırakılmış ve larvalardan direkt olarak DNA izolasyonu yapılmıştır. Aynı zamanda kontrol amaçlı olarak, hazırlanan YSDS filtre edilmiş ve kontaminasyon tespiti için filtreden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. DNA izolatlarından bakteriyel 16S rRNA geni ve içerdiği V4 bölgesi nested PCR tekniği ile çoğaltılmış ve dizi analizinden tür teşhisine gidilmiştir.

Uygulamalar sonunda gerçekleştirilen moleküler analizler sonucunda, YSDS'nin kontamine olmadığı, kontrol grubundaki larvaların mikrobiyotasındaki baskın bakteri türü *Bacillus litoralis* iken metanol ile çözdürülen *Zostera* spp. ekstrakt uygulamaları sonrasında ise kültüre edilemeyen *Bacteroides* sp. türü olduğu tespit edilmiştir.

Temmuz 2016, 42 sayfa

Anahtar Kelime: 16S rRNA, *Artemia* larvaları, Baskın Bakteriyel Komünite Analizi, DNA Barkodlama, nested PCR, *Zostera* spp.

ABSTRACT

Master Thesis

ANALYSIS OF DOMINANT BACTERIAL SPECIES FROM *Artemia* NAUPLII TREATED WITH *Zostera* SPP. EXTRACT USING DNA BARCODING

Sevgi KAYNAR

Ankara University
Institute of Science
Department of Fisheries and Aquaculture

Supervisor: Prof. Dr. Hijran YAVUZCAN

The aim of this study was analyse to the dominant bacterial species from *Artemia* nauplii treated with extracts from seagrass (*Zostera spp.*) detritus.

leaves of *Zostera* spp. were collected from coastal area of Aegen sea and three different extract was prepared using organic solvents (methanol, ethyl acetate and hexane). Extract's MIC (Minimal Inhibitory Concentration) values was calculated using the standart bacterial strains. *Artemia* cycts were obtained commercially and hatched in artifical steril sea water (ASSW). After the 48 h nauplii were harvested exposure to extracts then lethality of *Artemia* nauplii were assessed. Mortality experiment indicate that methanol and ethyl acetate extracts were suitable for *Artemia* nauplii study. In the direction of analysis two extracts was applied *Artemia* nauplii. After the 24 h incubation DNA was isolated from *Artemia* nauplii of natural culture and teo aextract application. As contamination analyses of ASSW water was filtered and DNA was isolated from filter membran. 16S rRNA and V4 region of DNA extract were amplified with nested PCR using bacteria specific primers and squence analyses were performed.

Molecular analysis indicated that *Bacillus litoralis* is the dominant bacterial species in natural microbiota of *Artemia* naupliiii and uncultured *Bacteroides* sp. was identified as the dominant bacteria strain of methanol applied group.

July 2016, 42 pages

Key Words: 16S rRNA, *Artemia* nauplii, DNA Barcoding, Dominant Bacterial Community Analysis, nested PCR, *Zostera* spp.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bana her türlü araştırma olanağı sağlayan, bilgi ve önerileri ile bana yol gösteren değerli danışmanım Prof. Dr. Hijran YAVUZCAN'a (Ankara Üniversitesi Su Ürünleri Anabilim Dalı)

Deneyimleri ve fikirleriyle bana yeni bakış açıları kazandıran, maddi ve manevi hiçbir yardımı esirgemeyen hocam Doç. Dr. Emre KESKİN'e (Ankara Üniversitesi Su Ürünleri Anabilim Dalı)

Çalışmaya kattıkları veri ve madde yardımlardan ötürü Prof. Dr. Gülçin SATAN, Dr. Serkan ÖZBİLGİN, Dr. Burçin ERGENE (Ankara Üniversitesi Farmakognozi Anabilim Dalı) ve Yrd. Doç. Müjde ERYIMAZ'a (Ankara Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı)

Bana yüksek lisans öğrenimim boyunca yol arkadaşlığı yapan, yardımsever Esra Mine ÜNAL ve Tuğçe AYGEN başta olmak üzere Evrimsel Genetik Laboratuvarına,

Bilim merakımı körükleyen, doğaya ve insana saygıyı öğreten dedem Sait AYDEMİR'e

Beni bu günlere getiren ve hep yanımda olan babam Osman, annem Zuhal KAYNAR'a

Yüksel lisans öğrenimim boyunca uzaklarda olsalar da aslında hep yanımda olan canım ablam Duygu KAYNAR ve kuzenim Esin AYDEMİR'e

Maddi manevi her zaman yanımda olan, bana kuvvet veren, ikinci ailem; İpek Özlem MURATOĞLU, Müge ÖÇAL ve Özlem PARLAR ÜRKER olmak üzere tüm arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, "TÜBİTAK" tarafından "114Y141 nolu ÇAYDAG Projesi" tarafından desteklenmiştir. Kuruma yardımlarından ötürü şükranlarımı sunarım.

Sevgi KAYNAR

Ankara, Temmuz 2016

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1 <i>Artemia</i> sp.....	3
2.1.1 <i>Artemia</i> larva biyolojisi.....	4
2.1.2 <i>Artemia</i> ekolojisi	6
2.1.3 Su ürünleri üretiminde canlı yem olarak <i>Artemia</i> kullanımı.....	6
2.1.4 <i>Artemia</i> larva inkübasyonu ve geliştirilen teknikler	7
2.1.4.1 Dekapsülasyon	7
2.1.4.2 Besin içeriği çalışmaları.....	8
2.1.4.3 Mikrobiyota çalışmaları	8
2.2 Sekonder Metabolitler	9
2.2.1 Sekonder metabolit kaynağı olarak deniz bitkileri.....	10
2.2.2 <i>Zostera</i> spp. deniz bitkisi ve sekonder metabolitleri	11
2.3 Mikrobiyota Teşhisinde Moleküler Yöntemler	12
2.3.1 Ribozomal RNA (rRNA).....	12
2.3.2 Jel elektroforezi	14
2.3.2.1 DNA elektroforezi	15
2.3.3 Polimeraz zincir reaksiyon (Polymerase Chain Reaction PCR).....	15
2.3.3.1 Nested PCR.....	16
2.3.4 DNA dizi analizi	17
2.3.5 Filogenetik Analiz	18
2.3.5.1 Parsimoni	18
2.3.5.2 Maksimum olasılık ve genetik uzaklık	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
3.1 Materyal.....	20
3.1.1 <i>Zostera</i> spp. örneklerinin elde edilmesi	20
3.1.2 <i>Artemia</i> spp. kist elde edilmesi	20
3.2 Yöntem	21
3.2.1 <i>Zostera</i> spp. örneklerinden ekstrakt elde edimi	21
3.2.2 Antibiyogram testi.....	22
3.2.3 <i>Artemia</i> kist inkübasyonu	22

3.2.4 Ekstrakt çözeltilisinin hazırlanması	23
3.2.5 <i>Artemia</i> larvalarında mortalite hesaplaması	23
3.2.6 DNA izolasyonu	24
3.2.7 DNA'nın spektrofotometrik analizi.....	24
3.2.8 DNA konsantrasyonunun ayarlanması.....	25
3.2.9 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	25
3.2.10 Saflaştırma (Pürifikasyon)	26
3.2.11 DNA Dizi Analizi	26
3.2.11.1 Dizilerin Hizalanması	27
3.2.11.2 Nükleotid Kompozisyonu	27
3.2.11.3 Nükleotid Çifti Frekansı	27
3.2.12 Tür tanımlama ve filogenetik analiz.....	27
4. ARŞTIRMA BULGULARI.....	28
4.1 <i>Artemia</i> Larvalarında Mortalite Hesaplaması.....	28
4.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	28
4.3 Filogenetik Analiz	29
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	31
KAYNAKLAR	35
ÖZGEÇMİŞ.....	41

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat Derece
A	Adenin
C	Sitozin
cm	Santimetre
G	Guanin
Kg	Kilogram
l	Litre
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
ml	Mililitre
ng	Nanogram
nm	Nanometre
S	Svedberg
sn	Saniye
T	Timin
UV	Ultraviyole
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre

Kısaltmalar

ATCC	American Type Culture Collection
Bç	Baz Çifti
CFU	Colony Forming Unit (Koloni Oluşturan Birim)
ddATP	Dideoxyadenosine triphosphate (Dideoksiadenozin Trifosfat)
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

DHA	Docosahexaenoic Acid (Dokosaheksaenoik Asit)
DMSO	Dimethylsulphoxide (Dimetil Sülfoksit)
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoxynucleotide Triphosphates (Deoksinükleotid Trifosfat)
EMP	Earth Microbiome Project
EPA	Eicosapentaenoic Acid (Eykosapentenoik Asit)
HUFA	Highly Unsaturated Fatty Acid (Doymamış Yağ Asidi)
MIC	Minimal Inhibitory Concentration (En düşük önleyici konsantrasyon)
NJ	Neighbor Joining
OD	Optical Density (Absorbans)
PCR	Polymerase Chain Reaction
ppt	Parts Per Thousand
RDP	Ribosomal Database Project
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
YSDS	Yapay Steril Deniz Suyu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 <i>A. franciscana</i> türünün gelişim modeli	4
Şekil 2.2 Embriyonun kabuktan çıkışı ve İnstar I evresi	5
Şekil 2.3.a. <i>Zostera marina</i> .b. <i>Zostera noltii</i>	11
Şekil 2.4.a. V4 gen bölgesi.b. 16S rRNA yapısı	14
Şekil 3.1 Toplanan <i>Zostera</i> spp. örnekleri	20
Şekil 3.2 Ekstrakt örnekleri.....	21
Şekil 3.3 <i>Artemia</i> kist inkübasyonu	22
Şekil 3.4 <i>Artemia</i> larva deney düzeni	24
Şekil 4.1 16S rRNA gen bölgesinin PCR ürünlerinin %2'lik Jelde görüntüsü.....	29
Şekil 4.2 V4 gen bölgesinin PCR ürünlerinin %2'lik Jelde görüntüsü.....	29
Şekil 4.3 V4 bölgesi için çizilen NJ (Neighbor Joining) dendrogramı	30

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 <i>Artemia</i> 'nın sınıflandırılması.....	3
Çizelge 3.1 <i>Artemia</i> larvalarının mortalite deney planı.....	23
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan primerler ve PCR protokolleri.....	26
Çizelge 4.1 Ekstraktların mortalite değerleri.....	28
Çizelge 4.2 16S rRNA - V4 gen bölgesine ait dizileri karşılaştırılan örneklerin birbirlerine olan uzaklık indeksleri (Pairwise Distance).....	30



1. GİRİŞ

Branchiopoda sınıfına ait *Artemia* sp. türleri, yüksek tuzluluğa sahip su ortamlarında yaşayan bir canlı grubudur. Bu canlı grubunun ilk gelişim evresi (instar I-II), besin değerleri ve büyüklükleri sebebiyle sudaki organizmaların larval formları için canlı yem olarak kullanılmaktadır (Sorgeloos vd. 2001).

Artemia larvalarının instar I evresinde sindirim sistemi aktif olmamakla birlikte instar II evresinde spesifik olmayan filtreli bir beslenme şekline geçerler. Bu beslenme şekli sebebiyle yaklaşık olarak 50 µm büyüklüğünde mikro-alg, protozoa, parçalanmış organik materyal, bakteri gibi geniş yelpazede besin çeşidi ile beslenirler (Toi vd. 2013). Beslenme temelli olmakla birlikte canlıya uygulanan zenginleştirme, dekapsülasyon gibi iyileştirme yöntemleri de larvalardaki bakteri yükünü artırmaktadır (Verschuere vd. 2000, Sorgeloos vd. 2001, Irianto ve Austin 2002, Høj vd. 2009). Bu sebeple larvaların yetiştiricilik sistemine verilmeden önce barındırdığı bakteriyel kompozisyon, larva ve yetiştiriciliği hedeflenen canlı grupları için yararlı veya zararlı bakteri türleri içermektedir.

Artemia'nın ekonomik öneminden dolayı, larvaların barındırdığı bakteriyel biyotanın tespiti ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar canlının, *Acinetobacter*, *Flexibacter* gibi yararlı gruplar için bir yaşam alanı görevi gördüğü ve yetiştiriciliği yapılan larvalara karşı patojen özellikteki bakteri türlerinin yetiştiricilik alanına geçişinde bir vektör olduğunu göstermiştir (D'agostino 1980, Gomez-Gil vd. 1994, Lopez-Torres ve Lizarraga-Partida 2001, Høj vd. 2009).

Su ürünleri yetiştiriciliğine artan ilgiyle birlikte gelişen canlı yem ihtiyacı, *Artemia* larvalarındaki bakteriyel biyotanın iyileştirme çalışmalarını hızlandırmıştır. Bu çalışmalar, larvaların yetiştiricilik alanlarına verilmeden önce barındırdığı zararlı bakteriyel yüklemeyi azaltmak ve/veya faydalı kolonizasyonu artırmaya yöneliktir. Kullanılan yöntemlerin başında dekapsülasyon, ozon, formaldehit ve çeşitli antibiyotik, immünostimulan, biyoenkapsülasyon uygulamaları gelmektedir (Gilmour vd. 1975,

Benavente ve Gatesoupe 1988, Gomez-Gil vd. 1994, Hameed ve Blasubramanian 2000, Gatesoupe 2002, Tolomei vd. 2004, Giménez vd. 2006, Smith ve Ritar 2006).

Yöntemlerin avantajlarıyla birlikte barındırdıkları dezavantajlar, yeni uygulamaların kapısını açmaktadır.

Moleküler tekniklerin gelişmesiyle su ortamında bulunan pek çok bakteri türünün, rutin olarak kullanılan besiyerlerinde kültürünün yapılamadığı ortaya konmuştur. Bu sebeple son 10 yılda *Artemia* bakteriyel biyota analizlerinde, kültürden bağımsız polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction/PCR) temelli moleküler teknikler kullanılmaya başlanmıştır. Moleküler teknikler kullanılarak yapılan analizlerde *Artemia* larvalarında *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria* ve *Firmicutes* filumlarına ve temelde *Vibrio*, *Pseudomonas* ve *Rhizobium* cinslerine ait türlerin varlığı tespit edilmiştir (Høj vd. 2009, Tkavc vd. 2011, Riddle vd. 2013, Quiroz vd. 2015).

Bu çalışmada; kıyıya vuran *Zostera* spp. türlerinden elde edilen metanol, etil asetat ve hekzan kimyasallarıyla çözdürülmüş ekstraktların, *Artemia* larvalarının barındırdığı bakteriyel koloniye olan etkisinin moleküler temelli PCR metodu kullanılarak analizi amaçlanmıştır. Bu amaçla İzmir/Urla ilçesindeki Gülbahçe ve Kalabak mevkiilerinin kıyı kesimlerinden *Zostera* spp. örnekleri toplanmış ve örneklerden ekstraktlar oluşturulmuştur. Ticari yollarla elde edilen *Artemia* kistleri standartlara ve steril koşullara uygun olarak inkübasyona bırakılmış ve instar I-II larva formları, ekstraktlarla yapılan antibiyogram testlerinden elde edilen sonuçlar baz alınarak 24 saat uygulamaya maruz bırakılmıştır. Moleküler basamakta ekstrakt uygulanan ve uygulanmayan *Artemia* larvalarının barındırdığı bakteri türlerinin 16S rRNA geni (Lim vd. 2006) ve içerdiği V4 bölgesi (Apprill vd. 2015, Parada vd. 2015), PCR ile çoğaltılmıştır. Jel elektroforezi ile tespit edilen bantlar kontrol edildikten sonra örneklere dizi analizi uygulanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 *Artemia* sp.

Anostraca kabuklu takımına ait olan *Artemia* cinsi, kendisi için predatör özelliğe sahip pek çok canlının yaşayamayacağı aşırı tuzlu habitatlara adaptif bir canlı grubudur. Canlının tuzlu su karidesi adıyla ilk kaydı, 1756 yılında Schlösser tarafından İngiltere’de yapılmıştır. Linnaeus canlıyı *Cancer salinus* olarak isimlendirdikten sonra Leach canlının ismini, günümüzde de sıkça kullanılan *Artemia salina* formuna getirmiştir (Abatzopoulos vd. 2002).

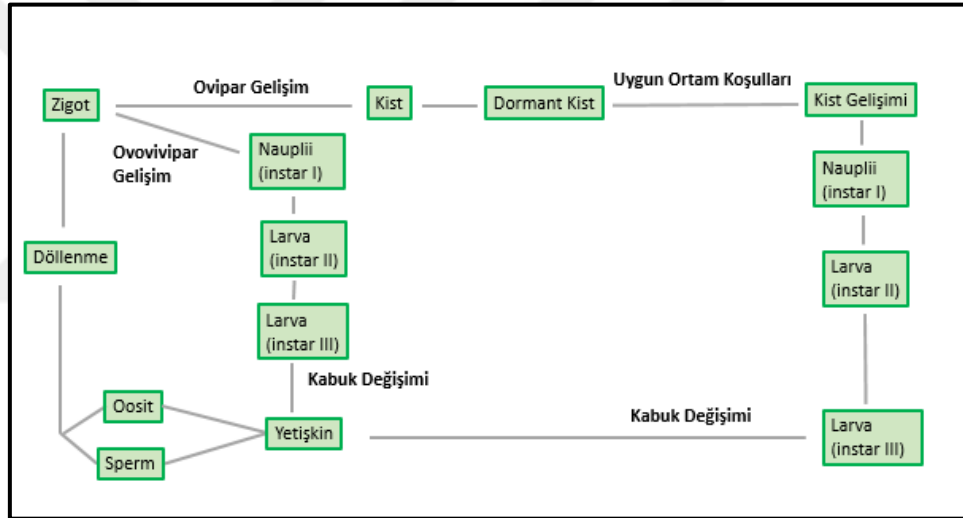
Ortamdaki tuzluluk farkının *Artemia* morfolojisinde değişime sebep olduğu 20. yüzyılın başlarına kadar fark edilememiş ve bu sebeple cins için tanımlanan tür ve alt tür sayısında giderek bir artış olmuştur. Sonraki yıllarda artan isim sisteminden uzaklaşmış ve canlı için *Artemia salina* ismi referans gösterilmiştir. Canlının özellikle göçmen kuşlar yoluyla farklı tuzlu su habitatlarına transferi, aynı ortamda farklı iki türün bulunmasını mümkün kılmış ve Akdeniz bölgesinde partenogenetik - zigogenetik karışımların olduğu tespit edilmiştir. Bu sebeplerden dolayı bilim insanları, etkili biyokimyasal, sitogenetik ve morfolojik kanıtlar olmadığı sürece isimlendirmenin *Artemia* sp. şeklinde yapılmasını önermektedir (Lavens ve Sorgeloos 1996).

Çizelge 2.1 *Artemia*'nın sınıflandırılması (Martin ve Davis 2001)

Alem	Animalia
Şube	Arthropoda
Alt Şube	Crustacea
Sınıf	Branchiopoda
Takım	Anostraca
Familya	Artemiidae
Cins	<i>Artemia</i>

2.1.1 *Artemia* larva biyolojisi

Artemia'lar, partenogenetik ve biseksüel üreme özelliğine sahip türlerden oluşmaktadır. Kuzey Amerika, biseksüel türleri barındırırken Avrupa, Asya ve Afrika partenogenetik ve biseksüel popülasyonları bir arada bulundurur. *Artemia* cinsine ait dişilerde ovoviviparite ve ya oviparite gözlemlenir ve bu özellik ortam koşullarına göre değişir (Şekil 2.1). Canlılar uygun ortam koşullarında ovovivipar embriyo gelişimi ile ortama nauplius larvası bırakırken yüksek tuzluluk, düşük oksijen, sıcaklık stresi ve besin azlığı gibi durumlarda ovipar embriyo gelişimine geçerek kistik embriyo oluştururlar (Jackson ve Clegg 1996, Liang ve MacRae 1999).



Şekil 2.1 *Artemia franciscana* türünün gelişim modeli (Liang ve MacRae 1999)

Kist formu, metabolik açıdan inaktif olup kuru ortam koşullarında gelişim göstermez. Tuzlu suya bırakılan bikonkav şekilli kistler küresel forma geçer ve kabuk içindeki embriyonun metabolik aktiviteleri başlar. Yaklaşık 20 saat sonra kist membranı çatlar ve embriyo ortaya çıkar. Embriyonun boş kistten ayrılma aşamasında nauplius gelişimi tamamlanır ve larva suda serbest yüzmeye geçer (Şekil 2.2).

İnstar I evresinde (400-500 μm) kahverengi-turuncu renge sahip olan larva 3 çift uzantıya (1. anten, 2. anten, mandibula) sahiptir ve ventral bölge, geniş bir labrum ile

çevrilidir. İnstar I evresindeki canlı, besinleri sindirebilecek bir sindirim sistemine sahip değildir ve gelişimini embriyo besin kesesi rezervinden sürdürür.



Şekil 2.2 *Artemia* larvasının kistten çıkışı ve instar I aşaması (<http://www.fao.org>, 2016b)

Larvalar, su sıcaklığına bağlı olarak yaklaşık 6-8 saat sonra instar II evresine geçer. Larvaların gövdesi daha uzun olup 2. antenlerin gelişimiyle aktif olarak yüzmeye başlarlar. Bu evrede 1-50 μm büyüklüğündeki besin partiküllerini (alg hücreler, bakteri, parçalanmış organik materyal, protozoa) seçici olmayan filtre sisteminden geçirerek beslenirler. Renksiz ve serbest amino asit bakımında fakirdirler. Bu sebeplerden ötürü besin olarak kullanım açısından daha elverişsizdirler.

Artemia larvası, instar II evresinden sonra morfolojik değişimler geçirir. Gövde bölgesinde çift loblu uzantılar oluşmaya başlar ve bu yapı thoracaplara dönüşür. Larvanın lateral bölgesinde kompleks gözler gelişir. İnstar X evresinden itibaren antenler hareket fonksiyonunu kaybederek seksüel farklılaşmaya girerler. Bu şekilde canlı kabuk değiştirerek ve değişim göstererek larval evreyi tamamlar ve yetişkin hale gelir.

2.1.2 *Artemia*'nın ekolojisi

Artemia'lar, pek çok türün yaşayamayacağı ekstrem ortamlara adaptif olan bir canlı grubudur. Aynı zamanda bu cinse ait türler; tuzluluk, iyonik kompozisyon, sıcaklık ve oksijen değeri gibi abiyotik faktörlerin değişimini fizyolojik olarak tolere edebilmektedir. Bu sebeplerden ötürü *Artemia* populasyonları 5 kıtaya yayılmıştır. Tropikal, subtropikal, ılıman iklim koşullarına sahip 500 den fazla doğal tuz göllerinde ve insan yapımı tuz üretim alanlarında bulunmaktadır. Predatör tehlikesi barındırmayan bu ortamlarda yaşayabilmeleri, sahip oldukları

- Güçlü ozmoregülatör sistemleri
- Yüksek tuzluluktaki düşük oksijen miktarına karşı geliştirilen solunum pigmentlerini sentezleme kapasiteleri
- Elverişli olmayan ortam koşullarında dormant kist üretebilme yetenekleri vb. adaptif özellikleri sayesinde.

2.1.3 Su ürünleri üretiminde canlı yem olarak *Artemia* kullanımı

Larval beslemede yeni teknikler geliştirilmekle birlikte ticari olarak değerli balık ve kabuklu türlerinin su ürünleri kitlesel yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılan yöntem canlı yem uygulamasıdır. Doğal ortamda larvalar, geniş varyetede planktonik organizmalar ile beslenirken yetiştiricilik sistemlerinde kullanılan yapay besin ağı kopepodlar, rotiferler ve *Artemia*'lar gibi birkaç taksonu içermektedir.

Artemia, balık ve kabukluların larva kültüründe kullanılan canlı yemler arasında en çok tercih edilen bir gruptur. Kist olarak adlandırılan dormant embriyo formu, yaklaşık olarak 24 saatlik tuzlu su inkübasyonundan sonra oluşan larvaların yetiştiricilik ortamına verilebilmesi, *Artemia* cinsini su ürünleri yetiştiriciliğinde iş gücü düşük, kullanışlı bir canlı yem grubu olarak öne çıkarmaktadır. Bununla birlikte *Artemia* larvasının instar II formunda geliştirdiği seçici olmayan beslenme sistemi, zenginleştirme teknikleri kullanılarak yetiştiriciliği yapılacak canlıya uygun besin

içeriğini sağlamada ve biyoenkapsülasyon işlemi ile mikrobiyal koloninin değişimde kullanıcılara kolaylık sağlamaktadır.

Artemia'nın ticari bir ürün olarak kullanımı 1930'larda bazı araştırmacıların balık larvaları için doğal olan zooplanktonlar yerine *Artemia* larvalarını kullanmasıyla başlamıştır. 1950'lerde *Artemia* kisti akvaryum ve pet ticaretinde önemli bir yer kaplamıştır. 1960'ların başında ise balık ve kabuklu yetiştiricilik çalışmalarında *Artemia* kist pazarı yeni bir ticari sektör olarak öne çıkmıştır. Günümüzde kistin yıllık talebi yaklaşık olarak 2,500-3,000 ton olup ileride bu miktarın artacağı öngörülmektedir (Allan ve Burnell 2013).

2.1.4 *Artemia* larva inkübasyonu ve geliştirilen teknikler

Tuzlu su karidesi *Artemia*'nın ticari olarak kullanılmaya başlanmasıyla laboratuvar ortamlarında yapılan sayısız çalışma, yetiştiricilik sistemlerine entegre edilebilecek kuluçka prosedürünün geliştirilmesini sağlamış ve bu yöntem standart uygulama haline getirilmiştir. Fakat canlının biyolojik yapısı nedeniyle karşılaşılan sorunları gidermek adına prosedürlerin modernleştirilmesi dikkat çekilen konu başlıklarından biridir.

2.1.4.1 Dekapsülasyon

Modernleştirmeye yönelik geliştirilen ilk tekniklerden biri, hipoklorit uygulamalı dekapsülasyon yöntemidir. Bu yöntem, kistin kuluçka öncesi kabuk zarının inceltmesini amaçlamaktadır ve aynı zamanda kist yüzeyinden yetiştiricilik alanına geçen fungal ve bakteriyel yüklemeyi azaltma amaçlı profilaktik dezenfeksiyon olarak da kullanılabilir. Fakat dezenfekte olan kistlerden çatlama aşamasında gliserol çıkışı olur ve madde, bakterilerin hızlı bir şekilde kolonizasyonuna sebebiyet vermektedir. Özellikle bu madde *Artemia* ile beslenen larvaları tehdit eden *Vibrio* cinsi bakteri türleri için besi yeri özelliği göstermektedir (Sorgeloos vd. 2001).

2.1.4.2 Besin içeriği alışmaları

Canlı yemin besinsel içeriğini artırma konusu, iyileştirmeye yönelik uygulamalardan bir diğerdir. İlk olarak balık ve kabuklu larvaları için yüksek öneme sahip olan doymamış yağ asidi (HUFA) ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bununla birlikte eykosapentenoik asit (EPA) ve dokosaheksaenoik asit (DHA) maddelerinin yetiştiriciliği hedeflenen larva türleri için gerekli olduğu tespit edilmiştir. Kimyasal zenginleştirme ürünlerinin yağ asitleri (EPA) yüklemesiyle sınırlandırılmaması ve canlı yemin protein, fosfolipit ve enerji içeriği bakımından bir denge oluşturması amaçlanmaktadır. Bu sebeplerden ötürü sterol, antioksidan, pigment, enzim ve vitamin gibi faydalı bileşiklerin takviyesi yapılmaktadır. Günümüzde bu eksikliği gidermek adına immün sistemi uyarıcı, doğal içerikli mikroalgler sektöre ticari olarak girmiştir. Kuru formülasyonu sayesinde daha geç ryeyen, kolay saklanabilir ve dozaj ayarlamasının rahat yapıldığı ürünlerdir. Bu sebeple *Artemia* zenginleştirme çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır (Allan ve Burnell 2013).

2.1.4.3 Mikrobiyota alışmaları

Yetiştiricilik ortamına mikrobiyal canlıların geçişinde ana girdilerden biri canlı yemlerdir. Canlı yemler larval biyokütle barındırırlar ve bu yüzden kontaminasyonun potansiyel kaynağı olarak gözükmektedirler. Pek çok çalışma, larval yetiştiricilik sistemlerine *Vibrio* spp. gibi zararlı bakteri girişleri için *Artemia* larvalarının bir vektör görevi gördüğünü ortaya koymuştur.

Bakteri yüklemesi, *Artemia* homojenatında 10^8 CFU/ml gibi yüksek değerlere ulaşabilmektedir. Larval yetiştiricilik alanındaki bakteri akışını azaltmak için uygulanan rutin yöntemlerin başında dekapsülasyon ve dezenfektanlar gelmektedir. Bu hijyen uygulamaları bazı ortamlarda bakteriyel yüklemeyi azatsa da kesinlikten uzaktır. Özellikle *Artemia* kist inkübasyonu ve protein yağ asidi içerikli zenginleştirme prosedürleri sırasında bakteri miktarının arttığı belirtilmiştir. Ek olarak *Artemia*

larvalarının bağırsak biyotasında artış gözlemlenmiştir (Sorgeloos vd. 2001, Hoj vd. 2009).

Bu sebeplerden ötürü larval besin firmaları, bakteriyel yüklemeyi uygun değerlerde tutabilecek bakteriostatik ajanlar barındıran özel ürünler geliştirmeye başlamışlardır. Bu uygulamalar; kist odaklı tedaviler, bakteriostatik özellikli zenginleştirme ürünleri ya da *Artemia* kistininküübasyonu veya zenginleştirme aşamasında eklenen ayırıştırma formüllerini kapsamaktadır. Çalışmalar kapsamında uygulanan formaldehit, UV, ozon ya da peroksit temelli dezenfektanlar pozitif etkilerinin dışında canlı yemin ölümüne ya da enerji düşüklüğüne sebep olabilir. Aynı zamanda barındırdıkları toksik kalıntılar yetiştiriciliği hedeflenen larvalar için de potansiyel bir risktir. Tüm bu sebeplerden dolayı en iyi teknik, canlı yem kültüründe uygulanacak probiyotik çalışmalarıyla yetiştiriciliği yapılan balık-kabuklu kültürüne uygun bakteri biyomas değişimidir (Gatesoupe 2002).

Artemia larvalarının seçici olmayan filtreli beslenme şekli; ilaç, immünostimülan, antibiyotik gönderiminde canlılığın kullanılabilirliğini mümkün kılmaktadır. Yağda çözünen ilaçlar ya da antibiyotikler *Artemia* larvalarına uygulanan biyoenkapsülasyon ürünleriyle birlikte verilebilmektedir. Literatürde (Roiha vd. 2010, Allender vd. 2011, Kanjana vd. 2011) pek çok kayıt, deniz yosun ekstraktının *Artemia* larvaları için tıbbi ve besin amaçlı kullanabileceğini göstermektedir.

2.2 Sekonder Metabolitler

Modern kimya ve biyolojinin 200 yıllık geçmişinde üreme, solunum, büyüme gibi yaşamsal faaliyetlerde primer metabolitlerin rolü tanımlanmıştır (Bourgaud vd. 2001). Karbonhidratlar, sitokromlar, amino asitler ve yağ asitleri gibi primer metabolitlere ek olarak bitkiler, geniş varyetelerde bileşikler üretirler. Sekonder metabolit adı altındaki bu maddeler aslında, bir hücresel aktivite sırasında gelişen ara reaksiyonların ürünleridir ve bu özellikleriyle primer metabolitlerden ayrılırlar.

Deniz canlıları, karasal metabolitlere göre eşsiz yapısal özelliklere sahip zengin kimyasal bileşikler içerirler. 1970'lerden bu zamana, denizel mikroorganizma, omurgasız ve bitki orjinli 21.855'ten fazla doğal biyoaktif madde keşfedilmiştir (Blunt vd. 2012). Özellikle denizel organizmalar, yeni çevre koşullarına adaptasyonu gerektiren ve ekstrem koşulları içeren kompleks habitatlarda yaşamalarından ötürü diğer organizmalarda bulunmayan geniş varyetelerde sekonder metabolitler üretirler. Dahası, denizel organizmaların bu muazzam taksonomik çeşitlilikleri göz önünde tutulduğunda denizel çevrenin barındırdığı yeni biyoaktif bileşiklerin için yapılacak araştırmalar, sınırsız bir alan gibi gözükmetedir. Bu bağlamda karasal ekosistemlerin biyolojik ürünlerin ulaşılabilirliği sebebiyle bir noktada görevini tamamlamışsa da okyanuslardaki denizel biyoçeşitliliğin yeni terapötik ajanlar sağlayabileceği umulmaktadır (Bugni ve Ireland 2004).

2.2.1 Sekonder metabolit kaynağı olarak deniz bitkileri

Deniz bitkileri, geniş spektrumlardaki biyolojik aktiviteleri ile karakterize edilen çeşitli sekonder metabolitleri üretebilmelerinden dolayı deniz orjinli biyoaktif bileşiklerin kaynağı olarak görülürler. Deniz bitkileri özellikle makro algler, ışık ve yüksek oksijen konsantrasyonunun olduğu kombinasyonlarda büyür ve gelişirler. Bu faktörler, serbest radikallerin ve diğer güçlü oksidatif ajanların oluşumuna neden olmakla birlikte deniz bitkilerinin metabolizmaları boyunca bir fitodinamik hasardan çok seyrek zarar gördükleri bilinmektedir ve bu gerçek canlıların hücrelerinin bazı koruma mekanizmaları ve bileşikleri barındırdığı olgusunu desteklemektedir (Matsukawa vd. 1997). Pek çok deniz bitkisi, cansız substrat üzerindeki biyofilmle karşılaştırıldığında talluslarında çok az sayıda mikro ve makro epifit barındırdığı tespit edilmiştir (Hellio vd. 2001, Lam ve Harder 2007). Bu sebeple deniz bitkilerinin bakteriyel kolonilerin büyümesini ve tutunmasını engelleyen sekonder metabolitler ürettiği düşünülmektedir (Maximilien vd. 1998).

2.2.2 *Zostera spp.* deniz bitkisi ve sekonder metabolitleri

Zosteraceae familyası yarı batık olarak denizlerde yaşayan ve sürünücü bir gövdeye sahip çok yıllık otsu bitkileri içerir (Şekil 2.3.a,b). Ilıman denizlerde yayılış gösteren bu familya üyelerinden *Zostera marina* Linnaeus ve *Zostera noltii* Hornem türleri ülkemizin batı ve güney kıyılarında yayılış göstermektedir (Cuny vd. 1995).



(a)



(b)

Şekil 2.3.a *Zostera marina*, b *Zostera noltii* (<http://eol.org>, 2016a)

Bir deniz çayırı türü olan *Zostera spp.* türleri, predatörlerden, epifitlerden ve mikroorganizmalardan kendini korumak için fenol bileşikleri içeren sekonder metabolit üretirler (Harrison ve Chan 1980, Harrison 1982). *Zostera marina* yapraklarında 4 farklı fenolik asit (gallik, kafeik, kumarik ve ferulik asit) saptanmıştır (Vergeer vd. 1997, Ravn 1992). *Z. noltii* Hornem yapraklarında ise Luteolin-7-O-glukozit, kafeik asit, klorojenik asit ve rozmarinik asit saptanmıştır. Ayrıca, %27 oranında flavanoitler tanımlanmıştır (Maleš ve Plazibat 2000). Farklı çalışmalarda *Zostera spp.* deniz bitkilerinin antimikrobiyal aktivite ve antioksidan aktivite gösterdikleri saptanmıştır (Zaporozhets, 1991). Harrison ve Chan (1980), *Z. marina* metanol ekstraktının *Staphylococcus aureus* bakterisini ve bazı istilacı mikro alglerin büyümesini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmadan yola çıkılarak yapılan çalışmada insan cildinde bulunan 3 patojene karşı (2 bakteri; *Staphylococcus aureus*, *S. pidermidis* ve 1 mantar; *Candida albicans*) *Z. marina* ekstraktının antimikrobiyal aktivitesi ölçülmüştür. Çalışma sonucunda; bitkinin flavonoit, kumarin, fenolik asit ve terpenoit gibi önemli

antimikrobiyal bileşikler içerdiği keşfedilmiştir. 3 patojene karşı antimikrobiyal aktivite, etil asetat çözücüsüyle hazırlanmış ekstraktta görülmektedir (Choi vd. 2009).

2.3 Mikrobiyota Teşhisinde Moleküler Yöntemler

Tür tanımlamada kullanılan geleneksel yöntemler, pek çok sınırlamaya sahiptir. Bunlardan birincisi, fenotipik esneklik ve yanlış tanımlamalara sebep olabilecek karakterlerdeki genetik çeşitliliktir. Geleneksel tanımlamalardaki bir diğer problem ise taksonomistlerin, rutin tür tanımlamada kullandıkları morfolojik anahtarların değişkenliğidir. Bu anahtarlar canlının yaşam döngüsünün belli dönemlerine göre değişim göstermektedir. Bu sebeple morfoloji odaklı tanımlamalarda, alanında bilgili ve deneyimli taksonomistlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Tür tanımlama için geliştirilen en güncel moleküler yöntem olan DNA barkodlama bu aşamada araştırmacılar için büyük kolaylıklar sağlamaktadır. DNA barkodlama esasında kısa ve standardize edilmiş bir DNA bölgesinin hızlı, doğru ve ekonomik bir şekilde analiz edilmesini ve elde edilen verinin türün genetik olarak karakterize edilmesinde kullanılmasına dayanmaktadır. Barkodlamada kullanılacak gen bölgeleri, güvenilir ve rutin olarak sekanslanabilir özellikte olmalıdır. Aynı zamanda çalışma sonucunda elde edilecek veriler kolaylıkla karşılaştırılabilir ve türleri birbirinden ayırt edebilecek farklılığı gösterecek şekilde olmalıdır. 1980'lerin son yıllarından itibaren geleneksel metotlara alternatif olarak, bakteriyel tür teşhisinde DNA temelli teknikler kullanılmaya başlamıştır (Woese 1987). Bu olgu eşliğinde, evrimsel süreçte korunmuş küçük alt birim ribozomal RNA geni üzerine çalışmalar yürütülmüş ve 16S rRNA gen bölgesi, bakteri tür tespitinde belirleyici gen bölgesi olarak kullanılmaya başlanmıştır.

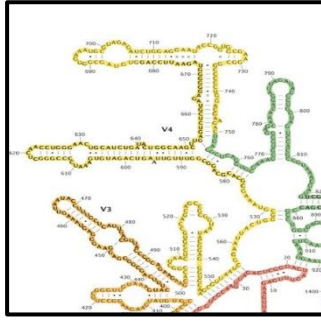
2.3.1 Ribozomal RNA (rRNA)

Tarihsel süreç boyunca protein sentezindeki rolü ve diğer pek çok fonksiyonu sebebiyle ribozomal RNA (rRNA)'lar, yaşayan organizmalardaki evrimsel ilişkiyi tespit etmede kullanılan temel molekül olmuştur. rRNA, fonksiyonel olarak değişmeyen, evrensel

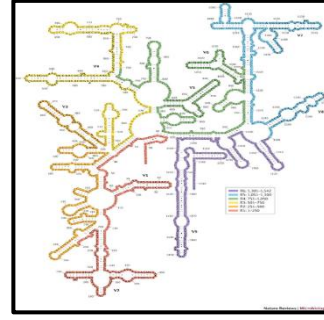
açından geniş varyetelere dağılmış ve filogenetik uzaklığı belirlemede kullanılacak korunmuş dizilere sahiptir. Bu diziler bir organizmadan diğerine değişen küçük farklılıklar barındırırlar. İki tür arasındaki bazların sayısal farkı, tür ayrımının dışında evrimsel uzaklığın ölçümünü de vermektedir. Kullanışlı bölgelerin dizi analizi, bir organizmanın diğerine olan yakınlığını ve olası evrimsel pozisyonunu filogenetik ağacın kılavuzluğuyla gösterir.

Prokaryotlarda ribozom, 30S ve 70S birimlerinden oluşur ve bu birimler 23S, 16S ve 5S boyutlarında küçük alt birim rRNA moleküllerine ayrılırlar. Bakterilerde bulunan 16S (1500 bç) ve 23S (2900 bç) rRNA'lar, canlıların arasındaki ilişkiyi tespit etmek için kullanabilecek pek çok korunmuş bölge içerir. 16S rRNA, 23S'den deneysel anlamda daha kullanışlı olduğu için prokaryotlarda filogeninin gelişimine katkı sağlamıştır (Şekil 2.4.b). 1970'lerin başında Carl Woese tarafından başlatılan filogenetik araç olarak ribozomal RNA'lardaki küçük alt birim kullanımı günümüzde de hala yaygın olarak kullanılmaktadır (Madigan vd. 2004).

16S rRNA'yı oluşturan bölgelerden biri olan ve yüksek değişkenliğe sahip V4 bölgesi (Şekil 2.4.a), mikrobiyal komünitenin karşılaştırılması ve araştırılması ile ilgili çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır (Caporaso vd. 2011, Kozich vd. 2013). Aynı zamanda dizinin yaklaşık olarak 250 bç uzunluğunda olması yeni nesil dizilemeye uyarlanmasını mümkün kılmıştır. Global mikrobiyom projesi olan Earth Microbiome Project (EMP) çalışmalarında ise 16S rRNA'nın V4 bölgesi, tanımlayıcı bölge olarak protokolda yer almaktadır ve günümüzde bakteri-arke filogenetik çalışmalarında sıkça tercih edilen bölge konumuna gelmiştir.



(a)



(b)

Şekil 2.4.a V4 gen bölgesi, b 16S rRNA yapısı (Yarza vd. 2014)

2.3.2 Jel elektroforezi

Elektroforez, moleküler biyoloji ve biyokimya deneylerinde sıklıkla kullanılan, makro molekülleri ayırtmamızı ve bazı durumlarda saflaştırmamızı sağlayan bir tekniktir. Elektroforez tekniği, protein ve nükleik asitlerin, büyüklüklerindeki, yüklerindeki ve biçimlerindeki farklılıklar göz önüne alınarak oluşturulmuştur. Yüklü moleküller elektrik alanına maruz bırakıldıklarında, yüklerinin özelliklerine göre pozitif veya negatif kutuplara doğru, yer değiştirme eğilimindedirler. Proteinler, net + veya net – yüklerine sahiptirler. Nükleik asitler, sahip oldukları fosfat gruplarından dolayı eksi yüklüdürler ve elektrik alanına maruz bırakıldıklarında + kutup'a (anot) doğru yer değiştirirler. Protein ve nükleik asitlerin yer değiştirdiği sabit platformları matriksler veya jeller oluşturur. Yürütülmek istenen örneğin çeşidine göre bu platformlarında çeşitleri vardır. Jel hazırlandıktan sonra ve örnekler jellerin içinde bulunan özel bölmelere yerleştirildikten sonra, elektroforez çözeltisinin içine aktarılır, bu çözelti, pH değerinin sabit kalmasını ve içerdiği iyonlarla, elektrik akımının düzgün bir şekilde iletilmesini sağlar. Jeller, agaroz veya poliakrilamid kullanılarak hazırlanabilir ve farklı amaçlar için kullanılır.

2.3.2.1 DNA elektroforezi

DNA moleküllerinin analizinde çok çeşitli yöntemler kullanılmakla beraber tüm laboratuvarlarda rutin olarak yararlanılan en basit yöntemlerden biri jel elektroforezi'dir (Şekil 2.7). Yöntemin avantajlarının basit ve hızlı olması, ayrıca diğer yöntemlerle yeterli düzeyde ayıramayan DNA fragmentlerinin ayrılmasını sağlamaktır. DNA'nın elektroforetik analizinin temeli, bu molekülün elektriksel bir alanda, jel üzerindeki göçüne dayanır. DNA molekülü, öncelikle her bir nükleotide bulunan fosfat grubu nedeniyle solüsyon içinde negatif yüklüdür. Uzunlukları ne olursa olsun, tüm DNA molekülleri yaklaşık aynı yük/kütle oranına sahiptirler. Ancak, küçük DNA molekülleri elektroforez jelinde daha hızlı hareket ederler. Eğer bir jel üzerine değişik uzunluğa sahip DNA fragmentleri içeren bir karışım yürütülürse, bu DNA fragmentleri büyüklüklerine göre birbirinden ayrılır. Eğer jel üzerindeki bantları boyar veya fülöresas hale getirerek görünür kılarırsak, bu bantları fragment büyüklüklerine göre ayırt edebiliriz.

2.3.3 Polimeraz zincir reaksiyon (Polymerase Chain Reaction PCR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR); hedef nükleik asit dizisinin, başlatıcı özelliği olan iki oligonükleotid primer kullanılarak enzimatik olarak çoğaltılması esasına dayanır. *In vitro* koşullarda DNA çoğaltılmasının çeşitli nedenleri arasında başlıcaları; özgün bir DNA parçasının bol miktarda elde edilmesi, moleküler analizinin yapılması ve genetik mühendisliği amaçları doğrultusunda rekombinant organizmalar elde etmek üzere gen aktarımı için kullanılmasıdır. Teknik 1985'de Kary Mullis tarafından bulunmuştur ve bu buluş Nobel ödülü kazandırmıştır.

PCR üç temel işlem basamağında gerçekleşir;

Denatürasyon: İlk aşamada DNA molekülünün çift zincirli yapısı yüksek ısı yardımıyla ayrılır. Çoğunlukla 94-97°C arasında 15-60 sn. süresince uygulanır.

Bağlanma (Annealing): Denatürasyonu takiben daha düşük ısılarda oligonükleotid primerler, ayrılmış olan tek zincirli DNA üzerinde kendilerine özgül bölgelere bağlanırlar. Bu olay çoğunlukla 47-60°C arasında 30-60 sn'de gerçekleşir ya da 50-52°C'de 3-5 dakikada gerçekleşir.

Uzama (Extension-Elongation): Uzama aşamasında sıcaklık 72°C'ye kadar arttırılarak DNA polimeraz enziminin tamamlayıcı DNA zincirini uzatması sağlanır. Elongasyon basamağının süresi kullanılan polimerazın cinsine ve çoğaltılacak DNA'nın uzunluğuna göre değişir. 70-74 °C'de 2 dakikada gerçekleşir.

PCR'in bakteriyoloji'de yaygın olarak kullanıldığı alanlar;

- Tanıda süreyi kısaltmak ve kültürü yapılamayan bakterilerin oluşturduğu infeksiyonları tanımlamak.
- Antibiyotik almış hastalarda veya stoklanmış örneklerde tanı koyma.
- Bakterilerin toksikojenik suşlarının ayırt edilmesi.
- İnvaziv olmayan metotlar kullanarak erken tanı koyma.
- Antimikrobiyal direncin saptanması.
- PCR'in tiplendirmede kullanılması.

2.3.3.4 Nested PCR

Nested PCR iki aşamalı PCR işleminden oluşmaktadır. İlk amplifikasyonda çoğaltılmak istenen gen bölgesine uygun primer çiftleri kullanılarak geniş bir dizi çoğaltılır. İkinci basamaktaki amplifikasyonda ise bu gen bölgesinin barındırdığı kısa dizi (100-300 bç), kendisine spesifik primer çifti kullanılarak çoğaltılır, bu sayede PCR tekniğinin hassasiyeti geliştirilmiş olur.

2.3.4 DNA dizi analizi

Gelişen tekniklerle birlikte ribozomal RNA dizilemesi de değişime uğramıştır. Gerçek diziyi elde etmede pek çok yöntem kullanılmakla birlikte, bu gün neredeyse bütün bilim insanları, genomik DNA'dan 16S rRNA kodlayan gen bölgesini çoğaltan PCR reaksiyonu kullanmaktadır ve daha sonra standart dideoksi DNA dizileme yöntemiyle PCR ürünü dizilenir. En çok kullanılan DNA dizi analizi yöntemi, James Sanger ve arkadaşları tarafından geliştirilendir. Bu işlemde, dizisi belirlenecek DNA molekülü bir seri eşlenik zincirlerinin sentezlenebilmesi için önce tek zincirli hale dönüştürülür. Bu eşlenik zincirlerden her biri; farklı, özgül nükleotidlerde gelişigüzel sonlanmıştır. Bu işlem sonucunda; elektroforezle birbirinden ayrılan seri DNA parçaları ortaya çıkar ve DNA dizisinin saptanması için incelenir. Bu reaksiyonda ilk adım, DNA'nın ısıyla denatüre edilerek tek zincirli duruma getirilmesidir. Tek zincirli DNA, 3' ucuyla birleşecek olan primerler ile karşılaştırılır. Primer bağlı tek zincirli DNA örnekleri dört ayrı tüpe pay edilir. Bir sonraki adımda, tüplere DNA polimeraz ve dört tip deoksiribonükleotid trifosfat ilave edilir. Ayrıca her tüpe, dideoksinükleotid denilen yapısı değiştirilmiş deoksiribonükleotidlerden bir tanesi az miktarda ilave edilir. Dideoksinükleotidler, 3'-OH grubu yerine 3'-H içerirler. Deoksiribonükleotidlerden biri ya da primer daha sonra dizi analizini yapabilmek için radyoaktivite ile işaretlenir. Her tüpe DNA polimeraz konarak primer, kalıp zincirin komplementerini oluşturacak şekilde 5'-3' yönünde uzatılır.

DNA sentezi gerçekleşirken polimeraz, uzayan zincire deoksiribonükleotid yapısında 3'-OH bulunmadığı için diğer nükleotid ile 3' bağı yapamaz ve DNA sentezi durur. Örneğin, ddATP'nin olduğu tüpte, polimeraz enzimi dATP yerine ddATP'yi zincire katınca zincirin uzaması sonlanır. Reaksiyon ilerledikçe, ddATP tüpünde A'nın bulunduğu her konumda sonlanmış olan DNA molekülleri elde edilecektir. Diğer tüplerde, reaksiyonlar sırasıyla G,C ve T'de sonlanacaktır. Her bir reaksiyon tüpündeki DNA parçaları jel elektroforezinde yan yana yüklenerek ayrıştırılır. Sonuçta, jel görüntülenerek bantların merdivene benzer görüntüsü ortaya çıkar. Aşağıdan yukarıya doğru okunan nükleotid dizisi, kalıba komplementer olan DNA zincirinin 5'-3' yönündeki dizisine karşılık gelir (Klug vd. 2011).

2.3.5 Filogenetik Analiz

Filogeni, organizmaların evrimsel tarihi olarak bilinmekte ve farklı türler arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacıyla da filogenetik analizlerden yararlanmaktadır. Genler yardımıyla organizmanın evrimsel geçmişini araştırma temelli filogenetik çalışmalar, DNA ve proteinlerde meydana gelen değişikliklerin hızını ve karakterini belirlemek için kullanılmakta ve moleküler düzeyde gerçekleştirilmektedir. Filogenetik analizlerde türler arasındaki evrimsel ilişkiyi ortaya koymada en uygun yaklaşım, elde edilen verilerin çeşitli akış şemaları ve istatistiksel analizler yoluyla filogenetik ağaçlara dönüştürülmesidir (Saitou ve Imanishi 1989, Ünal 2014).

2.3.5.1 Parsimoni

Bir gözlemin en az karmaşık haliyle açıklanması parsimoni olarak tanımlanabilir. Her bir türün en az evrimsel değişikliklerine dayanan ağaçları karşılaştırma ve en basit muhtemel ağacı seçme parsimoni yöntemleridir (Klug vd. 2011). Parsimoniye göre en iyi ağaç tüm karakterler için en az karakter durum değişimini ifade eden ağaçtır. Kelime olarak tutumluluk anlamına gelen parsimoni, evrimsel süreçte neler olduğuna ilişkin sonuca varılırken, karmaşıklık yerine basit açıklamaların seçilmesi olarak açıklanabilir (Freeman ve Herron 1999, Keskin 2007, Ünal 2014).

2.3.5.2 Maksimum olasılık ve genetik uzaklık

Joseph Felsenstein 1981'de elde edilen bilgiyi daha etkili kullanmak adına ve olası birçok ağaç içerisinde en iyi ağacı seçmede istatistiksel testler kullanma olanağını yaratmak için, maksimum olasılık tahmini olarak bilinen yeni ve güçlü bir yaklaşım sunmuştur (Freeman ve Herron 1999, Keskin 2007, Ünal 2014).

Olasılık metodlarında olduğu gibi, uzaklık analizleri de araştırmacıların çoklu karakterlerden gelen bilgiyi iki takson arasındaki tek bir bütün uzaklığın ölçümüne

evirmek için bir karakter modeli öngörmelerine gereksinim duyar. DNA dizileri için yaygın biçimde kullanılan bir formül, aynı yerdeki çoklu baz değişimleri için transisyon ve transversiyon baz değişimlerinin frekansındaki farklılıkları düzeltir (Kimura 1980, Keskin 2007, nal 2014).



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 *Zostera* spp. örneklerinin elde edilmesi

Çalışma kapsamında kıyıya vuran *Z. marina* ve *Z. noltii* örnekleri, İzmir'in Urla ilçesindeki Gülbahçe (°19'45.7"N 26°39'07.5"E) ve Kalabak (°19'45.7"N 26°39'07.5"E) mevkilerinin kıyı kesimlerinden toplanmıştır (Şekil 3.1). Toplanan örneklerin tür tayininde, literatürden yararlanılmıştır (Cirik vd 2011). Yaş ağırlığı 20-25 kg olan örnekler Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı'na iletilmiştir.



Şekil 3.1 Toplanan *Zostera* spp. örnekleri

3.1.2 *Artemia* spp. kist elde edilmesi

Çalışma kapsamında kullanılacak olan *Artemia* kistleri, büyük çaplı deniz balıkları yetiştiricilik sistemlerinde sıklıkla kullanılan, Utah'da bulunan Great Salt Lake'den ticari olarak temin edilmiştir. Kistler ambalaj açıldıktan sonra +4 °C'de kuru ortamda muhafaza edilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 *Zostera* spp. örneklerinden ekstrakt elde edimi

TÜBİTAK 114Y141 no'lu proje kapsamında kıyıya vurun *Zostera* spp. örneklerinden ekstrakt elde edimi, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmokognozi Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilmiştir. Proje konusu olan *Zostera* spp. ölü yaprakları kurutulduktan sonra toz haline getirilip, önce n-hekzan ile oda sıcaklığında ekstre edilmiştir. 8 saatlik ekstraksiyon sonunda hekzan süzülüp artık üzerine taze çözücü konulmuştur. Hekzan ile 3 kere yapılan 8 saatlik ekstraksiyonların ardından süzüntüler birleştirilerek, artık kurutulmuş ve kurumuş numunenin üzerine aynı oranda etil asetat ilave edilip 3 kere 8 saat ekstre edilmiştir. Etil asetat ile elde edilen süzüntüler birleştirilip artık kurutulduktan sonra, aynı işlem metanol ile tekrar edilmiştir. Sonuçta elde edilen hekzan, etil asetat ve metanollü ekstreler vakum altında yoğunlaştırılmıştır. Deney sonucunda metanol, etil asetat ve hekzan kimyasallarıyla çözdürülmüş 3 farklı ekstrakt oluşturulmuştur (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Ekstrakt örnekleri

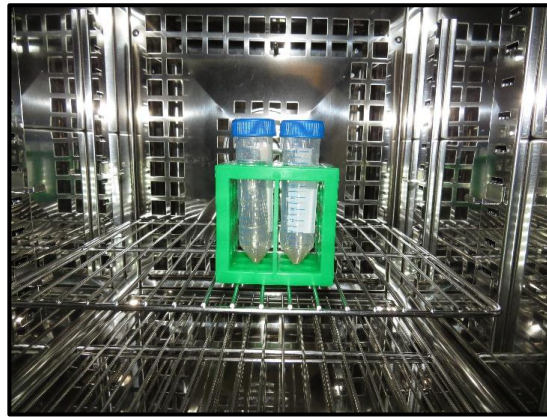
3.2.2 Antibiyogram testi

Elde edilen ekstraktların antimikrobiyal aktivitesi, antibiyogram testleri kullanılarak Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmada test bakterileri olarak *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ve *Vibrio alginolyticus* ATCC 17749 standart suşları kullanılmıştır.

3.2.3 Artemia kist inkübasyonu

Çalışma kapsamında *Artemia* kistlerinin steril ortam koşullarında inkübasyonunu sağlamak için 19 gr deniz tuzu 500 ml steril suda çözülüp 0,45 µm gözenekli selüloz nitrat filtreden geçirildikten sonra otoklavlanmıştır. %38 tuzluluğa sahip yapay steril deniz suyu (YSDS) biyolojik kabinde falkon tüplere 40 ml miktarında dağıtılmıştır.

400 mg'lık *Artemia* kisti, içerisinde 20 ml steril su ve 20 ml hipoklorit çözeltisi bulunan petri kabında 5-10 dakika bekletilerek dekapülasyon uygulaması gerçekleştirilmiştir. Daha sonra steril su ile temizlenen dekapüle kistler, içerisinde 40 ml YSDS bulunan falkon tüplerine aktarılmış ve 28 °C'de ışık altında 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.3). Tüm uygulamalar biyolojik kabinde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3 *Artemia* kist inkübasyonu

3.2.4 Ekstrakt çözeltilisinin hazırlanması

Ekstrakte edilen 3 farklı örnek antibiyogram değerlerine göre DMSO (Dimetil sülfoksit) kimyasalında çözdürülmüş ve uygulamaya hazır hale getirilmiştir.

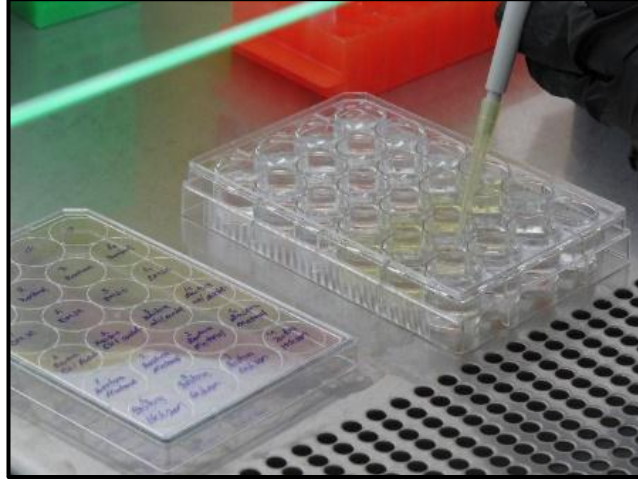
3.2.5 *Artemia* larvalarında mortalite hesaplaması

İnkübasyon sonrası kistlerden çıkan *Artemia* larvaları, her bir kuyuya 10 birey olarak dağıtılmış ve kuyulara antibiyogram testleriyle belirlenen dozlarda ekstrakt eklenmiştir (Çizelge 3.1). Her deney 4 tekrarlı gerçekleştirilmiş ve uygulama biyolojik kabin içinde yapılmıştır (Şekil 3.4). Deney düzeneği 28 °C’de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında her bir kuyudaki yaşayan ve hareketsiz larvalar sayılmış ve mortalite yüzdesi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (Krishnan vd. 2016);

$$\% \text{Mortalite} = \frac{\text{Ölü Larva Sayısı}}{\text{Deney’de Kullanılan Larva Sayısı}} \times 100$$

Çizelge 3.1 *Artemia* larvalarının mortalite deney planı

1. grup	Metanol Ekstrakt Uygulaması	10 <i>Artemia</i> Larva + 10.000 µg/ml ekstrakt (100 µl) + 1,800 ml YSDS
2. grup	Etil Asetat Ekstrakt Uygulaması	10 <i>Artemia</i> Larva + 10.000 µg/ml ekstrakt (100 µl) + 1,800 ml YSDS
3. grup	Hekzan Ekstrakt Uygulaması	10 <i>Artemia</i> Larva + 10.000 µg/ml ekstrakt (100 µl) + 1,800 ml YSDS
4. grup	DMSO Uygulaması	10 <i>Artemia</i> Larva + 100 µl DMSO + 1,900 ml YSDS
5. grup	Kontrol Grup	10 <i>Artemia</i> Larva + 2 ml YSDS



Şekil 3.4 *Artemia* larva deney düzeni

3.2.6 DNA izolasyonu

DNA izolasyonu, metanol (1. grup) ve etil asetat (2. grup) ile çözdürülmüş ekstraktları uygulanan larva grupları ile her hangi bir ekstrakt uygulanmayan larva kontrol gurubu (5. grup) kullanılarak yapılmıştır. Her grup için kurulan 4 tekrarlı setlerin barındırdığı larvalar birleştirilmiş, %70'lik etanolde 3 dakika bekletildikten sonra distile su ile durulanmıştır. Larvalardan, ticari bakteri DNA izolasyon kitinin (GeneMATRIX Tissue and Bacterial DNA Purification Kit) üretici tarafından önerilen protokolü kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Deney düzeneğinin kontamine olmadığını tespiti için YSDS'den alınan 100 µl'lik örnek, ticari Bio-Trace DNA Prufication Kit kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Örnekler izole edildikten sonra PCR aşamasında kullanılana kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.7 DNA'nın spektrofotometrik analizi

İzole edilen DNA'nın miktar ve saflık analizleri spektrofotometrede gerçekleştirilmiştir. DNA konsantrasyonu 260 nm'de 1 OD'nin 50 ng/ml çift zincir DNA'nın absorpsiyon değeri olduğu göz önüne alınarak hesaplanmıştır. DNA'nın saflığını değerlendirirken 260 nm/280nm (DNA absorpsiyon değeri/protein absorpsiyon değeri) ve 260 nm/230

nm (DNA'nın absorpsiyon değeri/Fenol'ün absorpsiyon değeri) değerleri göz önünde bulundurulmuştur.

3.2.8 DNA konsantrasyonunun ayarlanması

Spektrofotometrik analiz ile konsantrasyonları belirlenecek örnekler, ana stoklarının kontamine olamaması ve tüm örneklerin DNA konsantrasyonlarının standardize edilmesi amacı ile DNA konsantrasyonu 50 ng/ml olacak şekilde sulandırılarak saklanmıştır.

3.2.9 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

İlk PCR işleminde, DNA izolasyonu gerçekleştirilen tüm örnekler kullanılarak 16S rRNA gen bölgesi için spesifik olan 27F-1492R primer çifti ile PCR kurulmuştur. Bu basamakta elde edilen PCR ürünü %2'lik agaroz jele yüklenerek 150 voltta 25 dakika yürütülmüş ve uygun bant boyu veren örnekler, 16S rRNA geninin V4 bölgesini hedefleyen nested PCR için kalıp olarak kullanılmıştır. Yapılan 2. PCR işleminde 1. PCR ürününün V4 bölgesi, 515f-Y ve 806R-B primer çifti kullanılarak çoğaltılmıştır. Yapılan her iki PCR işlemi için gradient termal döngü cihazında farklı bağlanma sıcaklıkları ile gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları sonucunda uygun döngü koşulları saptanmış ve reaksiyon, ticari olarak elde edilen TAQ DNA 5X Master Mix (Solis Bio Dyne) kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.2). Belirtilen şartlarda negatif kontrol kurularak gerçekleştirilen reaksiyonlar sonrasında çoğaltılan DNA'ların uygun bant boyu verdiği tespit edilerek saflaştırma işlemi öncesinde +4 °C'de saklanmıştır

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan primerler ve PCR protokolleri

Hedef Gen/bölge	16S rRNA		V4	
Primer Çiftleri	27F & 1492R		515f-Y & 806R-B	
Primer Dizileri	F:AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG R:CGGTTACCTTGTTACGACTT		F:GTGYCAGCMGCCGCGGTAA R:GGACTACNVGGGTWTCTAAT	
Çoğaltılan Kısım	~ 1500 Baz Çifti		~ 250 Baz Çifti	
PCR Protokolü	Termal Döngü Profili	Reaksiyon	Termal Döngü Profili	Reaksiyon
	95 °C 5 dakika	2µl TAQ DNA	95 °C 4 dakika	2µl TAQ DNA
	94°C 1 dakika	5X Master Mix	95°C 30 saniye	5X Master Mix
	55°C 30 saniye x 35	0,1 µl F primer	53°C 45 saniye x 35	0,1 µl F primer
	72 °C 1 dakika	0,1 µl R primer	72 °C 2 dakika	0,1 µl R primer
	72°C 7 dakika	0,5 µl Kalıp DNA 7,3 µl PCR Water	72°C 10 dakika	0,5 µl Kalıp DNA 7,3 µl PCR Water

3.2.10 Saflaştırma (Pürifikasyon)

Dizi analizinde kullanılacak PCR ürünlerinin saflaştırılmasında kolon yöntemi temelli ticari DNA pürifikasyon kiti (Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System) üretici firma ta rafından önerilen protokol takip edilerek kullanılmıştır. Saflaştırılan PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde, 100 voltta 30 dakika yürütülmüş ve UV görüntüleme sistemi yardımı ile görüntülenmiştir.

3.2.11 DNA dizi analizi

DNA dizi analizini gerçekleştirmek için ön denemelerde ABI 3130XL Genetic Analyser platformunda Big Dye Cycle Sequencing Kit V.3.1 kullanılarak Dideoksinükleotit zincir sonlanması reaksiyonu için protokoller ve döngü koşulları optimize edilmiştir. Çalışma kapsamındaki tüm DNA dizileme reaksiyonları, üretici tarafından önerilen ve çalışmamıza göre optimize edilmiş protokollere göre yapılmıştır.

Nükleotid dizileri DNA dizi analizi yöntemi ile ortaya çıkarılarak ve elde edilen nükleotid dizileri GenBank veri tabanında kayıtlı referans diziler ile karşılaştırılıp hizalanmış ve filogenetik analizlerde kullanılmak üzere standart hale getirilmiştir.

3.2.11.1 Dizilerin hizalanması

Tüm örneklere ilişkin DNA dizileri GenBank ve RDP (Ribosomal Database Project) veri tabanlarından elde edilen referans diziler yardımı ile ClustalW (Thompson vd. 1994), MEGA 6 (Tamura vd. 2013) ve Sequencher 5.0 yazılımları kullanılarak hizalanmıştır.

3.2.11.2 Nükleotid kompozisyonu

Hizalanması gerçekleştirilen DNA dizilerinin nükleotid kompozisyonları ve ortalama A-T/G-C içerikleri yüzde olarak analiz edilmiştir. Analizlerin gerçekleştirilmesinde MEGA 6 ve Sequencher 5.0 yazılımları kullanılmıştır.

3.2.11.3 Nükleotid çifti frekansı

DNA dizilerinin nükleotid çifti frekansı analizleri her tür için değerlendirilmiş ve her bir tür için sonuç tabloları oluşturulmuştur. Analizler MEGA 6 ve Arlequin 3.5 yazılımları ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.12 Tür tanımlama ve filogenetik analiz

DNA barkodlama tekniği ile elde edilen diziler, RDP ve NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanları kullanılarak sınıflandırılarak ve NCBI BLAST algoritması kullanılarak NCBI nükleotid veritabanındaki bilinen dizilerle karşılaştırılarak bakteriyel tür tespiti gerçekleştirilmiştir. Ağaçların güvenilirliğinin kontrolünde 1000 tekrarlı bootstrap testlerinden yararlanılmıştır.

4. ARŞTIRMA BULGULARI

4.1 *Artemia* Larvalarında Mortalite Hesaplaması

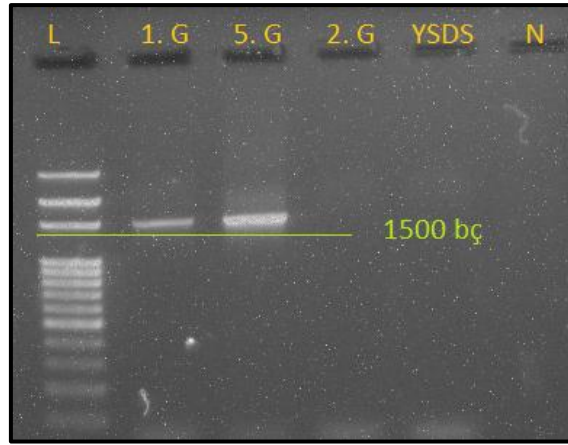
Larval deneylerde, 3 farklı çözücüyle hazırlanan ekstraktların *V. alginolyticus* suşunda verdiği MIC değerleri kullanılmıştır. Belirlenen dozlarla kurulan deneyin, 24 saatlik inkübasyondan sonra mortalite değerleri çizelge 4.1’de verilmiştir. Hekzan içerikli ekstrakt çalışmasında mortalite değeri %100 olduğu için DNA izolasyon çalışmalarından bu örneğin uygulandığı sistem çıkarılmıştır.

Çizelge 4.1 Ekstraktların mortalite değerleri

		Deneyde Kullanılan Larva Sayısı	Ölü Larva Sayısı	48 Saat Sonra Mortalite (%)
1. Grup	Metanol Ekstrakt Uygulaması (10mg/ml)	40	20	50
2. Grup	Etil Asetat Ekstrakt Uygulaması (0,625 mg/ml)	40	12	30
3. Grup	Hekzan Ekstrakt Uygulaması (10mg/ml)	40	40	100
4. Grup	DMSO Uygulaması (100 µl)	40	16	40
5. Grup	Kontrol Grup	40	5	12,5

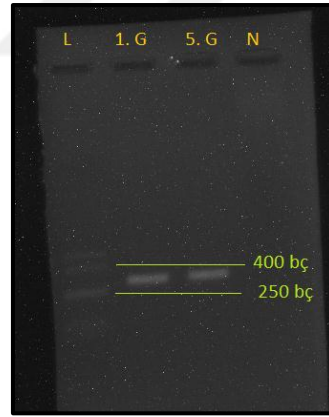
4.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Metanol, etil asetat içerikli ekstraktlardan ve YSDS’den elde edilen DNA örneklerinin 16S rRNA gen bölgeleri çoğaltıldı. %2’lik agaroz jel kullanılarak yapılan elektroforetik analiz sonrasında görüntülenen örneklerden bant vermeyen etil asetat örneğinin analizleri tekrarlandı fakat sonuç alınmadığı için çalışmadan çıkartılmıştır. YSDS örneğinde herhangi bir bantlaşma görülmemesi çalışmanın kontamine olmadığı göstermektedir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 16S rRNA gen bölgesinin PCR ürünlerinin %2'lik jelde görüntüsü

16S rRNA gen gölgesinde bantlaşma veren 1. ve 5. grup örneklerinin PCR ürünü kullanılarak V4 gen bölgesi çoğaltılmıştır. %2'lik agaroz jel kullanılarak yapılan elektroforetik analiz sonrasında her iki grupta da bantlaşma görülmüştür (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 V4 gen bölgesinin PCR ürünlerinin %2'lik jelde görüntüsü

4.3 Filogenetik Analiz

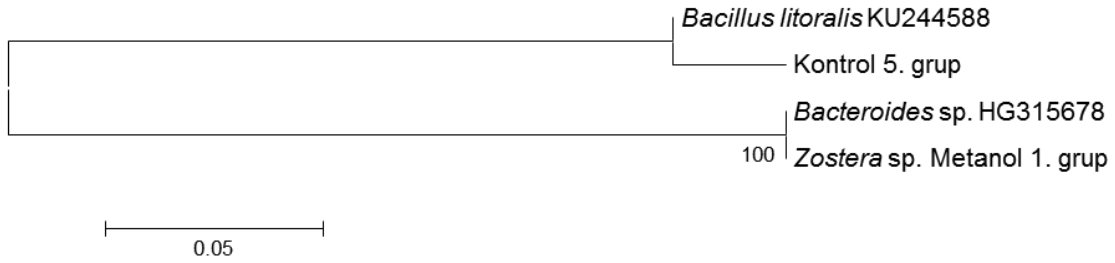
Dizi analizi sonrasında elde edilen DNA dizileri, RDP ve GenBank veri tabanlarıyla karşılaştırılmış ve MEGA 6 programı kullanılarak hizalanmıştır. Yapılan BLAST karşılaştırmaları sonucunda, 5. grupta tespit edilen baskın bakteri türüne ait DNA dizisinin ≥ 98 oranında *Bacillus litoralis*, 1. gruba ait baskın bakteri DNA dizisinin ise

≥ 100 oranında *Bacteroides* cinsine ait olan kültüre edilemeyen aneorobik bir bakteri türü olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 16S rRNA - V4 gen bölgesine ait dizileri karşılaştırılan örneklerin birbirilerine olan uzaklık indeksleri (Pairwise Distance)

		1	2	3	4
1	<i>Zostera</i> sp. Metanol (1. Grup)		0,000	0,042	0,045
2	<i>Bacteroides</i> sp.	0,000		0,042	0,045
3	<i>Bacillus litoralis</i>	0,325	0,325		0,009
4	Kontrol (5. Grup)	0,357	0,357	0,020	

Sıralanan tüm nükleotid dizileri, Neighbor-joining yöntemi kullanılarak MEGA6 yazılımı ile analiz edilmiş ve V4 gen bölgesi için dendrogramı oluşturulmuştur (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 V4 bölgesi için çizilen NJ (Neighbor Joining) dendrogramı

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Artemia lar, balık ve kabuklu su ürünlerinin larva kültüründe kullanılan yemler besinler arasında en çok tercih edilen gruptur. Kist olarak adlandırılan dormant embriyo formu, yaklaşık olarak 24 saatlik tuzlu su inkübasyonundan sora kistten çıkan larvaların yetiştiricilik ortamına verilebilmesi, *Artemia*'nın su ürünleri yetiştiriciliğinde iş gücü düşük, kullanışlı bir canlı yem grubu olarak öne çıkarmaktadır. Günümüzde *Artemia* larvaları, çipura, levrek, kalkan ve karides larvalarının kitlesel yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır. *Artemia*'nın yetiştiricilik sistemlerinde alternatif canlı yem olarak değer kazanmasıyla birlikte canlılar üzerine yapılan çalışmalar bakteriyel biyota analizlerine doğru yönelmiştir. Bu alanla ilgili yapılan ilk çalışma 1770'de Tyson tarafından gerçekleştirilirken 1990'lara doğru bakteriyel çalışmalar canlıların üretimi ve yetiştiricilik ortamlarına verilimi sırasındaki kontaminasyon odaklı olmuştur. Austin vd. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada *Artemia* larvalarından balıklara karşı patojen etki gösteren *Vibrio campbellii* bakteri türü izole edilmiştir. Aynı zamanda Lopez-Torres ve Lizarraga-Partida (2001) *Artemia* larvalarında *Vibrio* cinsine ait türlerin varlığının yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan analizler *Artemia*'ların *Vibrio* cinsine bağlı balık ve kabuklu su ürünleri için patojen pek çok bakteri türünü barındırdığını göstermesiyle birlikte çalışmalar dezenfektan özellikli madde kullanımına kaymıştır. Kimyasal madde kullanımının canlıya ve bulunduğu habitata verdiği zararlar göz önünde bulundurularak organik madde uygulamalarına geçilmiştir. Biyoaktif doğal ürünler, genellikle üretici organizmalar tarafından, yaşadıkları doğal çevrede kendilerini koruma ve üstünlük sağlama amacıyla üretilen sekonder metabolitlerdir. Sekonder metabolitlerin insan ve hayvan hastalıklarına karşı terapötik aktiviteye ve hastalıklara neden olan etkenlere karşı toksik aktiviteye bildirilmektedir (Özkaya vd. 2013). Günümüzde de *Artemia* larvalarının barındırdığı patojen bakteri biyotasının azaltımıyla ilgili bitki ve bakteriyolojik özütlerden oluşturulan karışımların testleri devam etmektedir (Mahdhi vd. 2013, Siddiqui vd. 2015, Latha vd. 2016).

Su ürünleri sektöründeki bu sorun temel alınarak oluşturulan 3 farklı deniz çayırı *Zostera* spp. yaprak ekstraktının MIC değerleri, standart uygulamalarda larval ortama bırakılan antibiyotik değerlerinden oldukça yüksektir (Bansemir vd. 2005). Bu durum

şaşırtıcı değildir. Çünkü genel anlamda sekonder metabolitleri barındıran ekstraktlar pek çok maddeden oluşan kompleks bir karışımdır. Bu sebeple içeriğinde bulunan aktif bileşenler düşük bir orana sahiptir.

In vivo deneylerde, ekstraktların uygulandığı larvalarda harekette azalma gözlemlenirken kontrol grubundaki larvaların 24 saat boyunca aktif hareket ettiği tespit edilmiştir. Sorgeloos vd. (2001) tarafından yapılan çalışmada, dışarıdan yapılan dezenfektan zenginleştirme gibi herhangi bir uygulama sonrasında larvalarda harekette azalmaya sebep olduğunu bildirilmiştir. Bu sonuç, larvaların su ürünlerinde canlı yem olarak kullanımını kısıtlar nitelikte gözükmesine de ileride yapılacak olan kalitatif ve kantitatif deneylerle durum analiz edilmelidir.

Larvalarla yapılan 4 tekrarlı mortalite deneylerinde, hekzan ile çözdürülmüş ekstrakt grubunda (3. grup) %100 mortalite tespit edilmiştir. Mortalite değeri % 30 olan etil asetat ile çözdürülen *Zostera* spp. ekstraktı (2. grup) *in vivo* deneylerde en iyi sonuç veren gruptur.

Ekstrakt uygulamaları sonrasında değişen baskın bakteri yapısını tespit etmek için kullanılmayan moleküler analizlerde, 2. gruba ait larvalardan bakteriyel 16S rRNA gen bölgesi tespit edilememiştir. Etil asetat ekstraktının bakteri üremesini engellemesindeki başarısı ve ortamın *Artemia* larva DNA izolatları bakımından zengin olması oransal olarak bakteriyel DNA varlığının düşmesine sebep olmaktadır. PCR sonuçları değerlendirilirken bu noktaların dikkate alınması gerektiği görülmüştür.

Geçen 10 yıllık süreçte moleküler teknikler temel alınarak yapılan *Artemia* larvalarının barındırdığı bakteriyel mikrobiyota çalışmalarında *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* filumlarına ait canlılar cins ve tür bazında tespit edilmiştir (Tkavc vd. 2011, Qurioz vd. 2015). Hoj vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada canlıların mikrobiyotasında baskın bakteri türlerinin filum bazında sırası ile *Proteobacteria*-*Firmicutes* ve cins olarak *Vibrio* olduğu belirtilmiştir. Yaptığımız moleküler çalışmalar sonunda kontrol grubunda tespit edilen baskın bakteri türü *Firmicutes* filumuna ait olan *Bacillus litoralis*'dir. Tür ilk defa, 2005 yılında Güney Kore'de bulunan Sarı Deniz'in

gelgit çizgisinde tespit edilmiştir (Yoon ve Oh 2005). Bakteri türü ile ilgili edilen ilk bilgiler halofilik ve hareketli olan bu canlının Gram boyamada değişkenlik gösterdiği ve aerobik ortamlarda yaşadığı şeklindedir. Krishnan vd. (2015) yaptıkları çalışmada, Hindistan'ın Mannar Körfezi'nde bulunan açık deniz (offshore) sisteminden alınan bir biyofilm tabakasında *B. littoralis* türünü tespit etmişlerdir. *Bacillus* cinsine ait bakteri türleri *Artemia* yetiştiricilik sistemlerinde probiyotik görevi görmektedir (Mahdhi vd. 2013). Niu vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada *Bacillus* sp. türlerinin ortamda bulunan *Vibrio* cinsine ait bakterilerin üremesini engellediğini tespit etmiştir. Bulgularımızın bu çalışmaların sonuçlarıyla uyuşmaktadır. Deney düzeneğinde *Bacillus* cinsine ait bakteri türünün baskın olması önceki çalışmalarda belirtilen baskın *Vibrio* yoğunluğunu azaltabilecek niteliktedir.

Metanol çözücüsü bulunan *Zostera* sp. ekstraktı uygulandığında baskın bakteri türü *Bacteroides* sp. olarak değişmiştir. Yapılan BLAST analizleri diziyi, Chauhan vd. (2006) yaptığı çalışmada Amerika'da bir tatlı su bataklığında tespit edilen bakteriye ait dizi ile hizalamıştır. Türün kültüre edilemeyen ve anaerobik ortamlarda yaşayabilen bir bakteri olduğu bildirilmiştir. Bulunan canlının kültüre edilememesi su ürünleri yetiştiricilik alanlarındaki fonksiyonunun tespitini olumsuz kılmaktadır. Bu sebeple canlının su ortamındaki patojen etkisinin varlığıyla ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Riddle vd. (2013) *Artemia* larvaları ve kistlerinin bakteriyel kolonisini moleküler teknikler kullanarak analiz etmiş ve *Bacteroides* cinsine ait kültüre edilemeyen bakteri türlerine rastlamışlardır. Sonuçlar, Riddle vd. (2013) tarafından yapılan çalışmayı destekler niteliktedir.

Sonuç olarak, 114Y141 no'lu proje kapsamında metanol ve etil asetat çözücüsüyle hazırlanan *Zostera* spp. ekstraktları antibiyogram testlerinde ve *in vivo* deneylerde başarılı olmuştur. Metanol içerikli ekstraktın baskın bakteri türünde yaptığı değişiklik moleküler teknikler kullanılarak tespit edilmiştir. Değişen baskın bakteri türünün kültüre edilemeyen bir tür olması moleküler çalışmaların önemini bir kez daha vurgulamaktadır. Metanol içerikli ekstraktın larvalar üzerinde mortalite değeri normal düzeyde iken baskın bakteri türünde yaptığı negatif yönlü değişim ekstraktın uygulanabilirlik ihtimalini düşürmektedir. *In vitro* ve *in vivo* deneylerde en iyi sonucu

etil asetat çözücüsü ile hazırlanan *Zostera* spp. ekstraktı vermiştir. Konu ile ilgili ileri çalışmaların bu grup üzerine odaklanması ve geniş bir çerçeveden bilgi sunabilecek gradient jel elektroforezi (DGGE), metagenomiks gibi ileri moleküler teknikler kullanılarak kesin sonuçlar alındıktan sonra ürünün bir standart uygulamaya dönüştürülebilirliği yorumlanmalıdır. *Artemia* larvalarından özellikle rutin laboratuvar yöntemleriyle kültüre edilemeyen bakterilerin tanımlanabilmesi bakımından Türkiye’de bir ilk niteliği taşıyan çalışmanın sonraki çalışmalara ışık tutacağı inancını taşımaktayız.



KAYNAKLAR

- Abatzopoulos, Th. J., Beardmore, J. A., Clegg, J. S. and Sorgeloos, P. 2002. *Artemia: Basic and Applied Biology*. Springer Science + Business Media, xi, Belgium.
- Allan, G. and Burnell, G. 2013. *Advances in aquaculture hatchery technology*. Elsevier, 680, London.
- Allender, M. C., Kastura, M., George, R., Bulman, F., Yarbrough, J. and Cox, S. 2011. Bioencapsulation of metronidazole in adult brine shrimp (*Artemia* sp.). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 42(2), 241-246.
- Anonymous. 2016a. Web Sitesi: <http://eol.org/>. Erişim Tarihi: 25 Temmuz 2016
- Anonymous. 2016b. Web Sitesi: <http://www.fao.org>. Erişim Tarihi: 25 Temmuz 2016
- Apprill, A., McNally, S., Parsons, R., and Webe, L. 2015. Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton, 75(4),129–137.
- Austin, B., Austin, D., Sutherland, R., Thompson, F., and Swings, J. 2005. Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia nauplii*. *Environmental microbiology*, 7(9), 1488-1495.
- Bansemir, A., Blume, M., Schröder, S. and Lindequist, U. 2006. Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture*, 252(1), 79-84.
- Benavente, G. P. and Gatesoupe, F. J. 1988. Bacteria associated with cultured rotifers and *Artemia* are detrimental to larval turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Aquacultural Engineering*, 7(4), 289-293.
- Blunt, J. W., Copp, B. R., Keyzers, R. A., Munro, M. H. and Prinsep, M. R. 2012. Marine natural products. *Natural product reports*, 29(2), 144.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. and Gontier, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science*, 161(5), 839-851.
- Bugni, T. S. and Ireland, C. M. 2004. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Natural Product Reports*, 21(1), 143-163.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J. and Knight, R. 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement 1), 4516-4522.
- Chauhan, A., Reddy, K. R. and Ogram, A. V. 2006. Syntrophic–archaeal associations in a nutrient-impacted freshwater marsh. *Journal of applied microbiology*, 100(1), 73-84.

- Choi, H. G., Lee, J. H., Park, H. H. and Sayegh, F. A. 2009. Antioxidant and antimicrobial activity of *Zostera marina* L. extract. *Algae*, 24(3), 179-184.
- Cirik, Ş., Cirik, S. and Conk-Dalay, M. 2011. Su Bitkileri II (İçsu Bitkilerinin Biyolojisi, Ekolojisi, Yetiştirme Teknikleri). *İzmir, Turkey: Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi Yayınları (in Turkish)*.
- Cuny, P., Serve, L., Jupin, H. and Boudouresque, C. F. 1995. Water soluble phenolic compounds of the marine phanerogam *Posidonia oceanica* in a Mediterranean area colonised by the introduced chlorophyte *Caulerpa taxifolia*. *Aquatic Botany*, 52(3), 237-242.
- D'agostino, A. 1980. The vital requirements of *Artemia*: physiology and nutrition. *The Brine Shrimp. Vol. 2. Physiology, Biochemistry, Molecular Biology*, 474.
- Freeman, S. ve Herron, J. C. 1999. Evrimsel Analiz. Çıplak, B., Başıbüyük, H. H., Kakaraytuğ, S., Gündüz, İ. (eds), 708s, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Gatesoupe, F.J. 2002. Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia nauplii* as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*. *Aquaculture*, 212(1), 347-360.
- Gilmour, A., McCallum, M. F. and Allan, M. C. 1975. Antibiotic sensitivity of bacteria isolated from the canned eggs of the Californian brine shrimp (*Artemia salina*). *Aquaculture*, 6(3), 221-231.
- Gomez-Gil, R. S., B., Abreu-Grobois, F. A., Romero-Jarero, J. and Herrera-Vega, M. 1994. Chemical disinfection of *Artemia nauplii*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 25(4), 579-583.
- Hameed, A. S. and Balasubramanian, G. 2000. Antibiotic resistance in bacteria isolated from *Artemia nauplii* and efficacy of formaldehyde to control bacterial load. *Aquaculture*, 183(3), 195-205.
- Harrison, P.G. and Chan, A.T. 1980. Inhibition of the growth of micro-algae and bacteria by extracts of eelgrass (*Zostera marina*) leaves. *Mar. Biol.* 61: 21-26.
- Harrison P.G. 1982. Control of microbial growth and of amphipod grazing by water soluble compounds from leaves of *Zostera marina*. *Mar. Biol.* 67: 225-230.
- Hellio, C., De La Broise, D., Dufosse, L., Le Gal, Y. and Bourgougnon, N. 2001. Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae: potential use for environmentally friendly antifouling paints. *Marine environmental research*, 52(3), 231-247.
- Høj, L., Bourne, D. G. and Hall, M. R. 2009. Localization, abundance and community structure of bacteria associated with *Artemia*: Effects of nauplii enrichment and antimicrobial treatment. *Aquaculture*, 293(3), 278-285.

- Irianto, A. and Austin, B. 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of fish diseases*, 25(6), 333-342.
- Jackson, S. A. and Clegg, J. S. 1996. Ontogeny of low molecular weight stress protein p26 during early development of the brine shrimp, *Artemia franciscana*. *Development, growth and differentiation*, 38(2), 153-160.
- Kanjana, K., Radtanatip, T., Asuvapongpatana, S., Withyachumnarnkul, B. and Wongprasert, K. 2011. Solvent extracts of the red seaweed *Gracilaria fisheri* prevent *Vibrio harveyi* infections in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish and shellfish immunology*, 30(1), 389-396.
- Keskin, E. 2007. Türkiye ihtiyofaunasındaki Mullidae ailesindeki türlerin filogenetik yakınlıklarının morfolojik ve genetik farklarla korelasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, 93, Ankara
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16(2), 111-120.
- Klug, W. S., Cummings, M. R. and Spencer, C. A. 2011. Genetik Kavramlar. Palme Yayıncılık, 784, Türkiye.
- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K. and Schloss, P. D. 2013. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and environmental microbiology*, 79(17), 5112-5120.
- Krishnan, M., Sivanandham, V., Hans-Uwe, D., Murugaiah, S. G., Seeni, P., Gopalan, S. and Rathinam, A. J. 2015. Antifouling assessments on biogenic nanoparticles: A field study from polluted offshore platform. *Marine Pollution Bulletin*, 101(2), 816-825.
- Lam, C. and Harder, T. 2007. Marine macroalgae affect abundance and community richness of bacterioplankton in close proximity1. *Journal of phycology*, 43(5), 874-881.
- Latha, M., Priyanka, M., Rajasekar, P., Manikandan, R. and Prabhu, N. M. 2016. Biocompatibility and antibacterial activity of the *Adathoda vasica* Linn extract mediated silver nanoparticles. *Microbial pathogenesis*, 93, 88-94.
- Lavens, P. and Sorgeloos, P. 1996. Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture. FAO, 101, Rome.
- Liang, P. and MacRae, T. H. 1999. The Synthesis of a Small Heat Shock/ α -Crystallin Protein in *Artemia* and Its Relationship to Stress Tolerance during Development. *Developmental biology*, 207(2), 445-456.
- Lim, J. M., Jeon, C. O., Lee, S. M., Lee, J. C., Xu, L. H., Jiang, C. L. and Kim, C. J. 2006. *Bacillus salarius* sp. nov., a halophilic, spore-forming bacterium isolated

from a salt lake in China. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(2), 373-377.

- Lopez-Torres, M. A. and Lizárraga-Partida, M. L. 2001. Bacteria isolated on TCBS media associated with hatched *Artemia* cysts of commercial brands. *Aquaculture*, 194(1), 11-20.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., Fernández, E. G., Fernández, C. R. and Pérez, M. S. 2004. Brock Biología de los microorganismos.
- Mahdhi, A., Bahi, A., Mzah, D. and Bakhrouf, A. 2013. Use of mixture design to construct a consortium of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruit extract and potentially probiotic *Bacillus* strain to confer protection against vibriosis in *Artemia* culture. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(15), 3850-3855.
- Maleš, Ž. and Plazibat, M. 2000. Investigation of chemical composition of *Zostera noltii* Hornem. *Farmaceutski Glasnik*, 56(4), 109-118.
- Martin, J. W., and Davis, G. E. 2001. An updated classification of the recent Crustacea, Elsevier, 132, Los Angeles.
- Matsukawa, R., Dubinsky, Z., Kishimoto, E., Masaki, K., Masuda, Y., Takeuchi, T. and Karube, I. 1997. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 9(1), 29-35.
- Maximilien, R., de Nys, R., Holmström, C., Gram, L., Givskov, M., Crass, K. and Steinberg, P. D. 1998. Chemical mediation of bacterial surface colonisation by secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra*. *Aquatic Microbial Ecology*, 15(3), 233-246.
- Niu, Y., Defoirdt, T., Baruah, K., Van de Wiele, T., Dong, S. and Bossier, P. 2014. *Bacillus* sp. LT3 improves the survival of gnotobiotic brine shrimp (*Artemia franciscana*) larvae challenged with *Vibrio campbellii* by enhancing the innate immune response and by decreasing the activity of shrimp-associated vibrios. *Veterinary microbiology*, 173(3), 279-288.
- Özkaya, F.C., Erdoğan, C. and Altunok, M. 2013. Denizel Biyoaktif Bileşikler. *Ege J Fish Aqua Sci.*, 30(2), 85-92.
- Quiroz, M., Triadó-Margarit, X., Casamayor, E. O. and Gajardo, G. 2015. Comparison of *Artemia*-bacteria associations in brines, laboratory cultures and the gut environment: a study based on Chilean hypersaline environments. *Extremophiles*, 19(1), 135-147.
- Parada, A. E., Needham, D. M. and Fuhrman, J. A. 2015. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental microbiology*.

- Ravn, H., Jahanshahi, F., Forbes, V., Andary, C. and Christophersen, C. 1992. Phenolic compounds in the marine plant *Zostera marina* L.[eelgrass; rosmarinic acid, caffeic acid, luteolin-7-glucoside, copper chloride]. *Bulletin de Liaison Groupe Polyphenols (France)*.
- Riddle, M. R., Baxter, B. K. and Avery, B. J. 2013. Molecular identification of microorganisms associated with the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Aquatic biosystems*, 9(1), 1.
- Roiha, I. S., Otterlei, E., Litlabø, A. and Samuelsen, O. B. 2010. Uptake and elimination of florfenicol in Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae delivered orally through bioencapsulation in the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Aquaculture*,310(1), 27-31.
- Saitou, N. and Imanishi, T. 1989. Relative efficiencies of the Fitch-Margoliash, maximum-parsimony, maximum-likelihood, minimum-evolution, and neighbor-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree.*Mol. Biol. Evol*, 6(5), 514-525.
- Siddiqui, R., Alam, M. M., Amin, M. R., Daula, A. S. U. and Hossain, M. M. 2015. Screening of antimicrobial potential and brine shrimp lethality bioassay of the whole plant extract of *Spilanthes paniculata* Wall. ex DC.*Stamford Journal of Microbiology*, 3(1), 1-5.
- Smith, G. G. and Ritar, A. J. 2006. The influence of animal density and water turbulence on growth and survival of cultured spiny lobster (*Jasus edwardsii*) larvae. *Aquaculture*, 258(1), 404-411.
- Sorgeloos, P., Dhert, P. and Candreva, P. 2001. Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture*, 200(1), 147-159.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30(12):2725–2729.
- Thompson, J. D., Higgins D. G., Gibson, T. J. and CLUSTAL, W. 1994. improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680.
- Tkavc, L., Oren, A. and Gunde-Cimerman, N. 2011. Bacteria associated with *Artemia* spp. along the salinity gradient of the solar salterns at Eilat (Israel).*FEMS microbiology ecology*, 77(2), 310-321.
- Toi, H. T., Boeckx, P., Sorgeloos, P., Bossier, P. and Van Stappen, G. 2013. Bacteria contribute to *Artemia* nutrition in algae-limited conditions: A laboratory study. *Aquaculture*, 388, 1-7.
- Tolomei, A., Burke, C., Crear, B. and Carson, J. 2004. Bacterial decontamination of on-grown *Artemia*. *Aquaculture*, 232(1), 357-371.

- Tyson, G.E. 1970. The occurrence of a spirochete-like organism in tissues of the brine shrimp *Artemia salina*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 15(1), 145-147.
- Ünal, E.M. 2014. Ege Denizi'ndeki *Caulerpa racemosa* (Forsskal) J. Agardh populasyonlarının filogenetik ilişkilerinin DNA barkodlama tekniği ile belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 93, Ankara.
- Vergeer, L. H. and Develi, A. 1997. Phenolic acids in healthy and infected leaves of *Zostera marina* and their growth-limiting properties towards *Labyrinthula zosterae*. *Aquatic Botany*, 58(1), 65-72.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(4), 655-671.
- Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51:221–271.
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K. H. and Rosselló-Móra, R. 2014. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 12(9), 635-645.
- Yoon, J. H. and Oh, T. K. 2005. *Bacillus litoralis* sp. nov., isolated from a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(5), 1945-1948.
- Zaporozhets, T. S., Besednova, N. N., Lyamkin, G. P., Loenko, Y. N. and Popov, A. A. 1991. Antibacterial and therapeutic efficacy of pectin from *Zostera*, a sea grass. *Antibiotiki I Khimioterapiya*, 36(4), 24-26.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sevgi KAYNAR

Doğum Yeri : Niksar

Doğum Tarihi : 23.01.1990

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Cumhuriyet Lisesi (2008)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2012)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı
(Eylül 2013-Temmuz 2016)

A. Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler:

A1. Kaynar S, Keskin E. 2015. In Vitro Ortamdan Çevresel DNA Analizi ile Bakteri Teşhisi. Su Ürünlerinde Genomik Çalıştayı. 11-13 Kasım, Antalya (Poster).

A2. Kaynar S, Yağız S, Bekcan S, Keskin E, Yavuzcan Y. 2015. Akuaponik Sistemdeki Baskın Bakteri türlerinin eDNA Tekniği ile Tespiti. XII. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi. 14-17 Eylül, Muğla (Poster).

A3. Kaynar S, Yavuzcan H, Keskin E. 2015. Çevresel DNA ile Alabalık, Sazan ve Mersin Balıkları Yetiştiricilik Havuzlarında Baskın Bakteri Türlerinin Tespiti. 18. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu. 1-4 Eylül, İzmir (Poster).

A4. Kaynar S, Yavuzcan H. 2015. Rekreasyon Alanlarında Kıyıya Vuran Deniz Bitkilerinin Antimikrobiyal Madde Olarak Kullanımı. 6. Ulusal Çevre ve Ekoloji Öğrenci Kongresi. 25-26 Nisan, Ankara (Poster).

B. Projeler

B1. Deniz Çayırı (*Zostera spp.*) Ölü Yaprak Ekstraktının Patojen Bakterilere Karşı Antimikrobiyal Aktivitesinin ve *Artemia nauplii*'lerinin Bakteriyel Yükünü Azaltmada Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi

Görevi: Araştırmacı Bursiyer

Destekleyen: TUBITAK 114Y141 (2014-2017)

C. Aldığı Eğitimler ve Kurslar

C1.Su Ürünlerinde Genomik Çalıştayı. Filogenetik Analiz Kursu (2015)

C2.Ankara Üniversitesi: Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası (2014)

C3.Türk Japon Vakfı: Japonca Kursu (2014)

C4.Türkiye Sualtı Sporları Federasyonu CMAS 1 Yıldız Dalgıç (2014)

C5.Scuba Schools International (SSI): Open Water Diver (2014)

C6.TÜBİTAK: su yönetimi yaz okulu (2013)

D. Ödüller/Burslar

D1. 18. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu: En İyi Poster Ödülü (2015)

D2. 6. Ulusal Çevre ve Ekoloji Öğrenci Kongresi: Poster Sunumu 3. lük Ödülü (2015)

D3. TÜBİTAK Bursiyeri: 114Y141 numaralı ÇAYDAG projesi kapsamında lisansüstü bursiyer (2014-2017)

D4. TEV: Yurt İçi Yüksek Lisans Bursu (2013-2015)