



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



## YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇEVRESEL SU ÖRNEKLERİNDE POTANSİYEL GEOSMİN  
ve 2-MİB ÜRETEN SİYANOBAKTERİ TÜRLERİNİN PZR  
YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

Zuhal TUNÇ ZENGİN

Su Ürünleri Temel Bilimleri Anabilim Dalı

İçsular Biyolojisi Programı

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Reyhan AKÇAALAN ALBAY

Haziran, 2017

İSTANBUL

Bu çalışma 23.06.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Su Ürünleri Temel Bilimleri Anabilim Dalı, İçsular Biyolojisi Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

**Tez Jürisi**



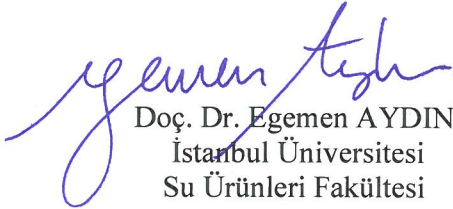
Prof. Dr. Reyhan AKÇAALAN ALBAY (Danışman)  
İstanbul Üniversitesi  
Su Ürünleri Fakültesi



Prof. Dr. Selim ÇETİNER  
Sabancı Üniversitesi  
Mühendislik ve Doğa Bilimleri  
Fakültesi



Doç. Dr. Serap KOŞAL ŞAHİN  
İstanbul Üniversitesi  
Su Ürünleri Fakültesi



Doç. Dr. Egemen AYDIN  
İstanbul Üniversitesi  
Su Ürünleri Fakültesi



Doç. Dr. Ali ERTÜRK  
İstanbul Üniversitesi  
Su Ürünleri Fakültesi



20.04.2016 tarihli resmi gazetede yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi'nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2016-20569 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bu tez, 1649B021502362 numaralı TÜBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı projesi ile desteklenmiştir.

## ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca desteğini esirgemeyen güzel eşim Furkan Zengin'e, hayallerimin peşinden gitmeme her zaman destek olan, biricik abim Zafer Tunç'a, annem Emine Tunç, babam Selahattin Tunç'a ve ailemde bana destek olan diğer herkese teşekkür ediyorum. Bu tez çalışması ve hayatımdaki önemli diğer tüm çalışmalar onlar olmadan asla olmazdı.

Bu çalışmada bana destek veren tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma çok teşekkür ediyorum. Tez çalışmamla ilgili burs desteği başvuru sürecindeki yardımları için değerli arkadaşım Gökhan Uyan'a, çalışmalarım boyunca verdiği motivasyon desteği için Yük. Biyolog Begüm Uzun'a çok teşekkür ediyorum.

PCR çalışmalarındaki yardımları ve/veya katkıları için Moleküler Biyolog Fatma Akın'a, Uzm. Dr. Latife Köker'e ve Yrd. Doç. Dr. Kaan Yılancıoğlu'na, mikroskop görüntüleri için Yük. Müh. Ayça Oğuz'a, siyanobakteri kültürlerinin devamlılığını sağlamadaki yardımları için Lab. Tek. Cansu D. Atar'a, çevresel örneklerin sağlanmasıdaki yardımları ve/veya tezime değerli görüşleriyle sundukları katkılar için değerli Hocalarım Yrd. Doç. Dr. Özcan Gaygusuz, Yrd. Doç. Dr. Zeynep Dorak, Arş. Gör. Dr. Cenk Gürevin, Prof. Dr. Fatma Çevik ile değerli dostlarım Moleküler Biyolog Simha Gila Benyakar, Moleküler Biyolog Ali Turan ve Moleküler Biyolog Hazel Topçu'ya, gönderdikleri pozitif kontrol örneği ile tezime önemli ölçüde katkı sağlayan Helsinki Üniversitesi'nden Prof. Dr. Kaarina Sivonen ve Suvi Suurnäkki'ye, GC-MS çalışmalarımıyla ilgili desteği için Prof. Dr. Meriç Albay'a çok teşekkürler.

Tez çalışmamdaki destekleri için İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği ve TÜBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı'na teşekkürler.

Son olarak; yaptığı işe ve birlikte çalıştığı tüm insanlara olan sevgi ve saygısıyla, bana her zaman çok iyi bir örnek ve aynı zamanda çok iyi bir arkadaş olan danışmanım Sayın Prof. Dr. Reyhan Akçaalan Albay'a sonsuz teşekkürler.

Haziran 2017

Zuhal TUNÇ ZENGİN

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER .....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ .....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ .....	xi
ÖZET.....	xiii
SUMMARY .....	xv
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL KISIMLAR .....</b>	<b>3</b>
2.1. SULARDA TAT VE KOKU PROBLEMİ.....	3
2.2. SİYANOBAKTERİLER .....	4
2.2.1. Sınıflandırma ve Taksonomik Konum.....	4
2.2.2. Hücre Özellikleri.....	5
2.2.3. Yaşam Alanları .....	10
2.2.4. Siyanobakterilerin Geosmin ve MİB Problemindeki Önemi.....	10
2.3. SEKONDER METABOLİTLER .....	13
2.3.1. Sularda Geosmin ve MİB Problemi .....	14
2.3.2. Geosmin ve MİB'in Sağlıkla İlişkisi .....	19
2.3.3. Geosmin ve MİB'in Ekonomiye Olumsuz Etkisi .....	20
2.3.4. Geosmin ve MİB'in Yapısal Özellikleri .....	21
2.3.5. Geosmin ve MİB Biyosentezi .....	24
2.3.6. Geosmin ve MİB Biyosentezini Etkileyen Çeşitli Parametreler.....	31
2.3.7. Sularda Geosmin ve MİB Kaynağının Belirlenmesi.....	33
<b>3. MALZEME VE YÖNTEM .....</b>	<b>37</b>
3.1. SİYANOBAKTERİ KÜLTÜRLERİNİN ELDESİ .....	37
3.1.1. Kültür Ortamlarının Hazırlanması .....	39
3.1.2. Kültür Koşulları ve Örneklerin Saklanması .....	41
3.2. ÇEVRESEL ÖRNEKLERİN ELDESİ.....	41

3.3. MOLEKÜLER ANALİZLER .....	42
3.3.1. Nükleik Asit İzolasyonu.....	42
3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	44
3.3.2.1. 16S rDNA PZR İçin Gereken Ortam Koşulları .....	44
3.3.2.2. Geosmin PZR İçin Gereken Ortam Koşulları .....	46
3.3.2.3. MİB PZR İçin Gereken Ortam Koşulları.....	47
3.3.3. Dizi Analizi .....	49
3.3.4. Metabolitlerin Miktar Analizi .....	49
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>50</b>
4.1. NÜKLEİK ASİT İZOLASYONU SONUÇLARI .....	50
4.2. PZR SONUÇLARI .....	51
4.3. DİZİLEME ANALİZİ SONUÇLARI.....	59
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>62</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>70</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>80</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa No

Şekil 2.1: Siyanobakterilerde hücresel yapının şematik gösterimi.....	6
Şekil 2.2: Siyanobakteri hücresinin dış yüzeyinin bir modeli. ....	7
Şekil 2.3: Siyanobakterilerde farklı morfolojik yapılardaki hücre tipleri.....	8
Şekil 2.4: Ülkemizdeki siyanobakteri aşırı artış örnekleri. ....	11
Şekil 2.5: Geosmin ve MİB sekonder metabolitlerinin kimyasal yapıları.....	15
Şekil 2.6: Ömerli Orhaniye İçmesuyu Arıtma Tesisi ortalama Geosmin konsantrasyonu.....	18
Şekil 2.7: Ömerli İçmesuyu Arıtma Tesisi ortalama MİB konsantrasyonu. ....	18
Şekil 2.8: İzopren Biriminin Kimyasal Yapısı. ....	21
Şekil 2.9: Geosmin'in enantiyomerleri.....	24
Şekil 2.10: MİB'in enantiyomerleri. ....	24
Şekil 2.11: Geosmin sentezinden sorumlu gen kümesinin şematik görünümü. ....	25
Şekil 2.12: Siyanobakterilerde Geosmin sentaz enziminin şematik görünümü . ....	26
Şekil 2.13: Geosmin sentezinin önemli aşamalarının şematik görünümü. ....	27
Şekil 2.14: MİB sentezinden sorumlu gen kümesinin şematik gösterimi . ....	28
Şekil 2.15: MİB Sentezinin önemli aşamalarının şematik görünümü. ....	29
Şekil 3.1: Çalışmada kullanılan siyanobakteri kültürlerinin genel görünümü. ....	37
Şekil 4.1: Nükleik asit izolasyonu sonrası saflık ve miktar kontrolü. ....	50
Şekil 4.2: Toplam DNA örneği sayısına göre ürün elde edilen PZR'lerin yüzdelik dağılımları. ....	51
Şekil 4.3: 16S rDNA PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. ....	52
Şekil 4.4: Geosmin PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	52
Şekil 4.5: MİB PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü 1.....	54

<b>Şekil 4.6:</b> MİB PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü 2.....	54
<b>Şekil 4.7:</b> <i>Pseudanabaena limnetica</i> 'nın mikroskop görüntüsü.....	59
<b>Şekil 4.8:</b> <i>Nostoc punctiforme</i> 'nin mikroskop görüntüsü.....	60
<b>Şekil 4.9:</b> <i>Phormidium</i> sp. 'nin mikroskop görüntüsü.....	60
<b>Şekil 5.1:</b> Türkiye'de tespit edilen potansiyel Geosmin ve MİB üreticisi siyanobakteriler ve buldukları alanlar.....	64



## TABLO LİSTESİ

### Sayfa No

<b>Tablo 2.1:</b> Siyanobakterilerin taksonomik konumu. ....	5
<b>Tablo 2.2:</b> Ükelere göre sularda Geosmin ve MİB çalışmaları.....	16
<b>Tablo 2.3:</b> Dünyada tespit edilen bazı Geosmin ve MİB konsantrasyonlarım. ....	20
<b>Tablo 2.4:</b> Geosmin ve MİB oluşumunu sağlayan enzimlerin özellikleri.....	30
<b>Tablo 2.5:</b> Geosmin veya MİB ürettiği bilinen canlı grupları.....	34
<b>Tablo 3.1:</b> Çalışmada kullanılan siyanobakteri suşları. ....	38
<b>Tablo 3.2:</b> BG-11 tipi besiyeri bileşenleri ve miktarları. ....	39
<b>Tablo 3.3:</b> Z8 tipi besiyeri bileşenleri ve miktarları.....	40
<b>Tablo 3.4:</b> Çalışmada kullanılan çevresel örnekler. ....	41
<b>Tablo 3.5:</b> Hücre parçalama işlemi için kullanılan solüsyon bileşenleri ve miktarları.....	43
<b>Tablo 3.6:</b> 16S rDNA PZR için kullanılan primerler, baz içerikleri ve hedef gen.....	44
<b>Tablo 3.7:</b> TAE solüsyonu (50X) bileşenleri. ....	45
<b>Tablo 3.8:</b> Yükleme tamponu (Loading Dye) (6X) bileşenleri. ....	45
<b>Tablo 3.9:</b> Geosmin PZR için kullanılan primerler, baz içerikleri ve hedef gen. ....	47
<b>Tablo 3.10:</b> MİB PZR için kullanılan primerler, baz içerikleri ve hedef gen. ....	48
<b>Tablo 4.1:</b> Çalışma sonucunda potansiyel Geosmin üreticisi olduğu tespit edilen siyanobakteri kültürleri. ....	53
<b>Tablo 4.2:</b> Çalışma sonucunda Geosmin gen varlığı tespit edilen çevre örnekleri. ....	53
<b>Tablo 4.3:</b> Çalışma sonucunda tespit edilen potansiyel MİB üreticisi bulunan çevre örnekleri. ....	55
<b>Tablo 4.4:</b> Çalışma sonucunda tespit edilen potansiyel MİB üreticisi bulunan kültür örnekleri. ....	55

<b>Tablo 4.5:</b> 16S rDNA, Geosmin, MİB Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve GC-MS sonuçları.....	56
<b>Tablo 4.6:</b> Dizileme Sonucu.....	61
<b>Tablo 5.1:</b> <i>Geosmin</i> veya <i>MİB sentaz</i> genlerine sahip siyanobakteri türlerinin örneklendiği/izole edildiği alanlar. ....	63



## SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

### Simgeler Açıklama

$\beta$	: Beta
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
<b>g</b>	: Gram
<b>kb</b>	: Kilobaz
<b>l</b>	: Litre
$\mu\text{g}$	: Mikrogram
$\mu\text{l}$	: Mikrolitre
$\mu\text{M}$	: Mikromolar
<b>M</b>	: Molar
<b>mg</b>	: Miligram
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>ng</b>	: Nanogram
<b>U</b>	: Ünite

### Kısaltmalar Açıklama

<b>bç</b>	: Baz çifti
<b>cDNA</b>	: Tamamlayıcı DNA (complementary DNA)
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>dNTP</b>	: Deoksinükleosid trifosfat
<b>EDTA</b>	: Etilendiamintetraasetat
<b>Geosmin</b>	: (4S,4aS,8aR)-4,8a-dimethyl-1,2,3,4,5,6,7,8-octahydronaphthalen-4a-ol
<b>GC-MS</b>	: Gaz Kromatografisi - Kütle Spektrometrisi
<b>HS-SPME</b>	: Üst Katman (head space) - Katı Faz Mikro Ekstraksiyonu (solid phase micro extraction)
<b>MİB</b>	: 3,4,7,7-tetramethylbicyclo[2.2.1]heptan-3-ol veya 2-metilizoborneol
<b>mRNA</b>	: Mesajcı RNA (messenger RNA)

## **SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ (Devamı)**

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
<b>IUPAC</b>	: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
<b>PZR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu, PCR
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>rRNA</b>	: Ribozomal RNA
<b>rDNA</b>	: Ribozomal RNA'nın gen bilgisini taşıyan DNA bölgesi
<b>TAE</b>	: Tris-asetat-EDTA
<b>TE</b>	: Tris-EDTA
<b>UV</b>	: Ultraviyole

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### ÇEVRESEL SU ÖRNEKLERİNDE POTANSİYEL GEOSMİN ve 2-MİB ÜRETEN SİYANOBAKTERİ TÜRLERİNİN PZR YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

Zuhal TUNÇ ZENGİN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Su Ürünleri Temel Bilimleri Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Reyhan AKÇAALAN ALBAY

Sudaki Geosmin ve MİB kaynaklı tat ve koku sorunlarının çözümündeki en önemli stratejilerden biri, Geosmin ve MİB metabolitlerinin doğal kaynağı olan siyanobakteri türlerinin tespitidir. Etkin bir su kalitesi yönetimi stratejisi izlemek amacıyla Geosmin ve MİB metabolitlerinin hangi siyanobakteri türleri tarafından sentezlediğinin ortaya konması önem arz etmektedir. Geosmin ve MİB metabolitlerinin biyosentezi için gerekli olan gen bölgeleri (*Geosmin Sentaz* ve *MİB Sentaz*) bilinmektedir ve sularda bu moleküllerin üreticisi olan siyanobakterilerin tespitinde bu gen bilgilerinden yararlanılmaktadır. Dünyada bu konuda yapılmış çok az çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada, İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi İçsular Biyolojisi Anabilim Dalı Alg Kültür Koleksiyonunda yer alan siyanobakteri suşları ve çevresel su örneklerinde *Geosmin Sentaz* ve *MİB Sentaz* genlerine özgü primerler seçilerek Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi ile bu iki metaboliti sentezleme potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada 3 farklı siyanobakteri takımına (Nostocales, Oscillatoriales ve Synechococcales) ait, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cuspidothrix*, *Nostoc*, *Nodularia*, *Lyngbya*, *Pseudanabaena*, *Planktolyngbya* ve *Planktothrix* cinslerinin bulunduğu kültür ve çevre örneklerinde, moleküler yöntemler kullanılarak Geosmin ve/veya MİB üretim potansiyeli tespit edilmiştir. Ayrıca, Ömerli Baraj Gölü ve Malatya Günpınar Şelalesi'nden alınan su örneklerinde potansiyel MİB ve Geosmin üreticisi siyanobakterinin tespiti için PZR ürünlerinin dizileme analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar mevcut diğer üretici siyanobakterilerin dizi bilgileriyle karşılaştırıldığında,

Ömerli Baraj Gölü'ndeki potansiyel MİB üreticisi siyanobakterinin *Pseudanabaena limnetica* olduğu ve Malatya Günpınar Şelalesi'ndeki potansiyel Geosmin üreticisi siyanobakterinin *Nostoc* sp. olabileceği görülmüştür. Türkiye su kaynaklarında tat ve koku problemlerinin başlıca kaynağı olabilecek bu türlerin moleküler biyoloji ve genetik yöntemleriyle belirlenmesi bakımından bu çalışma ülkemiz için bir ilktir ve su kalitesi yönetimi çalışmaları için önem arz etmektedir.

Haziran 2017, 94 sayfa.

**Anahtar kelimeler:** Geosmin, MİB, PZR, tat ve koku problemleri



## **SUMMARY**

### **M.Sc. THESIS**

#### **DETERMINATION OF POTENTIAL GEOSMIN and 2-MIB PRODUCING CYANOBACTERIA SPECIES IN ENVIROMENTAL WATER SAMPLES BY PCR METHOD**

**Zuhal TUNÇ ZENGİN**

**İstanbul University**

**Institute of Graduate Studies in Science and Engineering**

**Department of Basic Sciences in Fisheries**

**Supervisor : Prof. Dr. Reyhan AKÇAALAN ALBAY**

One of the most important strategies to solve the taste and odor problems caused by Geosmin and MIB in the water is the detection of cyanobacteria species which is the natural source of Geosmin and MIB metabolites. In order to follow an effective water quality management strategy it is important to show which cyanobacteria species synthesize the Geosmin and MIB metabolites. The nucleotide regions (*Geosmin Synthase* and *MIB Synthase*) necessary for the biosynthesis of these metabolites are known and these information are used to detect cyanobacteria species responsible for the production of these molecules in water. There are very few studies in the world on this subject. In this study, it was aimed to determine the potential producers of these two metabolites by Polymerase Chain Reaction method using specific primers for *Geosmin synthase* and *MIB synthase* genes in cultured cyanobacteria species from Algae Culture Collection of Department of Freshwater Biology in Fisheries Faculty and environmental water samples. Potential Geosmin and / or MIB production was determined from culture and environmental samples which include *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cuspidothrix*, *Nostoc*, *Nodularia*, *Lyngbya*, *Pseudanabaena*, *Planktolyngbya* and *Planktothrix* genus from three different cyanobacterial orders (Nostocales, Oscillatoriales ve Synechococcales) by PCR method. Moreover, sequence analysis was carried out in water samples collected from Ömerli Dam Lake and Malatya Günpınar Waterfall to detect the species responsible of MIB and Geosmin production. According to blast analysis of sequence results, the

potential MIB producer in Ömerli Dam Lake was *Pseudanabaena limnetica* and potential Geosmin producer in Malatya Günpınar Waterfall was *Nostoc* sp. This is the first study in Turkey in order to determine the responsible cyanobacteria species as a source of taste and odor problems in water resources using molecular biology and genetic methods and the results are important for water quality management studies in our country.

June 2017, 94 pages.

**Keywords:** Geosmin, MIB, PCR, taste and odour problems



## 1. GİRİŞ

Sulardaki tat ve koku sorunu, yaşamımızın vazgeçilmez bir unsuru olan suyun kullanımını önemli ölçüde olumsuz etkileyen küresel bir sorun haline gelmiştir. Tat ve koku bakımından rahatsız edici hale gelen rekreasyonel veya içme suyu kaynağı olarak kullanılan sular, bilimsel veriler herhangi bir sağlık riski ortaya koymasa bile, kullanıcılar tarafından "sağlıksız" olarak algılanabilmektedir. Bu durum, kamuoyunda suların kullanımıyla ilgili güveni azaltarak kamuoyu ile su yönetim birimleri arasındaki ilişkileri olumsuz etkilemektedir (Mackey ve diğ., 2013; Deveci, 2017).

Önemli su kalitesi parametrelerinden Geosmin (IUPAC adı: (4S,4aS,8aR)-4,8a-dimethyl-1,2,3,4,5,6,7,8-octahydronaphthalen-4a-ol) ve MİB (IUPAC adı: 3,4,7,7-tetramethylbicyclo[2.2.1]heptan-3-ol veya 2-metilizoborneol); siyanobakteriler, aktinomisetler ve funguslar gibi çeşitli canlı grupları tarafından sentezlenen uçucu özellikte iki sekonder metabolittir ve özellikle yaz aylarında aşırı artış gösterebilen siyanobakteriler, bu metabolitlerin sudaki birincil üreticileridir (Jüttner ve Watson, 2007). Geosmin ve MİB, çok düşük konsantrasyonlarda bile (4-10 ng/l) suyun tat ve kokusunu bozmaktadır ve böylece suyun kullanımını olumsuz etkilemektedir (Watson ve diğ., 2016).

Ülkemizde sularda tat ve koku sorunları olduğu bilinmektedir. Ancak, sadece İstanbul Su ve Kanalizasyon İdaresi (İSKİ) Su Kalitesi Raporlarında Geosmin ve MİB sonuçlarını yayınlamaktadır. Bu raporlara göre, Ömerli Baraj Gölü'nde arıtma sonrası Geosmin konsantrasyonu yaklaşık 25 ng/l ve MİB konsantrasyonu 30 ng/l'ye ulaşabilmektedir (İSKİ, 2010-2016). Ancak, bu tat ve koku problemini üreten organizmalar bilinmemektedir.

Sudaki Geosmin ve MİB kaynaklı tat ve koku sorunlarının çözümündeki en önemli stratejilerden biri, Geosmin ve MİB metabolitlerinin doğal kaynağı olan siyanobakteri türlerinin tespitidir. Bu iki parametre ülkemizde özellikle içme suyu kaynağı olan yüzey sularında analitik yöntemler kullanılarak ölçülmektedir. Ancak, Geosmin ve MİB'in

üreticisi olan canlı türlerinin belirlenmesine yönelik genetik temelli bir çalışma ülkemizde henüz yapılmamıştır.

Geosmin ve MİB metabolitlerinin biyosentezi için gerekli olan enzimleri kodlayan gen bölgeleri bilinmektedir ve sulara bu moleküllerin üreticisi olan siyanobakterilerin tespitinde mevcut nükleotit bilgilerinden yararlanılmaktadır.

Bu çalışmada, *Geosmin Sentaz* ve *MİB Sentaz* genlerine özgün primerler kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi ile İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Temel Bilimler Bölümü İçsular Biyolojisi Anabilim Dalı alg kültür koleksiyonundaki siyanobakteri türleri ve çevresel su örnekleri analiz edilmiş ve bu iki metaboliti sentezleme potansiyelleri incelenmiştir.

## 2. GENEL KISIMLAR

### 2.1. SULARDA TAT VE KOKU PROBLEMİ

Tat ve koku alma duyuları tüm canlılar için biyolojik ve ekolojik yönden oldukça önemlidir. Tat alma duyusu sıvı halindeki moleküllerle harekete geçerken koku alma duyusu gaz halindeki moleküller aracılığıyla uyarılabilmektedir. Bu yönüyle koku yayan uçucu bileşiklere sahip sulardan özellikle içme suları, hem tat hem de koku alma duyularını aynı anda uyarabilmektedir. Uçucu organik bileşikler, insanlarda tat ve koku duyusuyla birlikte harekete geçirdikleri duygusal ve dürtüsel merkezler nedeniyle insan vücudunda tek seferde, çok sayıda biyokimyasal reaksiyonu tetikleyebilmektedir (Bozkurt, 2006). Bu nedenle, sularda tat ve koku parametreleri, suyun kullanımını doğrudan etkilemektedir.

Suda istenmeyen kokulara neden olan Geosmin, MİB, 2-metoksi-3-izopropilpirazin ( $C_8H_{12}N_2O$ ), di- ( $C_7H_6Cl_2O$ ), tri- ( $C_7H_5Cl_3O$ ), tetra- ( $C_7H_4Cl_4O$ ) ve pentakloroanizoller ( $C_7H_3Cl_5O$ ), okta-1,3-dien ( $C_8H_{14}$ ) gibi bileşikler bulunabilmektedir (Kilcast, 1996, Krishnani ve diğ., 2008). Ancak, Geosmin ve MİB'in, tatlısularda en yaygın bulunan ve en çok sorun yaratan biyolojik kaynaklı kokular olabileceği düşünülmektedir (Jüttner ve Watson, 2007).

Sularda tat ve koku yayan bileşikler birden fazla canlı grubu tarafından üretilebilir, ancak bu canlı grupları "organoleptik parmakizi" olarak nitelendirilebilecek tek tip tat ve koku üretme yeteneğine sahip değildir (Watson, 2003). Bu durum, sulardaki tat ve koku problemlerinin kaynağının tespitini zorlaştıran faktörlerden biridir. Birden fazla canlı grubunun ürettiği bilinen Geosmin ve MİB gibi koku yayan maddelerin kaynağını belirlemede canlı gruplarına (şube, cins veya tür seviyesinde) özgün tasarlanan moleküller

genetik temelli tespit yöntemleri, hızlı ve güvenilir sonuç sağlamaları açısından tat ve koku problemlerinin biyolojik kaynaklarının belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır.

Kaynağı değişebilen tat ve koku bozulmaları, içme suyu ile ilgili yapılan tüketici şikâyetlerinin büyük bir bölümünü oluşturabilmektedir (Suffet ve diğ., 1996; Deveci, 2017). Bunun yanı sıra su ürünleri yetiştiriciliği yapılan sularda ürünlerin tat ve kokusunu bozarak ekonomik kayıplara da neden olabilmektedir (Kutovaya ve Watson, 2014).

## 2.2. SİYANOBAKTERİLER

### 2.2.1. Sınıflandırma ve Taksonomik Konum

Mavi-yeşil algler olarak da bilinen siyanobakteriler (Cyanophyta), yaklaşık 3,5 milyar yıl önce ortaya çıktığı ve 1,5 milyar yıl boyunca baskın yaşam formu olduğu düşünülen fotosentetik prokaryotik canlı grubudur (Bellinger ve Sigeo, 2010). Ortaya çıktıkları düşünülen dönemlerden günümüze kadar ulaşabilmeleri, farklı ekosistemlerdeki hızlı ve tekrarlı gerçekleşen adaptasyonlar yoluyla elde ettikleri ekolojik anlamda avantajlı yaşam stratejilerine sahip olmalarının da bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Komárek, 2016). Birçok siyanobakteri türü, farklı habitatlarda veya farklı stres koşulları altında, farklı morfolojik fenotip gösterebilmektedir (Watson ve diğ., 2016). Bu durum, siyanobakterilerin taksonomik açıdan değerlendirilmelerini oldukça zorlaştırmaktadır. Sınıflandırılmalarıyla ilgili veriler, moleküler dizi verilerine bağlı olarak her gün güncellenmektedir (Komárek ve diğ., 2014). Siyanobakteriler, Eubacteria alemi içinde yer alırlar ve 16S rRNA gen sekans analizlerine göre, daha çok gram-pozitif bakterilere yakındırlar (Pabuççu ve Yücer, 2017). Siyanobakterilerin bilinen güncel taksonomik konumları **Tablo 2.1**'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.1:** Siyanobakterilerin taksonomik konumu<sup>1</sup>.

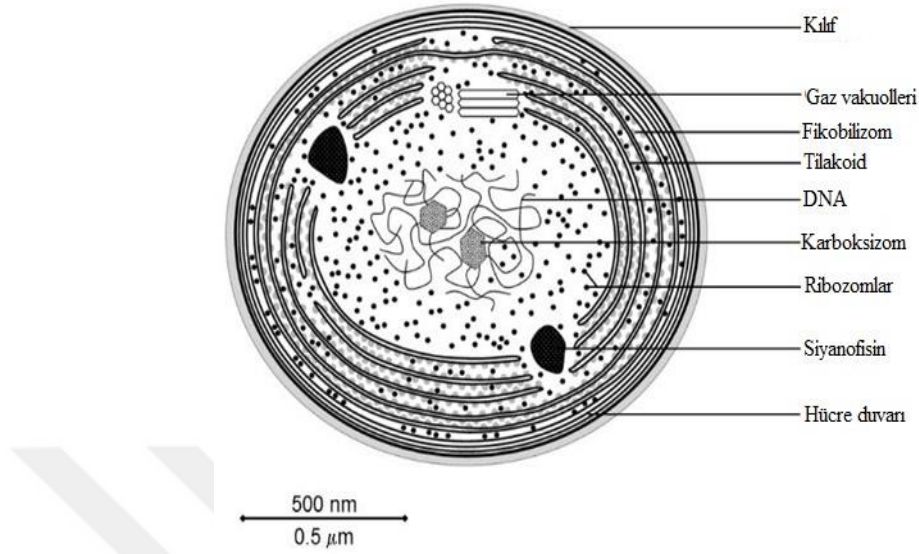
Taksonomik Seviye	İsim	Otorite
Üst alem	Prokaryot	Allsopp
Alem	Eubacteria	Cavalier-Smith
Alt alem	Negibacteria	Cavalier-Smith ex Cavalier-Smith
Şube	Cyanobacteria	Stanier ex Cavalier-Smith

Siyanobakterilerin sınıflandırılmalarıyla ilgili günümüzde ortaya konan en kapsamlı yaklaşım; bilinen morfolojik-ekolojik özelliklerinin ve filogenetik moleküler dizi bilgilerinin birlikte değerlendirildiği “polifazik yaklaşım”dır (Komárek, 2016). Bu yaklaşım ışığında, siyanobakterilerin sınıflandırılmalarıyla ilgili sorunların ortadan kalkabileceği ve önümüzdeki yıllarda siyanobakteri sınıfına pek çok yeni türün ekleneceği tahmin edilmektedir.

### 2.2.2. Hücre Özellikleri

Siyanobakteriler, zarla çevrili organeli bulunmayan, basit hücreli yapıları olan prokaryotlardır (Sheath ve Wehr, 2015). Hücrelerinin çapı genellikle 10 µm'den küçük olan siyanobakteriler, genetik materyallerini hücrenin renksiz sentroplazması içinde serbest şekilde bulundururlar (Bellinger ve Sigeo, 2010). Gerçek bir nükleusun var olmadığı diğer bakterilerde olduğu gibi siyanobakterilerde de genetik materyalin yoğun bir kitle durumunda olduğu bu bölgeye “nükleoid” adı verilmektedir ve bakterilerden alınmış ince kesitlerin elektron mikrograflarında, hücrelerin yaklaşık üçte birini kaplayan bu bölge belirgin şekilde gözlenebilmektedir (Temizkan, 1999) (**Şekil 2.1**).

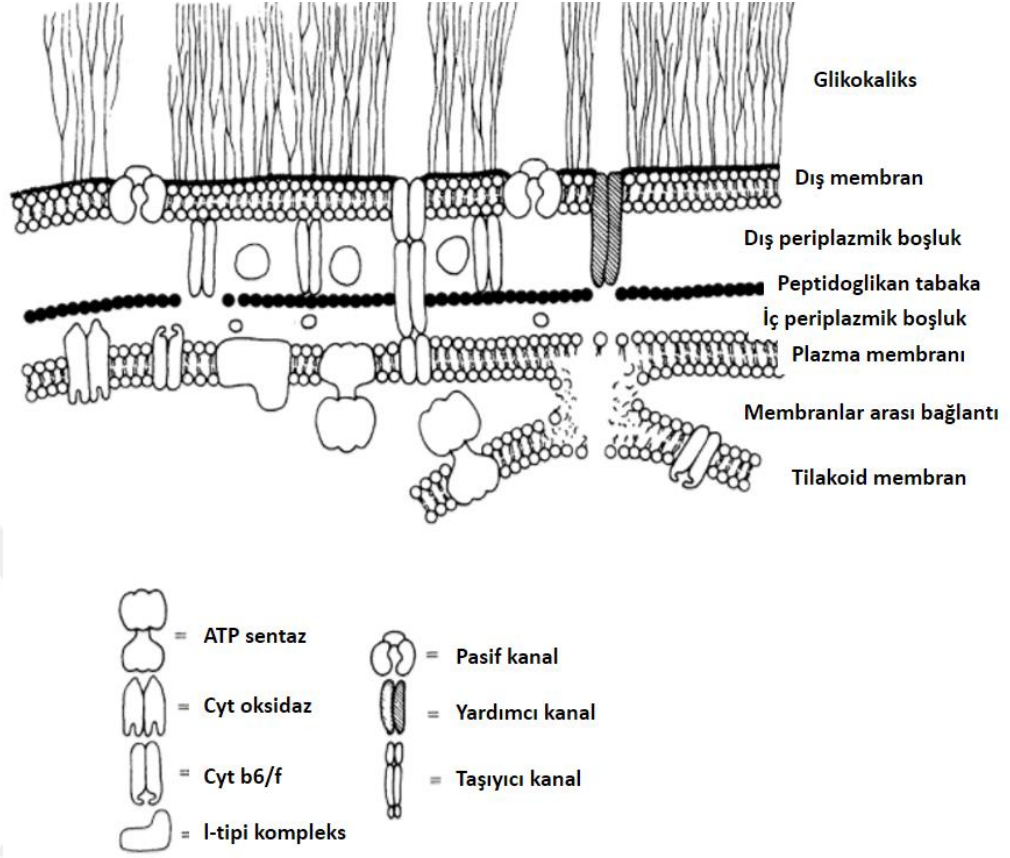
<sup>1</sup> (Guiry ve Guiry, 2017)



**Şekil 2.1:** Siyanobakterilerde hücresel yapının şematik gösterimi<sup>2</sup>.

Siyanobakteri hücrelerinde ortak olarak siyanofisin nişastası, dağınık halde bulunan tilakoidler, fikobiliprotein pigmentleri ve peptidoglikan duvar yapısı görülmektedir (Sheath ve Wehr, 2015). Siyanobakteri hücreleri, karbonhidratça zengin bir glikokaliks ile çevrelenmişlerdir. Hücreye şeklini veren glikokaliks, Gram-negatif bakterilerde bulunan yapıya benzer olmasına rağmen, siyanobakterilerde peptidoglikan tabaka daha kalındır. Kimyasal kompozisyonu ise Gram-pozitif bakterilerinkine benzerlik gösterebilmektedir (Şekil 2.2) (Bryant, 1994).

<sup>2</sup> (Anon., 2017)



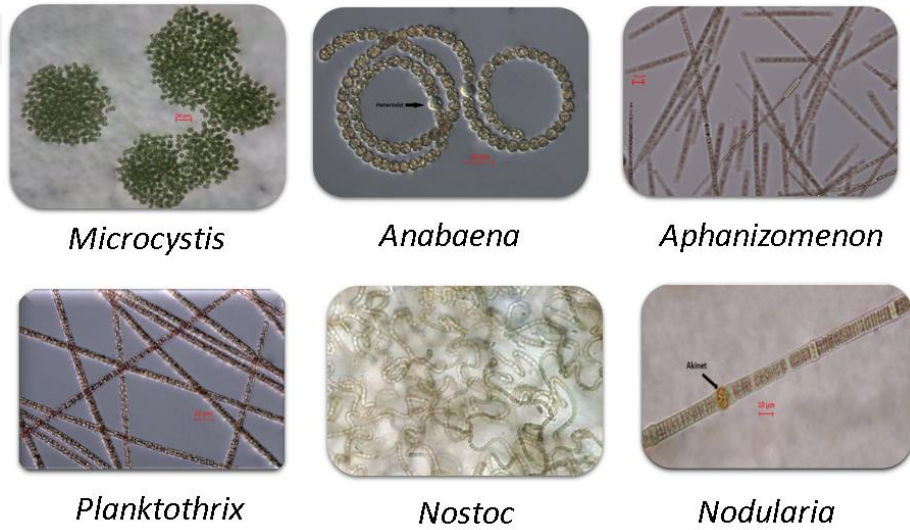
Şekil 2.2: Siyanobakteri hücresinin dış yüzeyinin bir modeli<sup>3</sup>.

Pigmentler, kromatoplazma adı verilen ve hücre duvarlarına yakın olan kısımda yer almaktadır (Çolakoğlu, 1999). Fotosentetik pigment olarak klorofil-a (yeşil), fikoeritrin (kırmızı), fikosiyenin (mavi) ve allofikosiyenin (mavi) bulundurmaktadır (Sheath ve Wehr, 2015). Düşük ışık seviyelerinde fikosiyenin pigmenti baskın duruma gelerek klorofille birlikte siyanobakterilere karakteristik mavi-yeşil rengi vermektedir (Bellinger ve Sigeo, 2010).

<sup>3</sup> (Bryant, 1994).

Hücre tipleri *Synechococcus* gibi tek hücreli formdan *Microcystis* gibi koloni oluşturan veya *Anabaena* gibi filamentli formlara kadar oldukça farklı morfolojik çeşitlilik gösterir (Bellinger ve Sige, 2010). Bazı türler, hücre duvarının dışında musilaj tabakasına sahiptir ve bazı türlerde musilaj jelimsi bir matriks oluşturabilmektedir (Şekil 2.3) (Bellinger ve Sige, 2010).

İçinde en çok çeşitliliği barındıran Nostocales takımı, heterosistler ve akinetler olmak üzere iki önemli özelleşmiş hücre yapısına sahiptir (Komárek ve Johansen, 2015). Heterosistlerde bulunan nitrogenaz enzimi, anaerobik koşullarda atmosferik veya suda çözülmüş serbest azotun fiksasyonunu gerçekleştirmektedir (Wolk, 1973). Canlıların yapıtaşı olan nükleik asitlerin sentezinde gerekli olan azot, bu yolla sudaki diğer canlıların kullanabileceği bir forma dönüştüğünden heterosistler siyanobakterilerin ekolojik önemini arttıran yapılardır. Akinetler ise siyanobakterilerde olumsuz çevre koşullarına karşı, hücrenin canlılığını devam ettirebilmesi için uygun olmayan koşullar altında organizmanın hayatta kalmasını sağlayan dayanıklı özelleşmiş hücrelerdir.



Şekil 2.3: Siyanobakterilerde farklı morfolojik yapılarıdaki hücre tipleri<sup>4</sup>.

<sup>4</sup> Mikroskop fotoğrafları A. Oğuz, L.Köker, R. Akçaalan ve Z. Tunç tarafından çekilmiştir.

Genel olarak mikroskopik incelemede bazı ayırt edici özelliklere göre morfolojik olarak sınıflandırma yapmak mümkün olabilmektedir. Örneğin; *Microcystis* cinsinde hücreler yuvarlaktır ve çapları 4-6 µm genişliğindedir. Bu hücreler müsilaj bir yapıyla gevşek şekilde biraraya gelerek 40-400 µm çapında küresel veya düzensiz şekillerde koloniler oluşturabilmektedir (**Şekil 2.3**). *Anabaena* cinsinde hücreler yuvarlak veya ovaldır ve çapları 4-8 µm genişliğindedir. Hücreler düz, kıvrık veya sarmal yapıda farklı uzunlukta (heterosist ve akinet içeren) filamentler oluşturabilmektedir (**Şekil 2.3**). *Planktothrix* cinsinde hücreler disk şeklindedir ve 4-8 µm genişliğindedir. Hücreler biraraya gelerek tek bir hücreyi ayırt etmenin zor olduğu düz trikom yapılarını oluşturur (**Şekil 2.3**). Trikomun ucunda bulunan hücrenin şekli diğerlerinden farklıdır ve hücrelerde gaz vesikülleri bulunur. *Oscillatoria* cinsinde de hücreler disk şeklindedir ve genişlikleri uzunluklarına göre daha fazladır. Hücreler düz trikom yapısı oluşturur. Trikomun ucundaki hücre yuvarlak veya ayırt edilebilen farklı bir yapıdadır. Hücrelerde gaz vesikülleri bulunmaz ve bentiktir. *Nostoc* cinsinde hücreler yuvarlaktır ve bükülmüş yapıda trikomlar oluşturur. Bazı türlerinde heterosist ve akinet bulunabilir. Trikomlar müsilaj bir tabaka içinde paketlenmiş şekilde bulunabilir ve bu nedenle koloniler çoğu zaman makroskopik şekilde ayırt edilebilir (Meriluoto ve diğ., 2005).

Siyanobakterilerde, hareket organeli olan flagella veya fimbrium bulunmadığı için aktif hareket gözlenmemektedir (Çolakoğlu, 1999). Yalnızca, *Synechocystis* sp. PCC 6803 suşunda yapılan bir çalışmada, fotoreseptörler tarafından algılanan ışık kaynağına doğru IV. Tip pilus aracılığıyla fototaksi hareketi yapabildikleri gösterilmiştir (Schuergers ve diğ., 2016).

Siyanobakterilerin küçük genom boyutları ve hücresel aktiviteleri için düşük konsantrasyonda besin kaynağına ihtiyaç duymaları, genetik çalışmalar için avantaj oluştururken (Mazard ve diğ., 2016), kültürdeki gelişim sürelerinin diğer bakteri gruplarına göre daha yavaş olması dezavantaj oluşturmaktadır (Dittmann ve diğ., 2015).

### 2.2.3. Yaşam Alanları

Uzun evrimsel geçmişlerinin bir sonucu olarak ekstrem çevre koşullarına (termal su kaynakları, kurak koşullar), acısu koşullarına (yarı tuzlu), az veya çok miktarda besin maddesi olan çevre koşullarına ve planktonik/bentik habitatları içeren her türlü tatlısu çevrelerine adapte olmuşlardır (Bellinger ve Sigeo, 2010; Mazard ve diğ., 2016). Siyanobakteriler, tatlısularda denizlere göre daha yaygındır ve denizlerdekine göre daha çok çeşitlilik göstermektedir (Kulasooriya, 2012).

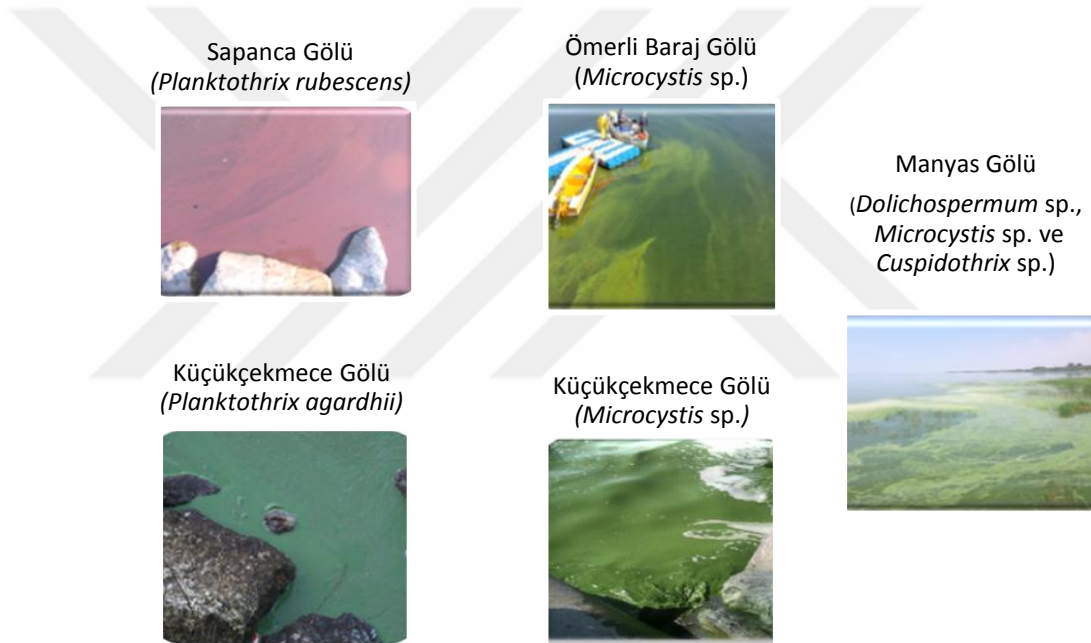
Siyanobakteriler; fotosentez yapabilme yetenekleri, atmosferdeki serbest azotu organik forma dönüştürerek simbiyotik ilişkilerinde katkı sağlama ve besin zincirinin üst seviyelerindeki canlılar için değerli bir besin kaynağı olma özellikleriyle sucul ekosistem için önemli bir yere sahiptir.

### 2.2.4. Siyanobakterilerin Geosmin ve MİB Problemindeki Önemi

Amip (*Vannella* sp.), aktinobakteri (*Streptomyces griseofuscus*) ve mantarlar (*Penicillium* ve *Aspergillus* cinslerine ait türler) gibi çeşitli canlı grupları tarafından sentezlendiği bilinen bu sekonder metabolitlerin sucul ekosistemdeki birincil üreticisi, siyanobakterilerdir. Dünyada, Biwa ve Kasumigaura Gölü (Japonya), San Vicente Rezervuar Alanı (Amerika Birleşik Devletleri), Llobregat Nehri (İspanya) gibi farklı habitatlarda siyanobakterilerin Geosmin ve MİB ürettiğine dair kayıtlar vardır (Kajino ve Sakamoto, 1995; Sugiura ve diğ., 1998; Izaguirre ve diğ., 1999; Vilalta ve diğ., 2004; Jüttner ve Watson, 2007; Zhang ve diğ., 2016).

Siyanobakteriler, buldukları ortamlarda zaman zaman baskın hale gelebilmektedir. Bu durum genellikle birden fazla faktörün etkisinden kaynaklanmaktadır. Sudaki besin tuzu konsantrasyonu (Örn: Azot/Fosfor oranı), su yapısının morfometrisi, su sıcaklığı, su yüzeyine gelen ışığın ulaşabildiği derinlik, suyun karışma veya tabakalanma durumu ve sudaki besin zinciri yapısı en önemli faktörlerdendir (Dokulil ve Teubner, 2000). Koşullar

uygun hale geldiğinde siyanobakteriler aşırı artış gösterebilmekte ve zaman zaman buldukları suyun yüzeyini kaplayan bir tabaka oluşturabilmektedir (**Şekil 2.4**) (Akçaalan, 2008). Siyanobakteriler, içme suyu kaynağı olarak kullanılan barajlarda baskın olmaları durumunda filtreleri tıkamakta, suyun tadını ve kokusunu bozmakta hatta suyun kullanılabilirliğini ortadan kaldırmaktadırlar (Albay ve diğ., 2003). Bu aşırı alg artışları, sıcak iklim bölgelerinde yıl boyunca meydana gelebilmektedir (Paerl ve Otten, 2013). Ayrıca, termal tabakalanma görülen göllerde ötrofik koşullarda hipolimniyonun anoksik olması besin tuzlarının sedimandan salınmasına neden olabilmektedir (Cooke ve Carlson, 1989). Bu koşullar siyanobakteri aşırı artışlarına zemin hazırlamaktadır.



**Şekil 2.4:** Ülkemizdeki siyanobakteri aşırı artış örnekleri.

Genellikle siyanobakteri artışları yaz ortasından sonbahar başına kadar olan dönemde ötrofik göllerde meydana gelebildiği gibi yılın her mevsiminde sucul ekosistemlerde siyanobakteri artışları görülebilmektedir (Bellinger ve Sigeo, 2010). Bu aşırı artışların sonrasında sudaki CO<sub>2</sub> artar, pH düşer ve oksijensiz koşullar ortaya çıkabilir. Ayrıca, bazı

siyanobakteri türlerinin ürettiği siyanotoksinler su ekosistemlerinde ciddi sorunlara yol açabilir (Rodriguez ve diğ., 2017).

Geosmin ve MİB metabolitleri, özellikle siyanobakteri aşırı artışlarını takip eden zamanlarda, canlılığını yitiren siyanobakteri hücrelerinin parçalanmasıyla birlikte suya karışabilmektedir. Ancak, her siyanobakteri aşırı artışı Geosmin ve MİB üretimini gerçekleştirmez. Örneğin, *Microcystis* gibi siyanobakterilerin aşırı artışları Geosmin ve MİB üretmezken suda tat ve koku bozucu farklı bileşiklerin (Örn. foseptik/sarımsak/çürük kokusu yayan Dimetil disülfid (DMDS), Dimetil trisülfid (DMTS), soğan/et/sülfür kokusu yayan İzopropil disülfid, ester/meyve kokusu yayan 6-Metil-5-hepten-2-on, tütün/tütsü/küf benzeri koku yayan  $\beta$ -cyclocitral, çiğ balık benzeri/bozulmuş yemek benzeri koku yayan 2,4,7-Dekatrienal) oluşmasına neden olabilmektedir (Lee ve diğ., 2017). Bu kokulara aynı zamanda ökaryotik algler de (Örn: *Asterionella* sp., *Nitzschia* sp., *Aulacoseira* sp., *Cyanidium* sp., *Scenedesmus* sp.) neden olabilmektedir (Lee ve diğ., 2017).

Geosmin ve MİB'in hücre içindeki bulunuşları, proteinlere bağlı ve serbest (sitozolda) form olarak iki şekilde görülebilmektedir. Bu durum, üretici siyanobakteri hücrelerinin içinden, buldukları ortama geçebilen Geosmin veya MİB miktarını doğrudan etkilemektedir. Örneğin; Wu ve Jüttner (1988) *Oscillatoria tenuis*'te yaptıkları çalışmada Geosmin'in MİB'e göre hücre dışına daha az salındığını tespit etmiştir. Bu durumun hücre içindeki Geosmin'in hücre bileşenlerine tutunmuş halde olmasından ve Geosmin'in önemli bir bölümünün tilakoid membranda (**Şekil 2.2**) bulunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Wu ve Jüttner, 1988). Ayrıca, Geosmin ve MİB'in tilakoid membranların üst yüzeyinde yer alan fikobilin proteinlerine Hidrojen bağları ve Van der Waals çekim kuvveti ile tutunabilecekleri de ileri sürülmektedir (Jüttner ve Watson, 2007). Geosmin ve MİB'in hücre içinde iki form şeklinde bulunabilmeleri, hücre içi veya hücre dışı miktarlarının tespiti için yapılan analitik çalışmalar için gözardı edilmemesi gereken en önemli noktalardan biridir.

Geosmin ve MİB üreticisi olan siyanobakteri türleri ile bu metabolitleri üretmeyen türler suda birlikte bulunabilirler; ancak üretici olan siyanobakterileri mikroskopta morfolojik özelliklerine bakarak ayırt etmek mümkün değildir. Geosmin ve MİB biyosentezi için gerekli olan gen bölgeleri bilindiğinden Geosmin ve MİB üreticisi olan siyanobakterilerin tespitinde bu bilgilerden yararlanılabilmektedir.

### 2.3. SEKONDER METABOLİTLER

Canlıların büyüme, gelişim ve çoğalma gibi temel biyolojik süreçlerine doğrudan katılmayan organik bileşikler sekonder metabolitler olarak adlandırılmaktadır (Żak ve Kosakowska, 2016). Genellikle düşük molekül ağırlıklı olan sekonder metabolitler, farklı ve çoğunlukla da etkili biyolojik aktiviteye sahiptir (Mandal ve Rath, 2015). Sekonder metabolitler, organizmanın stres koşullarına karşı savunma mekanizması geliştirmesini ve türlerarası rekabet sürecinde hayatta kalmasını sağlayabilmektedir (Mandal ve Rath, 2015).

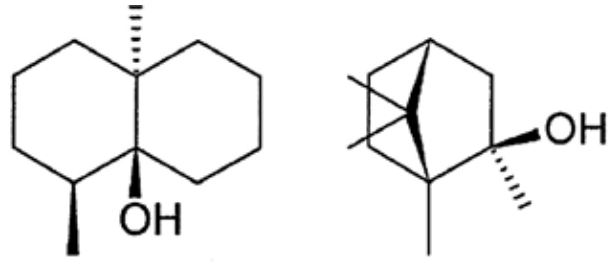
Sekonder metabolitler, hem karasal hem de sucul organizmalar tarafından üretilmektedir. Siyanobakterilerin, sahip oldukları evrimsel geçmişleri boyunca ilişki halinde oldukları mikro ve makro organizmalarla kurdukları özgün etkileşimlerin çoğu, özgün ve karmaşık genetik yolların yan ürünleri olan sekonder metabolitler sayesinde gerçekleşmiştir (Mazar ve diğ., 2016). Ancak, karasal ekosistemlerdeki sekonder metabolitler ve çevreleriyle olan etkileşimleri ile ilgili mevcut bilgilerle karşılaştırıldığında sucul habitatlardaki sekonder metabolitler ve çevrelerine olan etkileriyle ilgili bilgilerimiz daha sınırlıdır (Żak ve Kosakowska, 2016). Sucul ekosistemlerde üretici canlı tarafından suya bırakılan sekonder metabolitlerin işlevsel hale gelebilmeleri için tamamen hidrofilik yapıda ve hedef canlılara etki edecek miktarda olması zorunludur (Gross, 2003).

Siyanobakteri sekonder metabolitlerinin yapısal ve işlevsel özellikleri ile ilgili çalışmalar, bu metabolitlerin ekolojik rollerini anlamaya yönelik çalışmalara göre daha hızlı ilerlemektedir. Ağırlıklı olarak; halk sağlığını etkileyen sekonder metabolitlerden, siyanotoksinler ve aşırı alg artışlarını tetikleyici etkisi olabilecek sekonder metabolitler üzerine çalışmalar mevcuttur (Legrand ve diğ., 2003). Son yıllarda ise bu metabolitlerin antikanser, antimikrobiyal ve UV koruyucu olarak gösterdikleri etkiler nedeniyle sekonder metabolitler üzerindeki araştırmalar hız kazanmıştır (Żak ve Kosakowska, 2016). Bunun yanı sıra yiyecek, yakıt ve pigment üretimi gibi biyoteknolojik uygulamaları içeren çalışmaların da sayısında ciddi bir artış olmuştur (Mazar ve diğ., 2016).

Siyanobakteri sekonder metabolitlerinin yapısal ve fonksiyonel özellikleri aydınlatıldıkça hedeflenen hizmet veya ürüne yönelik bu canlıları “sessiz fabrikalar” (Gözükırmızı, 2013) olarak kullanma olanaklarımız da hızla artmaktadır. Genom haritaları tamamlanan siyanobakteriler, sekonder metabolitlerin biyosentez süreçlerinin de aydınlatılmasında bize oldukça önemli bilgiler sağlamaktadır. Biyolojik sistemlerdeki tek bir genin incelenmesi anlayışından bir canlıda bulunan tüm biyolojik ağların bir bütün olarak incelenmesi ve biyolojik sistemlerin sentetik olarak yeniden yapılandırılması anlayışına kadar uzanan (Mazar ve diğ., 2016) geniş bir uygulama alanına sahip olan genetik teknolojiler ışığında, sekonder metabolitler, gelecekte çok farklı biyoteknolojik uygulamalarla karşımıza çıkabilecektir.

### **2.3.1. Sularda Geosmin ve MİB Problemi**

Geosmin, toprak benzeri ve MİB ise küf benzeri koku yayan iki uçucu organik bileşiktir (Şekil 2.5). Koku eşik değerleri çok düşük (sularda ortalama 10 ng/l) olan, bu bileşikler biyolojik kaynaklıdır (Watson ve diğ., 2008). İçsularımızda da görülen bu iki bileşikle ilgili koku eşik değerlerinin belirlenmesine yönelik bir çalışma ülkemizde henüz yapılmamıştır.



(-) Geosmin

(-) 2-Metilizoborneol

**Şekil 2.5:** Geosmin ve MİB sekonder metabolitlerinin kimyasal yapıları.

a. Geosmin b. MİB<sup>5</sup>

Coğrafi açıdan değerlendirildiğinde, Geosmin ve MİB dünyada pek çok bölgede (Amerika, Kanada, Japonya, Çin, Mısır, Almanya, İsviçre, İtalya, Avustralya, Norveç, Irak, Fransa, İsveç, İskoçya, Rusya, Finlandiya ve Türkiye) tespit edilmiştir (**Tablo 2.2**)

<sup>5</sup> (Jüttner ve Watson, 2007)

**Tablo 2.2:** Ülkelere göre sularda Geosmin ve MİB çalışmaları<sup>6</sup>.

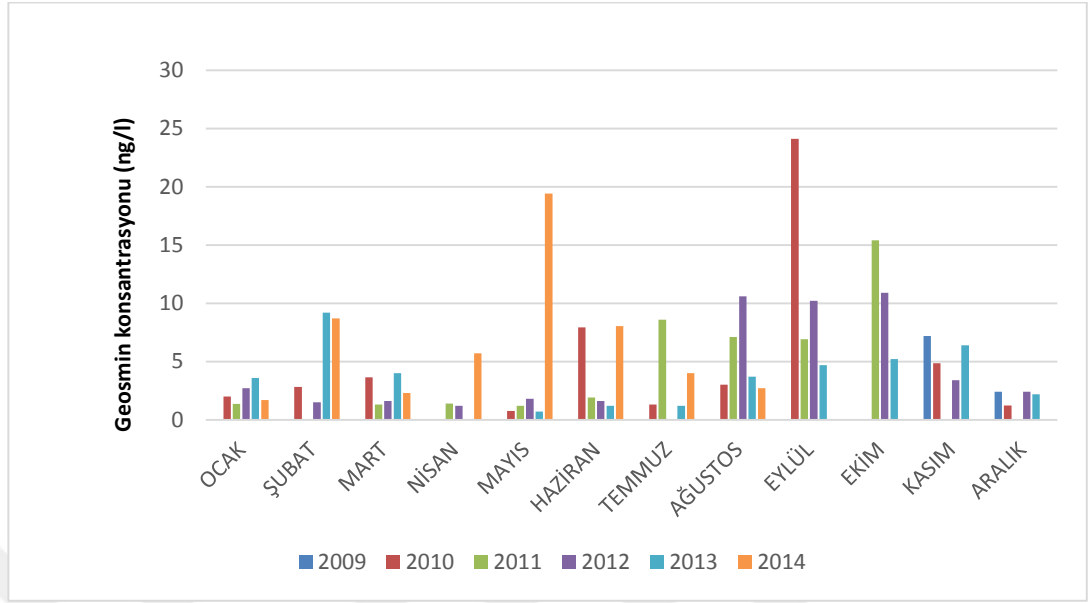
ÜLKE	YER	KOKU	KAYNAK
Amerika	Castaic Gölü (Kaliforniya)	MİB	<i>Pseudanabaena</i>
	Perris Gölü (Kaliforniya)	Geosmin	<i>Anabaena</i>
	Mathews Gölü (Kaliforniya)	MİB	<i>Phormidium</i>
	Cheney Rezervuarı (Kansas)	Geosmin ve MİB	Teşhis edilmedi.
Kanada	Buffalo Gölü	Geosmin	Siyanobakteri
	Ontario Gölü	Geosmin	Fitoplankton
	North Saskatchewan Nehri	Geosmin ve MİB	Aktinobakteri
	Cedar Gölü (Manitoba)	Geosmin ve MİB	Teşhis edilmedi.
Japonya	Toshima Adası (Tokyo)	Geosmin	<i>Oscillatoria</i>
	Kasumigauru Gölü	Geosmin	<i>Phormidium</i>
	Biwa Gölü	Geosmin ve MİB	<i>Anabaena</i>
	Shinji Gölü	Geosmin	<i>Coelosphaerium</i>
Çin	Xionghe Rezervuarı	Geosmin	<i>Streptomyces</i>
	Yanghe Rezervuarı	Geosmin	<i>Anabaena</i>
	Gonghu Koyu	Geosmin ve MİB	Teşhis edilmedi.
Almanya	Petrusplaat Rezervuarı	Geosmin	Oscillatoriales
	Konstanz Gölü	Geosmin	Aktinobakteri
	Wahnbach Rezervuarı	Geosmin	Siyanobakteri
İsviçre	Zürich Gölü	Geosmin ve MİB	Teşhis edilmedi
İtalya	Arno Nehri, Floransa	Geosmin ve MİB	Siyanobakteri ve Aktinobakteri
Türkiye	Ömerli Baraj Gölü	MİB	<i>Pseudanabaena</i>
	Sapanca Gölü	Geosmin	<i>Planktothrix</i>

<sup>6</sup> (Uwins, 2012; Alkam ve diğ., 2015; Suurnäkki, 2015; Watson ve diğ., 2016; Godo ve diğ., 2017)

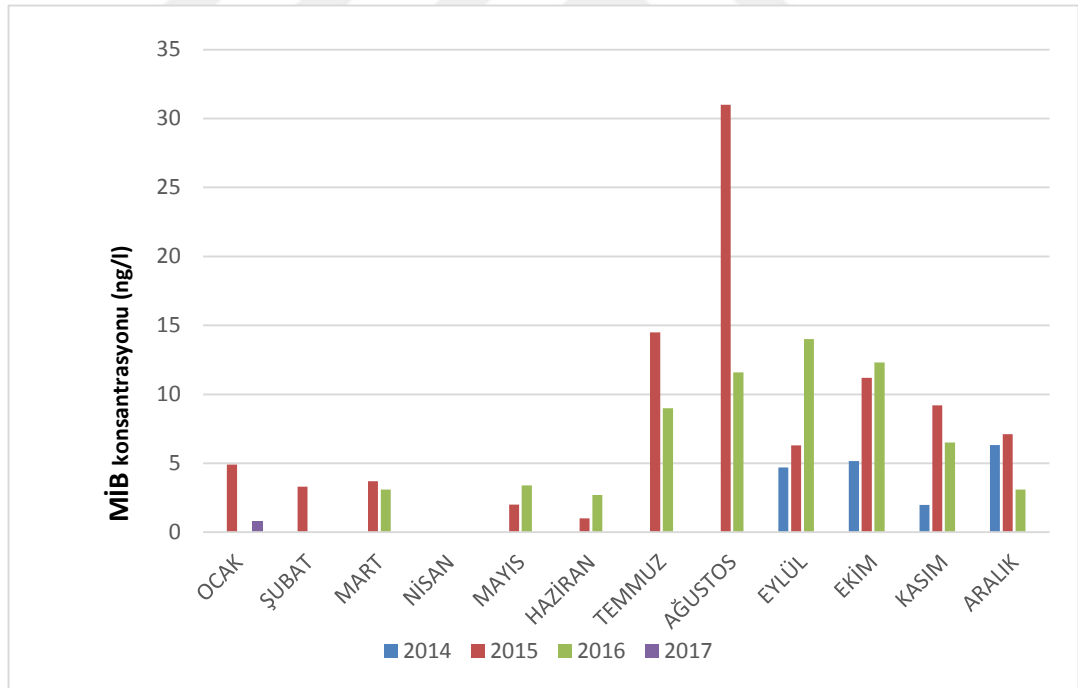
**Tablo 2.2 (Devam):** Ülkelere göre sularda Geosmin ve MİB çalışmaları.

ÜLKE	YER	KOKU	KAYNAK
Irak	Divaniye şehri	MİB	<i>Microcoleus</i>
		Geosmin	<i>Phormidium</i>
Norveç	Mjøsa Gölü	Geosmin	<i>Tychonema</i>
Fransa	Chambon Gölü	Geosmin	<i>Aphanizomenon</i>
İsveç	Bentoz	Geosmin	<i>Cylindrospermum</i>
Rusya	Belirtilmemiş	Geosmin	<i>Nostoc</i>
İskoçya	Arron Adası	Geosmin	<i>Nostoc</i>
Finlandiya	Helsinki	Geosmin	<i>Nostoc</i>
	Autti		
	Kuhmo		
	Hiidenvesi		
	Mikkeli		
	Hormajärvi Gölü	Geosmin	<i>Oscillatoria</i>
	Langsjö Gölü	Geosmin	<i>Planktothrix</i>
Mısır	Solar Gölü (Taba)	Geosmin ve MİB	Siyanobakteri
Avustralya	Murrumbidgee Nehri	Geosmin	<i>Anabaena</i>

Ülkemiz sularında da görülen Geosmin ve MİB, içme suyu arıtma tesislerindeki arıtım süreçlerine rağmen çıkış sularında yüksek değerlerde görülebilmektedir (**Şekil 2.6** ve **Şekil 2.7**).



Şekil 2.6: Ömerli Orhaniye İçmesuyu Arıtma Tesisi ortalama Geosmin konsantrasyonu<sup>7</sup>.



Şekil 2.7: Ömerli İçmesuyu Arıtma Tesisi ortalama MİB konsantrasyonu<sup>8</sup>.

<sup>7,8</sup> İstanbul Su ve Kanalizasyon İdaresi İSKİ, 2010-2016 Su kalitesi raporları (Arıtma çıkışı)

### 2.3.2. Geosmin ve MİB'in Toksik Etkileri

Geosmin ve MİB'in, insan sağlığına uzun süreli etkileri konusunda henüz çalışma yapılmamıştır. Ancak, kısa süreli toksikolojik etkileri konusunda çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu alışmalarda, Geosmin ve MİB'in doğal ortamda gözlenen değerlerinin çok üstündeki miktarlarda olumsuz etkileri olabileceği görülmüştür. Örneğin, insan karaciğer hücre kültür hattı HepG2 üzerine 100 µg/ml MİB ve 75 µg/ml Geosmin üstündeki değerlerin sitotoksik etkileri olduğu görülürken bunun altındaki konsantrasyonların DNA hasarına yol açmadığı tespit edilmiştir (Burgos ve diğ., 2014). Balıklarda yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Gagné ve diğ., 1999). Gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) toksik etki Geosmin için 0,45 mg/l ve MİB için 10 mg/l konsantrasyonda görülürken; deniz kestanesi embriyolarında letal konsantrasyon Geosmin için 17 mg/l ve MİB için 69 mg/l olarak bulunmuştur (Krishnani ve diğ., 2008). Bu değerler sucul ekosistemlerde ölçülen konsantrasyonların (ng/l) ok üstündedir. Örneğin, Amerika Birleşik Devletleri eyaletlerinden Mississippi'deki balık havuzlarında 76 µg/l MİB, Auburn'daki balık havuzlarında 8,9 µg/l Geosmin tespit edilmiştir (Ploek ve diğ.,1992). Dünyada tespit edilen bazı değerler **Tablo 2.3'** te verilmiştir.

---

**Tablo 2.3:** Dünyada tespit edilen bazı Geosmin ve MİB konsantrasyonları<sup>9</sup>.

Kaynak	Konsantrasyon
Zürih Gölü, İsviçre	2,7-23 ng/l Geosmin
Kasumigaura Gölü, Japonya	900 ng/l MİB, 700 ng/l Geosmin
Senegal Nehri	47 ng/l Geosmin
Amerika içme sularında	46-88 ng/l Geosmin
Kanada içme sularında	10-120 ng/l Geosmin
Fransa içme sularında	2-10 ng/l Geosmin veya MİB

İnsan sağlığına olumsuz etkileri bilinmemesine rağmen Geosmin ve MİB, özellikle içme suyu olarak kullanılan suların tüketimini, yaydıkları istenmeyen koku nedeniyle olumsuz etkilemektedir (Dunlap ve diğ., 2015). Ayrıca, yüksek konsantrasyonlarda baş ağrısı, stres ve karın ağrısı gibi psikosomatik etkilere neden olabilmektedir (Young ve diğ., 1996; Zhang ve diğ., 2016).

### 2.3.3. Geosmin ve MİB'in Ekonomiye Olumsuz Etkisi

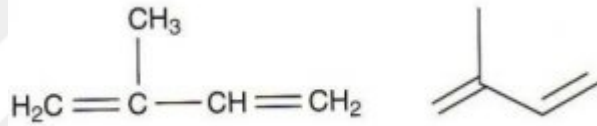
Geosmin ve MİB bileşiklerinin, yapısal özelliklerinin lipofilik olması nedeniyle özellikle balıkların ve kabuklu sucul canlıların solungaçları ve bağırsakları tarafından tutulma eğilimleri fazladır (Watson ve diğ., 2016). Bu nedenle su ürünleri yetiştiricilik sektörü açısından Geosmin ve MİB ekonomik kayıplara neden olabilmektedir. İçme suyu arıtma tesislerinde geleneksel arıtma yöntemleri ile giderimleri zor olduğundan (Watson ve diğ., 2016) ilave yöntemlerin kullanımı (aktif karbon gibi) içme suyu üretim maliyetini de arttırmaktadır. Bu durum, Geosmin ve MİB moleküllerinin buldukları ortamdan

<sup>9</sup> (Jüttner ve Watson, 2007).

uzaklaştırılmalarını zorlaştırmakta ve tat-koku olayları yaşanmadan önce sorun kaynağını tespit etmeye yönelik çalışmaların önemini arttırmaktadır.

### 2.3.4. Geosmin ve MİB'in Yapısal Özellikleri

Siyanobakteriler; peptitler, alkaloidler, poliketidler ve terpenler gibi farklı kimyasal yapıda sekonder metabolitler üretebilmektedir (Dittmann ve diğ., 2015). Geosmin ve MİB, sekonder metabolitlerin en geniş bölümünü oluşturan terpenler grubunda yer almaktadır. Kimyasal anlamda terpenler, yapısı çeşitli fakat belli sayıda izopren (beş karbonlu 2-metil-1, 3- butadien) (Şekil 2.8) birimlerine sahip olan molekülleri içeren bir grup olarak tanımlanmaktadır (Umay, 2007).



Şekil 2.8: İzopren Biriminin Kimyasal Yapısı<sup>10</sup>.

Terpenler; monoterpenler (iki izoprenli ve on karbonlu), seskiterpenler (üç izoprenli ve onbeş karbonlu), diterpenler (dört izoprenli ve yirmi karbonlu), sesterpenler (beş izoprenli ve yirmibeş karbonlu), triterpenler (altı izoprenli ve otuz karbonlu) ve karotenoitler (sekiz izoprenli ve kırk karbonlu) gibi büyüklüklerine göre değişen farklı grupları içermektedir (Yamada ve diğ., 2015). Terpenlerin çoğu hidrokarbonlardır; ancak alkoller, ketonlar veya aldehitler gibi oksijen içeren bileşikler de olabilmektedir. Bu türevler çoğunlukla terpenoitler olarak adlandırılmaktadır (Umay, 2007). Geosmin seskiterpen (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O) ve MİB monoterpen (C<sub>11</sub>H<sub>20</sub>O) grubunda yer alan ve siyanobakterilerde en yaygın görülen terpenoitlerdir (Umay, 2007; Smith ve diğ., 2008).

<sup>10</sup> (Jašić, 2009)

Terpenoitler, çok farklı canlı gruplarında kimyasal iletişimin çok farklı tiplerinde rol oynadığı bilinen moleküllerdir (Watson, 2003). Örneğin; denizel alglerden *Caulerpa taxifolia*'nın sentezlediği bir seskiterpen olan caulerpenyne, bu alg tarafından kendileri ile beslenen canlılara karşı savunma mekanizması olarak kullanılmaktadır (Watson, 2003). Terpenoitler, olfaktör (koku) özellikleriyle bilinen ve yiyecek-içecek, parfüm gibi farklı endüstrilerde bu özellikleri nedeniyle kullanılabilen maddeleri kapsayan kimyasal grubu oluşturmaktadır (Watson, 2003). Geosmin ve MİB, istenmeyen olfaktör özellikleri (toprak ve küf kokusu) taşıyan terpenoitlerdendir. Bu nedenle sularda bulunmaları, buldukları suyu da istenmeyen duruma getirmektedir.

Geosmin (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O) yapısal olarak ilk kez 1965'te tanımlanmış, toprak benzeri kokuya sahip, uçucu organik bir bileşiktir (Gerber ve Lechevalier, 1965). Toprakta geosmin üreticisi olan organizmalar, *Streptomyces* cinsine ait türler baskın olmak üzere Aktinobakterilerdir (Zaitlin ve Watson, 2006). Ancak ilerleyen yıllarda bu maddenin tek üretici grubunun aktinomisetler olmadığı anlaşılmış; miksobakteriler ve siyanobakteriler tarafından da üretildiği tespit edilmiştir (Dickschat, 2016). Ayrıca, Geosmin ve MİB'in bazı peynir, mantar, fındık, şarap ve sebzelere karakteristik lezzetlerini verdiği bilinmektedir (Frisvad ve diğ., 1997; Watson, 2003). Molekül ağırlığı 182,30248 g/mol (PubChem, 2017) olan Geosmin, genellikle hücre içindeki tilakoid ve sitoplazmik membrana tutunmuş şekilde bulunmaktadır (Watson, 2003).

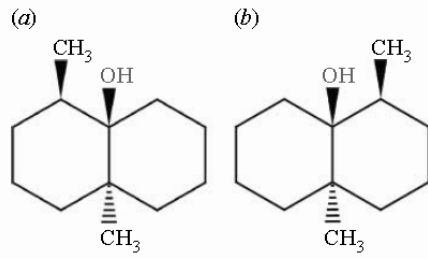
Geosmin ürettiği bilinen siyanobakteri türlerini/ suşlarını içeren cinsler: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Calothrix*, *Coelosphaerium*, *Cylindrospermum*, *Dolichospermum*, *Fischerella*, *Geitlerinema*, *Gloeotrichia*, *Heteroleibleinia*, *Hyella*, *Kamptonema*, *Leibleinia*, *Leptolyngbya*, *Lyngbya*, *Microcoleus*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Planktothrix*, *Plectonema*, *Pseudanabaena*, *Symploca*, *Symplocastrum*, *Synechococcus*, *Trichormus*, *Tychonema*'dır (Watson ve diğ., 2016).

MİB (C<sub>11</sub>H<sub>20</sub>O), küf benzeri oldukça güçlü bir kokuya sahip, molekül ağırlığı 168,2759 g/mol (PubChem, 2017) uçucu, alisiklik bir alkoldür (Zhang ve diğ., 2016). MİB, Geosmin'den birkaç yıl sonra (1969), *Streptomyces* cinsinden izole edilmiştir (Gerber,

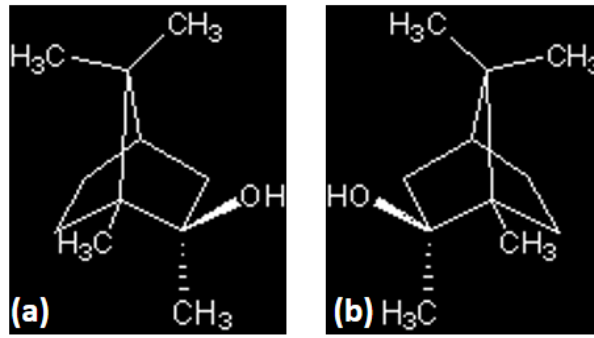
1969). Siyanobakterilerde keşfi ise daha ileri tarihlerde (1976) gerçekleşmiştir (Tabachek ve Yurkowski, 1976). MİB üreticisi canlılarla ilgili bilgiler Geosmin üreticisi canlılara göre çok daha azdır. Dolayısıyla, MİB ürettiği bilinen siyanobakteri tür sayısı da Geosmin üreticisi türlere göre daha azdır (Zhang ve diğ., 2016).

MİB ürettiği bilinen siyanobakteri türlerini/ suşlarını içeren cinsler: *Anabaena*, *Hyella*, *Lyngya*, *Leptolyngbya*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Planktothricoides*, *Planktothrix*, *Pseudanabaena*, *Microcoleus*, *Spirulina* ve *Synechococcus*'tur (Alkam ve diğ., 2015; Watson ve diğ., 2016; Zhang ve diğ., 2016; Chiu ve diğ., 2016) .

Geosmin ve MİB kiral moleküllerdir (**Şekil 2.9** ve **Şekil 2.10**). Watson ve diğ.'nin (2016), (-) enantiyomerlerin (+) enantiyomerlere göre yaklaşık 10 kat daha etkili koku yayabildiğini belirtmesi, bu moleküllerin kiral özelliklerinin önemini arttırmaktadır. Brookes ve diğ. (2009) tarafından yapılan çalışmada, koku yayan moleküllerin (veya farklı enantiyomerlerinin) koku eşik değerleri ile ilgili olarak, bu moleküllerle koku alma reseptörleri arasında kurulan ilişkinin etkili olabileceği tespit edilmiştir. Bu çalışmada, enantiyomerleri olan moleküller dört grupta incelenmiştir. Birinci grupta, benzer koku eşik değerine sahip olan enantiyomerler (Örn. (1*R*,4*S*)-(+)) Fenkon ve (1*S*, 4*R*)-(-) Fenkon enantiyomerleri), ikinci grupta birbirinden tamamen farklı yapıda olup farklı koku reseptörlerine farklı çekim güçleriyle bağlanan enantiyomerler (Örn. (4*R*)-(-) Karvon ve (4*S*)-(+)) Karvon enantiyomerleri) ve üçüncü grupta benzer koku yayan ancak kolay ayırt edilemeyecek düzeyde karakteristik açıdan birbirinden farklı enantiyomerler yer almaktadır. Geosmin ve MİB ise dördüncü gruptaki, aynı kokuya sahip ancak tamamen farklı koku eşik değerleri olan enantiyomerlere sahip moleküller grubuna dahil edilmiştir (Örn. (4*S*,4*aS*,8*aR*)-(-) Geosmin ve (4*R*,4*aR*,8*aS*)-(+)) Geosmin enantiyomerleri) (**Şekil 2.9**). Geosmin ve MİB gibi moleküllerin ortak özelliği "ozmoforik grup" olarak adlandırılan koku oluşumundan sorumlu, molekülün belli bir bölgesini oluşturan spesifik bir kimyasal grubu içermeleridir (Brookes ve diğ., 2009). Çoğu koku yayan molekül en az bir ozmoforik grup taşımaktadır. Polar özellikte olan bu grupların koku reseptörlerine hidrojen bağıyla tutunduğu düşünülmektedir (Brookes ve diğ., 2009).



Şekil 2.9: Geosmin'in enantiyomerleri<sup>11</sup>.



Şekil 2.10: MİB'in enantiyomerleri<sup>12</sup>.

### 2.3.5. Geosmin ve MİB Biyosentezi

Geosmin biyosentezinden, 5,4 kilobazlık bir gen kümesinin sorumlu olduğu bilinmektedir (Micallef ve diğ., 2015). Geosmin sentaz enzimi ve 2 siklik nükleotit bağlanma bölgesi protein, bu gen kümesindeki nükleotit bilgisine göre sentezlenmektedir (Şekil 2.11).

<sup>11</sup> (a) (4R,4aR,8aS)-(+)-enantiyomer, (b) (4S,4aS,8aR)-(-)-enantiyomer (Brookes ve diğ., 2009)

<sup>12</sup> (a) (R)-(-)-2-methylisoborneol enantiyomer, (b) (S)-(+)-2-methylisoborneol enantiyomer (Leffingwell, 2001-2002)

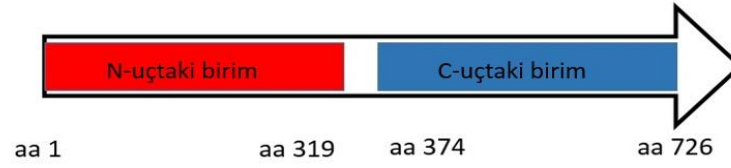


**Şekil 2.11:** Geosmin sentezinden sorumlu gen kümesinin şematik görünümü<sup>13</sup>.

Geosmin oluşumundan sorumlu enzim, ilk kez *Streptomyces coelicolor*'da tespit edilen Geosmin sentaz (EC 4.1.99.16) enzimidir (Jiang ve diğ., 2007). Geosmin sentaz, günümüze kadar 140 farklı organizmada tanımlanmıştır (NCBI, 2017). Enzim yapısında 675 ile (aktinomiset *Catelliglobospora koreensis*'te) 888 (*Streptomyces sp.*'de) arasında aminoasit bulunabilmektedir. *Streptomyces*, *Frankia*, *Saccharopolyspora* ve mikrobakteriyal genom dizilerine bakıldığında, 730-740 aminoasitlik yüksek seviyede korunmuş dizilere sahip olduğu görülmüştür (Watson ve diğ., 2016).

Geosmin sentezinde kritik rol oynayan *Geosmin sentaz* geni, siyanobakterilerde ilk kez 2008'de *Nostoc punctiforme* PCC73102 suşunda tespit edilmiştir (Giglio ve diğ., 2008). Siyanobakterilerde bilinen Geosmin Sentaz enzimi yapısını yaklaşık 730 aminoasit oluşturmaktadır (Şekil 2.12). Enzim, çift işlevli (N ve C uçlu) bir seskiterpen siklazdır (Giglio, 2013).

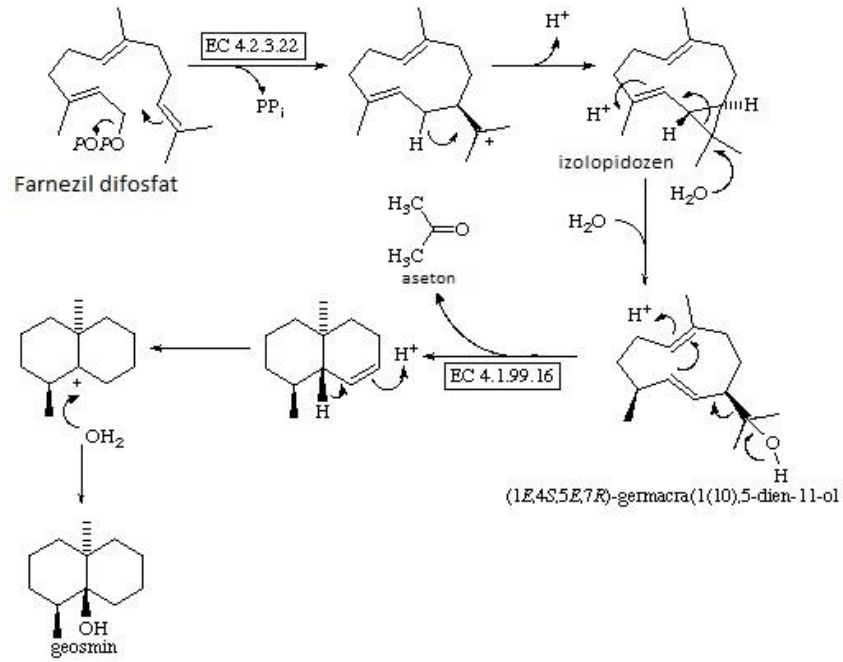
<sup>13</sup> (Wang ve diğ., 2014; Micallef ve diğ., 2015)



**Şekil 2.12:** Siyanobakterilerde Geosmin sentaz enziminin şematik görünümü <sup>14</sup>.

Geosmin sentaz enzimi, Farnezil pirofosfat (FPP)'tan Geosmin oluşum tepkimesini (Şekil 2.13) katalize eden liyaz tipi enzimdir (Jiang ve diğ., 2007). Geosmin biyosentezinin ilk basamağı sayılan Farnezil difosfattan Germakradienol oluşum sürecinde, Germakradienol sentaz enzimi ile birlikte Geosmin sentaz enziminin N uçlu bölgesi de görev almaktadır. Germakradienol oluşumundan sonraki basamaklarda ise Geosmin sentaz enziminin C uçlu bölgesi görev alarak Geosmin oluşumunda en önemli rolü oynamaktadır (Watson ve diğ., 2016).

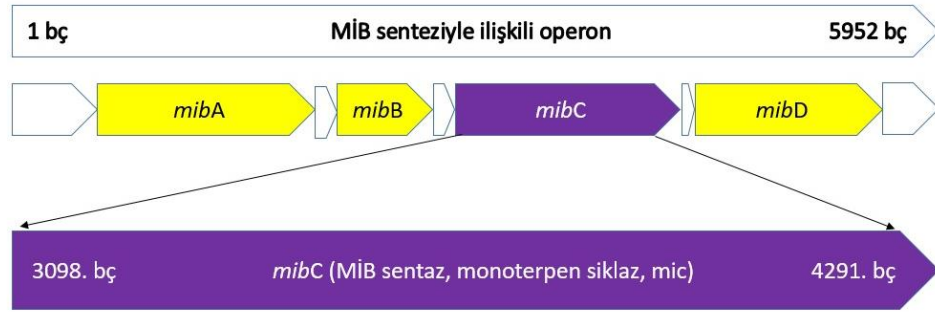
<sup>14</sup> (Giglio, 2013).



Şekil 2.13: Geosmin sentezinin önemli aşamalarının şematik görünümü<sup>15</sup>.

Siyanobakterilerde MİB sentezini gerçekleştiren *MİB sentaz* geni ise 2011’de *Pseudanabaena* sp. dqh15 suşunda tanımlanmıştır (Giglio ve diğ., 2008; Giglio ve diğ., 2011). MİB sentezinde kilit rol oynayan MİB Sentaz enzimi ve diğer proteinlerin anlatımıyla ilişkili olduğu bilinen operon, *mibA* (nükleotit bağlanan proteini kodlayan bölge), *mibB* (metiltransferaz kodlayan bölge), *mibC* ve *mibD* (nükleotit bağlanan proteini kodlayan bölge)’nin yer aldığı 5,9 kilobaz uzunluğundaki bölgeyi kapsamaktadır (Şekil 2.14) (Chiu ve diğ., 2016). Metilgeranil difosfattan 2-metilisoborneol oluşum tepkimesini sağlayan MİB sentaz (*mibC*, *mic* veya monoterpen siklaz) yaklaşık 1200 baz çiftlik bölgenin gen anlatım ürünüdür.

<sup>15</sup> (Moss, 2016)

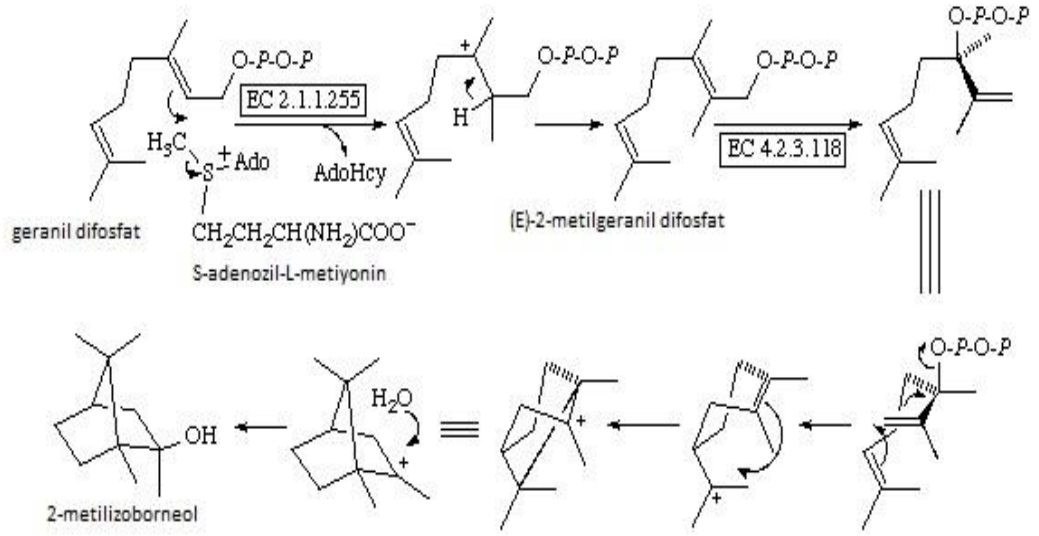


**Şekil 2.14:** MİB sentezinden sorumlu gen kümesinin şematik gösterimi <sup>16</sup>.

MİB, Geranil difosfattan (GPP) iki basamaklı tepkimeyle sentezlenmektedir (**Şekil 2.15**). GPP (Geranil difosfat), metiltransferaz (EC 2.1.1.255) tarafından metillenir ve bu tepkimeyi 2-metilgeranil difosfatın, 2-metilzoborneol sentaz (EC 4.2.3.118) tarafından siklizasyon tepkimesi izler (Wang ve Cane, 2008; Kakimoto ve diğ., 2014).

Geosmin ve MİB gibi yüzlerce siklik seskiterpen, monotermen ve diterpen, hidrokarbonlarla alkoller, asiklik bileşiklerden FPP, GPP (Geranil difosfat) ve GGPP (Geranilgeranil difosfat) öncüllerinin, enzim aracılığıyla gerçekleşen ve iyonlaşma tepkimesiyle başlayan siklizasyon mekanizmasının farklı biçimlerde gerçekleşmesiyle oluşmaktadır (Cane ve Ikeda, 2012).

<sup>16</sup> (Wang ve diğ., 2011; Chiu ve diğ., 2016),



Şekil 2.15: MİB Sentezinin önemli aşamalarının şematik görünümü<sup>17</sup>.

Geosmin ve MİB sentezinde görev alan enzimlerin özellikleri **Tablo 2.4**'te gösterilmiştir.

<sup>17</sup> (Moss, 2016)

**Tablo 2.4:** Geosmin ve MIB oluşumunu sağlayan enzimlerin özellikleri.

Enzim Adı	Enzim Kodu	Enzim Özellikleri	Görev Aldığı Tepkime
Germakradienol Sentaz	EC 4.2.3.22	Mg <sup>+2</sup> varlığında çalışır.	(2E,6E)-farnesyl diphosphate + H <sub>2</sub> O = (1E,4S,5E,7R)-germacra-1(10),5-dien-11-ol + diphosphate (Farnesil difosfattan Germakradienol oluşum tepkimesi)
Geosmin Sentaz	EC 4.1.99.16	Mg <sup>+2</sup> varlığında çalışır. Çift işlevli enzimdir. Enzimin C-uçlu bölümü Geosmin sentezini gerçekleştirir.	(1E,4S,5E,7R)-germacra-1(10),5-dien-11-ol + H <sub>2</sub> O = (-)-geosmin + aseton (Germakradienolden Geosmin oluşum tepkimesi)
Geranil difosfat 2-C metiltransferaz	EC 2.1.1.255	2-metilzoborneol ile birlikte MIB sentezini gerçekleştirmesine yardımcı olur.	S-adenosyl-L-methionine + geranyl diphosphate = S-adenosyl-L-homocysteine + (E)-2-methylgeranyl diphosphate (Geranil difosfattan 2-metilgeranil difosfat oluşum tepkimesi)
2-metilzoborneol Sentaz (Diğer isimleri: sco7700; 2-MIB cyclase; MIB synthase; MIBS) <sup>18</sup>	EC 4.2.3.118	MIB sentezini gerçekleştirir.	(E)-2-methylgeranyl diphosphate + H <sub>2</sub> O = 2-methylisoborneol + diphosphate (2-metilgeranil difosfattan 2-metilzoborneol oluşum tepkimesi)

<sup>18</sup> (Moss, 2016).

### 2.3.6. Geosmin ve MİB Biyosentezini Etkileyen Çeşitli Parametreler

Geosmin ve MİB biyosentezini etkileyen faktörlerin bilinmesi, bu sekonder metabolitlerin kontrolü açısından oldukça önemlidir. Geosmin ve MİB hücrede gelişim fazında sentezlenmeye başlamakta; durağan fazda, yaşlanma fazında (senesens) veya hücre parçalanması (lisis) ile hücre dışına salınımı gerçekleşmektedir (Watson, 2003). Ancak, mikro veya makro seviyede çevresel faktörlerin Geosmin ve MİB biyosentezine etki mekanizmaları ve hücre dışına salınım sürecine etkileri ile ilgili yeterli veya tüm siyanobakteriler için genelleştirilebilecek veriler bulunmamaktadır.

Siyanobakterilerde Geosmin ve MİB sentezinin biyolojik ve ekolojik fonksiyonu ile ilgili yeterli veri bulunmamaktadır. Ancak, mantarlarda Geosmin'in, birlikte sentezlendiği maddeyle, *Niponia nodulosa* (kırkayak) gibi avcı türlere karşı alarm feromonu veya bu canlıyı ortamdaki uzaklaştırıcı madde olarak görev alabileceği düşünülmektedir (Ômura ve diğ., 2002; Dickschat, 2017). Siyanobakterilerde de benzer şekilde ekolojik avantaj sağlama amacıyla sentezlenmesi ihtimali söz konusudur.

Siyanobakterilerin yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmeleri için gerekli en önemli iki abiyotik parametre; sıcaklık ve ışıktır. Bunun dışında, her siyanobakteri türü farklı biyotik ve abiyotik koşullara farklı makro ve mikro düzeyde tepkiler verebilmektedir. Makro düzeyde tepki, ortam koşullarına göre siyanobakterilerin morfolojilerinde çok çeşitli değişimlerin görülebilmesi veya sentezlenen koku maddelerinin hissedilebilir düzeylere ulaşması şeklinde görülebilmektedir. Mikro düzeydeki tepkiler ise gen ve gen ürünlerinde meydana gelen değişimler ile bu değişimlerin etkilediği metabolik yollardır.

*Pseudanabaena* sp. FACHB 1277 suşunda yapılan bir çalışmada, artan sıcaklığın hücre içinde tutunmuş halde bulunan MİB'in serbest hale gelmesini sağladığı tespit edilmiştir (Zhang ve diğ., 2016). Geosmin ve MİB moleküllerinin Hidrojen bağları ve Van der Waals kuvvetleri gibi zayıf bağlarla fikobilinlere bağlanmış durumdayken bu bağların koparılmasında sıcaklığın artırılması etkili olabilmektedir (Jüttner ve Watson, 2007).

*Lyngbya kuetzingii*'de yapılan çalışmada ise, en yüksek Geosmin miktarı, normal sıcaklık değerlerinin altında bulunan kültürlerde (10°C) görülmüştür (Zhang ve diğ., 2009). Bu nedenle sıcaklığın tek başına MİB ve Geosmin biyosentezi ile hücre dışına salınım sürecini etkileyen parametre olarak değerlendirilmesi için mevcut bilgiler yeterli görünmemektedir. Bazı araştırmacılar tarafından, diğer enzim aracılığıyla gerçekleşen tepkimelerde olduğu gibi, Geosmin ve MİB senteziyle gerçekleşen tepkimelerin de belli bir sıcaklığa kadar en yüksek verimde gerçekleştiği ve 40°C gibi proteinlerin denatürasyonuna neden olabilecek sıcaklıkların üstünde tepkimelerin olumsuz etkileneceği belirtilmiştir (Zhang ve diğ., 2016). Bu iki sekonder metabolitin hücre içindeki ve dışındaki bulunuşlarına yönelik olarak farklı siyanobakteri türleri üzerinde daha fazla karşılaştırmalı çalışmaya gereksinim duyulmaktadır.

Artan ışık düzeyinin *Pseudanabaena* sp.'de hücre içindeki serbest MİB'in hücre dışına salınımını arttırdığı bilinmektedir (Zhang ve diğ., 2016). *Pseudanabaena* sp. ve *Planktothricoides raciborskii* türlerinde yapılan çalışmada, yüksek ışık düzeyinin (60  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) MİB sentaz gen anlatımını % 50 azalttığı, düşük ışık düzeyinin ise (10  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) gen anlatımını % 60 arttırdığı, 25°C'de 72 saat boyunca karanlıkta bekletilen kültürlerde ise gen anlatımının tamamen durduğu tespit edilmiştir (Wang ve diğ., 2011).

Saadoun ve diğ. tarafından yapılan çalışmada (2001) tat ve koku olaylarının meydana geldiği dönemde çevresel örneklerden izole edilen ve laboratuvar ortamında Geosmin sentezlediği gözlemlenen *Anabaena* sp. örnekleri üstünde sıcaklık, ışık, azot, fosfor ve bakır gibi parametrelerin Geosmin miktarına etkisi incelenmiştir. 20°C sıcaklık ve 17  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık şiddeti altında en yüksek Geosmin/biyokütle oranına ulaşılmıştır. Sıcaklık koşulları sabit tutulup ışık seviyesi artırıldığında Geosmin'in azaldığı, ışık koşulları sabit tutulup sıcaklık artırıldığında ise Geosmin sentezinin baskılandığı görülmüştür. Kültür ortamında nitrat azotu artışı klorofil-a içeriğini artırırken Geosmin sentezinde azalma görülmüş, nitrat azotu yüksek konsantrasyonda olduğunda ise Geosmin sentezi durmuştur. Fosfat fosforunun 118  $\mu\text{g/l}$ 'nin altındaki miktarda

uygulandığı koşullarda ve bundan bağımsız şekilde 6,92 µg/l üstünde Bakır (Cu<sup>2+</sup>) uygulanan koşullarda Geosmin gözlenmemiştir.

Diğer yandan, çevresel koşulların sabit tutulduğu durumlarda biyosentez süreci etkilenmese de metabolitlerin hücre dışına salınımının farklı olduğu bilinmektedir. Wu ve Jüttner (1988) tarafından yapılan çalışmada, Geosmin ve MİB'in aynı kültür koşullarında tutulan *Oscillatoria tenuis* türünde hücre dışına farklı miktarda salındığı tespit edilmiştir. Aynı ortamda görülebilen ve aynı anda sentezlenebilen bu metabolitler, hücre dışına aynı oranda salınmadığından, özellikle çevresel örneklerde yapılan kimyasal analizlerde her iki metabolitin ölçüm yapılan zamanda hücre dışındaki miktarlarının tayini yanıltıcı bilgiler verebileceği için MİB ve Geosmin miktar tayini için ekstraksiyon sırasında hücre parçalanmasını sağlayan yöntemler kullanılarak toplam konsantrasyon tespit edilebilir.

### **2.3.7. Sularda Geosmin ve MİB Kaynağının Belirlenmesi**

Geosmin ve MİB çok farklı canlı grupları (**Tablo 2.5**) tarafından sentezlenebildiğinden bu metabolitlerin kaynağının tespiti için belirlenecek yöntemler, elde edilecek sonuçların güvenilirliğini doğrudan belirlemektedir.

**Tablo 2.5:** Geosmin veya MİB ürettiği bilinen canlı grupları<sup>19</sup>.

ÜST ALEM	ALT GRUP	CİNS
PROKARYOTLAR (BAKTERİLER)	Siyanobakteriler (Alt alem: Negibacteria, Şube: Cyanobacteria, Sınıf: Cyanophyceae)	<i>Anabaena, Aphanizomenon, Calothrix, Coelosphaerium, Cylindrospermum, Dolichospermum, Fischerella, Geitlerinema, Gloeotrichia, Heteroleibleinia, Hyella, Kamptonema, Leibleinia, Leptolyngbya, Lyngbya, Microcoleus, Nostoc, Oscillatoria, Phormidium, Planktothricoides, Planktothrix, Plectonema, Pseudanabaena, Spirulina, Symploca, Symplocastrum, Synechococcus, Trichormus, Tychonema</i>
	Proteobakteriler (Şube: Proteobacteria, Sınıf: Delta Proteobacteria)	<i>Myxococcus, Stigmatella</i>
	Aktinobakteriler (Şube: Actinobacteria)	<i>Streptomyces, Nocardia</i>
ÖKARYOTLAR	Amipler (Şube: Amoebozoa, Sınıf: Discosea)	<i>Vannella</i>
	Mantarlar (Alem: Fungi)	<i>Penicillium (Şube: Ascomycota), Chaetomium (Şube: Ascomycota), Cortinarius (Şube: Basidiomycota)</i>
	Bitkiler (Alem: Plantae)	<i>Symphyogyna (Alt alem: Viridiplantae, Şube: Marchantiophyta), Beta vulgaris (Alt alem: Tracheobionta, Şube: Magnoliophyta)</i>

Doğada çok düşük miktarda bulduklarından bu miktarların doğru teşhisi zor olabilmektedir. Geosmin ve MİB gibi uçucu organik bileşiklerin tespitinde kullanılan yaygın yöntemlerden biri katı faz mikroekstraksiyon gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (HS-SPME GC-MS) yöntemidir. Ancak, yaygın olarak kullanılan ekstraksiyon yöntemleriyle hücre zarına tutunmuş halde bulunan metabolitlerin geri kazanımlarının düşük olması (Watson ve diğ., 2016) nedeniyle kimyasal ölçümler

<sup>19</sup> (Hayes ve diğ., 1991; Spörle ve diğ., 1991; Mattheis ve Roberts, 1992; Lu ve diğ., 2003; Dickschat ve diğ., 2005; Santo-Pietro ve Delgado, 2006; Jüttner ve Watson, 2007 ;Watson ve diğ., 2016; Arnold ve diğ., 2016)

doğadaki miktarları tam olarak yansıtmada yetersiz kalabilmektedir. Ayrıca bu yöntemle yapılan analiz Geosmin ve MİB konsantrasyonunu tayin etmeye yaramakla beraber üretici organizmanın belirlenmesinde etkin değildir.

Geosmin ve MİB üreten canlıların güvenilir şekilde tespiti, bu metabolitlerin üretiminde rol alan biyosentez genlerinin bilgisinden yararlanarak moleküler yöntemlerle tespiti ile yapılabilmektedir. En yaygın kullanılan moleküler yöntemler PZR temelli yöntemlerdir (Suurnäkki, 2015).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu yönteminin su örneklerinde tat-koku sorununun tespiti amacıyla kullanımı ilk kez Cane ve diğ. (2013) tarafından, özellikle içme suyu kaynaklarında ve su ürünleri yetiştiriciliği yapılan sularda mikrobiyal kontaminasyon şüphesi olan durumlarda erken teşhis amacıyla gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmada, geosmin sentaz, 2-metilzoborneol sentaz ve 2-metilgeranil difosfat sentaz enzimlerinin her biri için en az 1 çift primer kullanılarak PZR yöntemiyle kontaminasyonun potansiyel kaynakları olarak siyanobakterilerin ve diğer *Streptomyces*, *Myxococcus*, *Stigmatella*, *Frankia* ve *Saccharopolyspora* gibi bakterilerin tespitinin yapılabileceği bildirilmiştir.

PZR yönteminin çeşitli tipleri mevcuttur ve kullanılan tipe göre çalışmada elde edilen verim oranı değişebilmektedir. Örneğin, gerçek zamanlı PZR (Realttime PCR) ile hızlı ve güvenilir şekilde hedef genlerin ürünleri tespit edilebilmektedir. PZR uygulamasının en önemli avantajı çevresel örneklerde anlık verinin ötesinde potansiyel üretici siyanobakterilerin belirlenmesini sağlayarak geleceğe yönelik veriyi de sağlıyor olmasıdır. Bir su örneğinde Geosmin ve MİB üretiminden sorumlu genlerin tespiti, bu sekonder metabolitlerin üretilme potansiyelinin en önemli göstergesidir. İleri çalışmalar yapılarak, üretici olabilecek canlı grupları (aktinobakteri, siyanobakteri, mantar, bitki vb.) mikroskopik yöntemlerle belirlendikten sonra bu canlılara özgü primerler kullanılarak PZR yapılabilmektedir. Elde edilen PZR ürünleri dizilemeye gönderilerek nükleotit dizilerinin tam içeriği öğrenilebilmektedir. *In silico* ortamda bu diziler daha önce elde edilen verilerle karşılaştırılarak benzerlik oranlarının hesaplanması ile cins/tür düzeyinde üretici varlığı tespit edilmesinde kullanılabilir. Özellikle çevresel örneklerde,

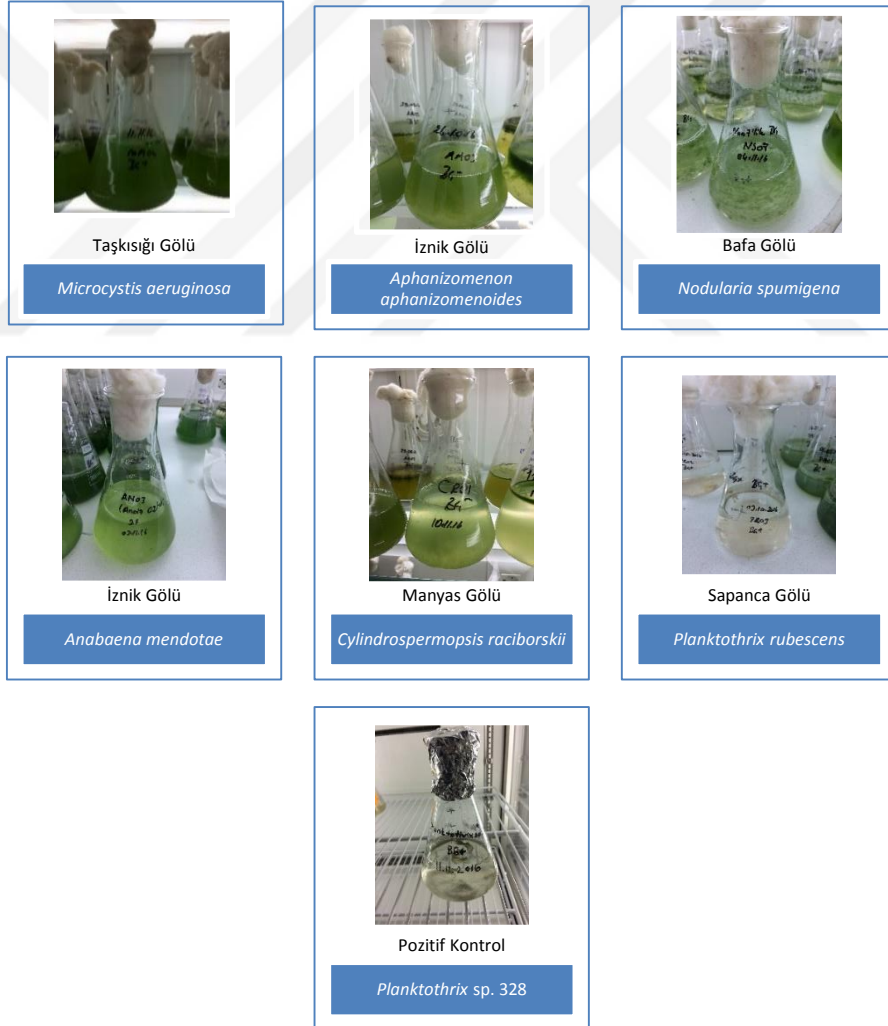
tespit edilen siyanobakteri türlerinden aksenik kültür elde edilmesi durumunda PZR deneyleri kolayca tekrarlanabilmekte ve benzer sonuçların eldesi ile sonuçların güvenilirliği arttırılabilmektedir.

Geosmin ve MİB'in tespitine yönelik yeni teknolojilerin geliştirilmesi konusunda her geçen gün aşama kaydedilmektedir. Örneğin, Stensmyr ve diğ. (2012), *Drosophila melanogaster* ile yaptıkları çalışmada, Geosmin'in tetiklediği özelleşmiş bir koku algılama sisteminin olduğunu tespit etmiştir. İlgili çalışmada, özelleşmiş koku algı sisteminin Geosmin ile birlikte aktifleşerek, konak canlıının beslenme veya yumurtlama için uygun olmadığı sinyali oluşturduğu ve sinekleri konak canlıdan uzaklaştırdığı belirtilmiştir. Evrimsel süreçte Geosmin, aynı zamanda insektisit etkisi bilinen sekonder metabolitlerin üreticisi mantar (Örn: *Penicillium expansum* ) ve bakteriler (Örn: *Streptomyces coelicolor*) tarafından üretilebildiği için *Drosophila melanogaster*'de bu zararlı biyolojik kaynaklara karşı, tehlike uyarı mekanizması görevi gördüğü bildirilmiştir. Geosmin ve MİB gibi koku yayan maddelerin doğal yollardan algılanması üzerine yapılacak olan buna benzer tüm çalışmalar gelecek yıllarda Geosmin ve MİB kaynaklarının tespitiyle ilgili geliştirilecek olan yeni teknolojilere de model olabilmesi açısından önem taşımaktadır.

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3.1. SİYANOBAKTERİ KÜLTÜRLERİNİN ELDESİ

Siyanobakteri kültür örnekleri (**Tablo 3.1**) İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Temel Bilimler Bölümü İçsular Biyolojisi Anabilim Dalı Alg Kültür Koleksiyonu'ndan sağlandı (**Şekil 3.1**).



**Şekil 3.1:** Çalışmada kullanılan siyanobakteri kültürlerinin genel görünümü.

**Tablo 3.1:** Çalışmada kullanılan siyanobakteri suşları.

CİNS	TÜR	SUŞ	İZOLE EDİLDİĞİ KAYNAK
<i>Microcystis</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	IFCC-MA01	Küçükçekmece Gölü
		IFCC-MA04	Taşkısığı Gölü
		IFCC-MA23	Elmalı Baraj Gölü
		IFCC-MA28	Manyas Gölü
	<i>Microcystis flos-aquae</i>	IFCC-MF01	Küçükçekmece Gölü
	<i>Microcystis wesenbergii</i>	IFCC-MW01	Taşkısığı Gölü
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	PCC 7806	Pasteur Kültür Koleksiyonu
<i>Anabaenopsis</i>	<i>Anabaenopsis elenkinii</i>	IFCC-AE01	İznik Gölü
<i>Anabaena</i>	<i>Anabaena mendotae</i>	IFCC-AM01	İznik Gölü
<i>Aphanizomenon</i>	<i>Aphanizomenon aphanizomenoides</i>	IFCC-AA01	İznik Gölü
<i>Cylindrospermopsis</i>	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	IFCC-CR01	Manyas Gölü
<i>Nodularia</i>	<i>Nodularia spumigena</i>	IFCC-NS03	İznik Gölü
		IFCC-NS05	Bafa Gölü
		IFCC-NS04	Baltık Denizi
<i>Planktothrix</i>	<i>Planktothrix rubescens</i>	IFCC-PRO4	Sapanca Gölü
<i>Cuspidothrix</i>	<i>Cuspidothrix issatschenkoi</i>	NIVA CYA 711	Norveç Su Araştırma Enstitüsü Kültür Koleksiyonu
<i>Aphanizomenon</i>	<i>Aphanizomenon gracile</i>	NIVA CYA 676	
<i>Phormidium</i>	<i>Phormidium</i> sp.	NIVA CYA 7	

PZR deneyleri için referans organizma olarak daha önceki çalışmalarda Geosmin ve MİB PZR sonuçları pozitif çıkan *Planktothrix* sp. 328 suşu (Suurnäkki ve diğ., 2015) Prof. Dr. Kaarina Sivonen'den (Helsinki Üniversitesi) sağlandı. Çalışmada aksenik olmayan monokültür örnekleri kullanıldı.

### 3.1.1. Kültür Ortamlarının Hazırlanması

Çalışmada kullanılan ve siyanobakterilerin gelişimleri için gereken en uygun bileşenleri içeren BG-11 ve Z8 kültür ortamı içerikleri **Tablo 3.2** ve **Tablo 3.3**'te gösterilmiştir.

**Tablo 3.2:** BG-11 tipi besiyeri bileşenleri ve miktarları<sup>20</sup>.

BG-11 Bileşenleri	Miktar	*Eser Element Karışımı Bileşenleri	Miktar
Sodyum nitrat	1,5 g	Borik asit	2,86 g
Di-potasyum hidrojen fosfat	40 mg	Mangan (II) klorür tetrahidrat	1,81 g
Magnezyum sülfat heptahidrat	75 mg	Çinko sülfat heptahidrat	0,22 g
Kalsiyum klorür dihidrat	36 mg	Sodyum molibdat dihidrat	0,39 g
Sitrik asit	6 mg	Bakır (II) sülfat penta hidrat	0,079 g
Ferrik amonyum sitrat	6 mg	Kobalt (II) nitrat heksahidrat	0,049 g
EDTA	1 mg	Distile su	1 litre
Sodyum Karbonat	20 mg		
Eser element karışımı*	1 ml		
Distile su	1 litre		

<sup>20</sup> (Anon., 1995)

**Tablo 3.3:** Z8 tipi besiyeri bileşenleri ve miktarları<sup>21</sup>.

Z8 Bileşenleri	Miktar	**Eser Element Karışımı Bileşenleri	Miktar
Sodyum nitrat	0,467 g	Borik asit	3,1 g
Magnezyum sülfat heptahidrat	0,25 g	Mangan (II) sülfat tetrahidrat	2,23 g
Kalsiyum nitrat tetrahidrat	59 mg	Çinko sülfat heptahidrat	0,22 g
Amonyum klorür	31 mg	Amonyum molibdat tetrahidrat	0,088 g
Sodyum karbonat	0,02 g	Kobalt (II) nitrat hegzahidrat	0,146 g
Demir-EDTA solüsyonu*	10 ml	Vanadium oksit sülfat hegzahidrat	0,054 g
Eser Element Karışımı**	1 ml	Alüminyum potasyum Sülfat dihidrat	0,474 g
Distile su	1 litre	Amonyum nikel (II) sülfat hegzahidrat	0,198 g
<b>*Demir-EDTA Solüsyonu Bileşenleri</b>	<b>Miktar</b>	Kadmiyum nitrat tetrahidrat	0,154 g
<b>Solüsyon A</b>		Krom (III) nitrat heptahidrat	0,037 g
Demir(III) klorür	2,8 g	Sodyum tungstat dihidrat	0,033 g
Hidroklorik asit (0,1 Normal)	100 ml	Potasyum bromür	0,119 g
<b>Solüsyon B</b>		KI	0,083 g
EDTA-di sodyum tuzu	3,9 g	Distile Su	1 litre
Sodyum Hidroksit (0,1 Normal)	100 ml		

<sup>21</sup> (Anon., 1995)

Bu besi ortamları 121°C’de, 1,2 atmosfer basınç altında 15 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra siyanobakteri kültürlerinin ekimi için kullanıldı.

### 3.1.2. Kültür Koşulları ve Örneklerin Saklanması

Siyanobakteri kültürleri 25°C’de 12/12 saat aydınlık/karanlık koşulları altında inkübe edildi. Yirmi günlük kültürler, 12000 devir/dk hızda 10 dakika santrifüj edildikten sonra liyofilizatörde kurutuldu ve -20°C’de analiz anına kadar saklandı.

### 3.2. ÇEVRESEL ÖRNEKLERİN ELDESİ

Çevresel örnekler (**Tablo 3.4**) İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Temel Bilimler Bölümü İçsular Biyolojisi Anabilim Dalı tarafından sağlandı.

**Tablo 3.4:** Çalışmada kullanılan çevresel örnekler.

No.	Örneğin Alındığı Yer	Bulunduğu Havza	Örnekleme Dönemi (ay)
1	İznik Gölü (Bursa)	Marmara	Mayıs 2012*, Temmuz-Ağustos*-Eylül 2015
2	Küçükçekmece Gölü (İstanbul)		Eylül 2007*
3	Elmalı Baraj Gölü (İstanbul)		Eylül 2010*
4	Ömerli Baraj Gölü (İstanbul)		Mayıs 2015, Temmuz-Ağustos-Eylül-Ekim 2015
5	Ilıca sıcak su kaynağı (Bursa)		Mart 2016
6	Sapanca Gölü (Sakarya)	Sakarya	Ocak 2009*, Ocak-Şubat 2010*, Kasım 2012*, Mart 2013*, Temmuz-Ağustos-Eylül-Aralık 2015, Temmuz 2016, Eylül 2016
7	Taşkısığı Gölü (Sakarya)		Haziran 2014
8	Uluabat Gölü (Bursa)	Susurluk	Haziran-Temmuz-Ağustos-Eylül 2015
9	Manyas Gölü (Balıkesir)		Temmuz-Ağustos 2015
10	Kocaçay ve Orhaneli Çayı (Balıkesir)		Mayıs 2013*

\*: Liyofilize edilmiş örnek

**Tablo 3.4 (Devam):** Çalışmada kullanılan çevresel örnekler.

No.	Örneğin Alındığı Yer	Bulunduğu Havza	Örnekleme Dönemi
11	Alaçatı Baraj Gölü (İzmir)	Küçük Menderes	Nisan 2015*
12	Azap Gölü (Aydın)	Büyük Menderes	Temmuz-Ağustos-Eylül 2015
13	Beyşehir Gölü (Konya)	Konya Kapalı Havzası	Aralık 2009*
14	Kapıkaya Kanyonu (Adana)	Seyhan	Nisan 2016
15	Menzelet Baraj Gölü (Kahramanmaraş)	Ceyhan	Temmuz-Ağustos-Eylül 2015
16	Devegeçidi Baraj Gölü (Diyarbakır)	Fırat-Dicle	Temmuz-Ağustos-Eylül 2015
17	Malatya Günpınar Şelalesi		Nisan 2016, Nisan 2016*
18	Keban Baraj Gölü (Elazığ)		Kasım 2011*

\*: Liyofilize edilmiş örnek

Çevresel örnekler; 2007-2013 yılları arasında siyanobakteri aşırı artışı olan göllerden veya nehirlerden toplandıktan sonra liyofilize edilmiş örnekler, 2015-2016 yıllarında çeşitli su ekosistemlerinden alınıp yoğunlaştırılarak liyofilizatörde kurutulan fitoplankton örnekleri ve Kapıkaya Kanyonu ve Günpınar Şelalesi'nden toplanan *Nostoc* sp. örnekleri olmak üzere üç farklı şekilde elde edildi. (Tablo 3.4). Tüm örnekler, -20°C'de analiz anına kadar saklandı.

### 3.3.MOLEKÜLER ANALİZLER

#### 3.3.1. Nükleik Asit İzolasyonu

Örneklerden nükleik asit izolasyonu için, öncelikle siyanobakteri hücrelerinin yüksek polisakkarit içeriğinin azaltılması, varsa agregat halindeki hücrelerin parçalanması ve

hümik asidin çözünebilir hale getirilmesi gerekmektedir (Srivastava ve diğ., 2007). Bu amaçla, Ksantojenat yöntemi (Tillett ve Neilan, 2000) modifiye edilerek kullanıldı.

Nükleik asit izolasyonu için doğrudan -20°C’de bekletilen liyofilize örnekler (0,2 µm membran filtre kağıdı üstündeki veya pellet şeklinde) kullanıldı. -20°C’den alınan örneklere kimyasal lizisi gerçekleştirmek üzere 1 ml taze hazırlanmış Hücre Parçalama Solüsyonu (XS Buffer) (Tablo 3.5) eklendi. Örnekler siyanobakteri hücre tiplerine bağlı olarak 1-2 saat 70°C’de su banyosunda bekletildi. İnkübasyon sonrası örnekler, 10-30 saniye vorteksle karıştırıldıktan sonra 20 dakika buzda bekletildi. Buzdan alınan örnekler 10 dakika 4 °C 14000 devir/dk hızda santrifüj edildi ve süpernatant başka bir tüpe alındı. Alınan süpernatantla eşit hacimde olacak şekilde fenol / kloroform / izoamilalkol (25:24:1) eklenerek 4°C’de 10 dakika 12000 devir/dk hızda santrifüj yapıldı. Süpernatantlar dikkatli bir şekilde yeni tüplere aktarıldıktan sonra üstlerine aynı hacimde izopropil alkol (% ≥99) ve 1/10 hacim 3M Sodyum asetat eklendi. Örnekler, bir gece -20°C’de bekletildi. 12000 devir/dk hızda 30 dakika 4°C’de santrifüj işlemi sonrası oluşan üst faz uzaklaştırıldı. Pelletin üstüne 1 ml soğuk (0°C) Etanol (% 70) eklendi. 12000 devir/dk hızda 10 dakika 4°C’de santrifüj işlemi sonrası oluşan süpernatant uzaklaştırıldı (Tillett ve Neilan, 2000; Srivastava ve diğ., 2007; Köker, 2016).

**Tablo 3.5:** Hücre parçalama işlemi için kullanılan solüsyon bileşenleri ve miktarları.

XS Buffer Bileşenleri	Stok	Kullanılacak Miktar	Final
Potasyum etil ksantojenat	toz	100 mg	% 1
Amonyum asetat	4 M	2 ml	0,8 M
Tris-HCl	1 M	1 ml	0,1 M (pH 7.4)
EDTA	0,1 M	1 ml	20 mM
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	% 10	1 ml	% 1
Distile Su		4 ml	4 ml
<b>TOPLAM</b>			<b>10 ml</b>

### ***Nükleik Asit Miktarının ve Saflığının Kontrolü***

İzole edilen nükleik asit miktarı ve saflığı, spektrofotometrik yöntemlerle nanodrop cihazında kontrol edildi. Nükleik asitlerin taşıdıkları nükleotitlerin azotlu bazları UV ışığını 260 nm dalga boyunda maksimum düzeyde absorbe etmektedir. Bu nedenle 260 nm'deki absorpsiyon değeri ( $A_{260}$ ) nükleik asitlerin miktarlarının saptanmasında kullanılmaktadır (Arı, 2010).

Çift iplikli DNA molekülü için 1 absorbans değeri ( $A_{260}$ ) 50  $\mu\text{g/ml}$ 'ye, tek iplikli DNA veya RNA için 1 absorbans değeri ( $A_{260}$ ) 40  $\mu\text{g/ml}$ 'ye eşittir. Bu nedenle, çift iplikli DNA miktarı; “ds DNA ( $\mu\text{g/ml}$ )=  $A_{260}$  x sulandırım oranı x 50”; tek iplik DNA veya RNA miktarı, “ss DNA veya RNA ( $\mu\text{g/ml}$ )=  $A_{260}$  x sulandırım oranı x 40”, formülüne göre NanoDrop 2000/2000c programı aracılığıyla hesaplandı (Arı, 2010).

### **3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)**

Bu çalışmada, tüm PZR reaksiyonları için, PZR'nin temel bileşenleri olan, kalıp DNA molekülü, Primer molekül, Polimeraz (*Taq* DNA polimeraz enzimi, Thermo Fisher), Deoksiniükleotit trifosfatlar (dNTP'ler),  $\text{MgCl}_2$  (Magnezyum klorür) ve tampon (*Taq*-Polimeraz tamponu çözeltisi), distile su ve içeren bir karışım hazırlandı.

#### **3.3.2.1.16S rDNA PZR İçin Gereken Ortam Koşulları**

DNA izolasyonu yapılan örneklerde siyanobakteri varlığını tespit edebilmek için 27F/809R primer seti (**Tablo 3.6**) kullanıldı.

**Tablo 3.6:** 16S rDNA PZR için kullanılan primerler, baz içerikleri ve hedef gen.

Primer	Dizi Bilgisi	Ürün Boyutu (bp)	Hedef Gen	Referans
27F (İleri)	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	782	16S rRNA	(Salmon ve Neilan, yayınlanmamış çalışma; Saker ve diğ., 2005)
809R (Geri)	5'-GCTTCGGCACGGCTCGGGTCGATA-3'			

Bütün 16S rDNA-PZR reaksiyonları, 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1x *Taq*-Polimeraz tamponu 0,2 mM dNTP, distile su ve 0,5 pM ileri ve geri primer içeren karışıma 0,2 U *Taq* polimeraz enzimi ilave edilerek hazırlanan reaksiyon karışımı kullanılarak gerçekleştirildi (Saker ve

diğ., 2005). Tüm PZR reaksiyonları için 1-500 ng arasında değişen miktarlarda DNA kullanıldı.

PZR reaksiyonu için gerekli sıcaklık koşulları Saker ve diğ.'nin belirttiği (2005) koşullar modifiye edilerek belirlendi. PZR protokolü, ön denatürasyon (5 dakika boyunca 94°C), 30 döngü şeklinde sırasıyla denatürasyon (20 saniye boyunca 94°C), bağlanma (30 saniye boyunca 55°C), sentez (60 saniye boyunca 72°C) ve son uzama (7 dakika boyunca 72°C) reaksiyonlarının gerçekleşeceği şekilde PZR gerçekleştirildi.

### **PZR Sonuçlarının Elektroforetik Yöntemle Kontrolü**

PZR ürünlerin 780 bç uzunluğunda bir bant görüntüsü vermesi beklendi. PZR ürünleri yükleme tamponu (**Tablo 3.8**) ile karıştırılarak 1x TAE tamponu (**Tablo 3.7**) ve Etidyum bromür (stok 10 mg/l) (Biomatik marka) içeren % 1,5'luk agaroz jele yüklendi.

**Tablo 3.7:** TAE solüsyonu (50X) bileşenleri.

<b>Bileşen adı</b>	<b>Kullanılacak miktar</b>
Tris baz	242 gr
Glasiyal asetik asit	57,1 ml
0,5 M EDTA (pH 8)	100 ml
Distile su	842,9 ml

**Tablo 3.8:** Yükleme tamponu (Loading Dye) (6X) bileşenleri.

<b>Bileşen adı</b>
10 mM Tris-HCl (pH 7.6)
% 0,03 bromophenol blue
% 0,03 xylene cyanol FF
% 60 gliserol
60 mM EDTA

Hazırlanan jel, 10-60 dakika boyunca 60-90V ile elektroforez cihazında yürütüldü. Sonuçlar Infinity marka görüntüleme sistemi ile görüntülendi.

### 3.3.2.2. *Geosmin PZR İçin Gereken Ortam Koşulları*

Geosmin PZR için *Geosmin sentaz* genine bağlanmak üzere 4 farklı primer çifti (**Tablo 3.9**) kullanıldı. Bu primerlere özgün farklı PZR karışımları hazırlandı ve 2 farklı reaksiyon programı belirlendi. PZR karışımında 16S rDNA PZR ile içinde siyanobakteri DNA'sı bulunduğu doğrulanan örneklerden 20-50 ng kullanıldı.

Birinci Geosmin PZR karışımı: 0,2 mM ileri ve geri primer (geo78F/971R ve geo78F/geo982R) kullanılan reaksiyon karışımına 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1x *Taq*-Polimeraz tamponu, 0,2 mM dNTP karışımı, distile su ile 0,4 U *Taq* polimeraz enzimi ilave edildi. Toplamda 20 µl'lik reaksiyon karışımı kullanılarak PZR işlemi gerçekleştirildi. (Suurnäkki ve diğ., 2015).

PZR reaksiyonu için gerekli sıcaklık koşulları Suurnäkki ve diğ.'nin (2015) belirttiği koşullar dikkate alınarak belirlendi. PZR protokolü, ön denatürasyon (2 dakika boyunca 94°C), 30 döngü şeklinde sırasıyla denatürasyon (30 saniye boyunca 94°C), bağlanma (30 saniye boyunca 55°C), sentez (60 saniye boyunca 72°C) ve son uzama (5 dakika boyunca 72°C) reaksiyonlarının gerçekleşeceği şekilde PZR cihazında gerçekleştirildi.

PZR ürünlerinin geo78F/971R primer çifti için 912 bç ve geo78F/geo982R primer çifti için 905 bç uzunluğunda bir bant görüntüsü vermesi beklendi.

İkinci Geosmin PZR karışımı: 0,3 mM ileri ve geri primer (250F/971R ve 288AF/288AR) kullanılan reaksiyon karışımına 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1x *Taq*-Polimeraz tamponu, 0,2 mM dNTP karışımı, distile su ile 1 U *Taq* polimeraz enzimi ilave edildi. Toplamda 20 µl'lik reaksiyon karışımı kullanılarak PZR işlemi gerçekleştirildi (Giglio ve diğ., 2008).

PZR reaksiyonu için gerekli sıcaklık koşulları Giglio ve diğ.'nin (2008) belirttiği koşullar dikkate alınarak belirlendi. PZR protokolü, ön denatürasyon (5 dakika boyunca 95°C), 55 döngü şeklinde sırasıyla denatürasyon (30 saniye boyunca 95°C), bağlanma (30 saniye

boyunca 55°C), sentez (120 saniye boyunca 72°C) ve son uzama (10 dakika boyunca 72°C) reaksiyonlarının gerçekleşeceği şekilde PZR cihazında gerçekleştirildi.

PZR ürünlerinin 250F/971R primer çifti için 743 bç ve 288AF/288AR primer çifti için 288 bç uzunluğunda bir bant görüntüsü vermesi beklendi.

**Tablo 3.9:** Geosmin PZR için kullanılan primerler, baz içerikleri ve hedef gen.

Primer	Dizi Bilgisi	Ürün Boyutu (bç)	Hedef Gen	Referans			
geo78F (İleri)	5'-GCATTCCAAAGCCTGGGCTTA-3'	905	<i>Geosmin sentaz</i>	(Suurnäkki ve diğ.,2015)			
geo982R (Geri)	5'-ATCGCATGTGCCACTCGTGAC-3'						
250F (İleri)	5'-TTCTTCGACGAYCACTTCC-3'	743		<i>Geosmin sentaz</i>	(Giglio ve diğ., 2008)		
971R (Geri)	5'-CCCTYGTTCATGTARCGGC-3'						
288AF (İleri)	5'-AACGACCTGTTCTCCTA-3'	288				<i>Geosmin sentaz</i>	(Giglio ve diğ., 2008)
288AR (Geri)	5'-GCTCGATCTCATGTGCC-3'						

### 3.3.2.3. MİB PZR İçin Gereken Ortam Koşulları

MİB PZR için *MİB sentaz* genine bağlanmak üzere 2 farklı primer çifti (**Tablo 3.10**) seçildi. Bu primerlere özgün farklı PZR karışımları hazırlandı ve farklı reaksiyon programları belirlendi. Her iki PZR için de 20-50 ng arasında 16S rDNA PZR'de içinde siyanobakteri DNA'sı bulunduğu doğrulanmış DNA örnekleri kullanıldı.

Birinci MİB PZR karışımı için: 0,2 mM ileri ve geri primer (MIB3324F/ MIB4050R) kullanılan reaksiyon karışımına 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1x *Taq*-Polimeraz tamponu, 0,2 mM dNTP karışımı, distile su ile 0,4 U *Taq* polimeraz enzimi ilave edildi. Toplamda 20 µl'lik reaksiyon karışımı kullanılarak PZR işlemi gerçekleştirildi (Suurnäkki ve diğ., 2015) .

PZR reaksiyonu için gerekli sıcaklık koşulları Suurnäkki ve diğ.'nin belirttiği (2015) koşullar dikkate alınarak belirlendi. PZR protokolü, ön denatürasyon (2 dakika boyunca 94°C), 30 döngü şeklinde sırasıyla denatürasyon (30 saniye boyunca 94°C), bağlanma (30 saniye boyunca 52°C), sentez (60 saniye boyunca 72°C) ve son uzama (5 dakika boyunca 72°C) reaksiyonlarının gerçekleşeceği şekilde PZR cihazında gerçekleştirildi.

PZR ürünlerinin 726 bç uzunluğunda bir bant görüntüsü vermesi beklendi.

İkinci MİB PZR karışımı için: 2 mM ileri ve geri primer (MIB-Rf/ MIB-Rr) kullanılan reaksiyon karışımına 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1x *Taq*-Polimeraz tamponu, 0,1 mM dNTP karışımı, distile su ile 0,4 U *Taq* polimeraz enzimi ilave edildi. Toplamda 20 µl'lik reaksiyon karışımı kullanılarak PZR işlemi gerçekleştirildi (Wang ve diğ., 2015).

PZR reaksiyonu için gerekli sıcaklık koşulları Wang ve diğ.'nin (2015) koşullar dikkate alınarak belirlendi. PZR protokolü, ön denatürasyon (3 dakika boyunca 94°C), 35 döngü şeklinde sırasıyla denatürasyon (30 saniye boyunca 94°C), bağlanma (30 saniye boyunca 59°C), sentez (60 saniye boyunca 72°C) reaksiyonlarının gerçekleşeceği şekilde PZR cihazında gerçekleştirildi.

PZR ürünlerinin 202 bç uzunluğunda bir bant görüntüsü vermesi beklendi.

**Tablo 3.10:** MİB PZR için kullanılan primerler, baz içerikleri ve hedef gen.

Primer	Primer Baz İçeriği (5' >3')	Ürün Boyutu (bç)	Hedef Gen	Referans
MIB3324F (İleri)	5'-CATTACCGAGCGATTCAACGAGC-3'	726	<i>MİB</i> <i>sentaz</i>	(Suurnäkki ve diğ.,2015)
MIB4050R (Geri)	5'-CCGCAATCTGTAGCACCATGTTGA-3'			
MIB-Rf (İleri)	5'-CGACAGCTTCTACAYCYCCATGAC-3'	202		(Wang ve diğ., 2015)
MIB-Rr (Geri)	5'-CGCCGCAATCTGTAGCACCAT-3'			

### 3.3.3. Dizi Analizi

Çalışmada PZR deneylerinde elde edilen ürünlerin baz içeriklerinin öğrenilmesi için dizileme hizmeti alındı. Dizileme sonuçlarının mevcut dizi bilgileriyle benzerlik yüzdelerinin tespiti, çevrimiçi dizi karşılaştırma aracı BLAST ile gerçekleştirildi (Altschul ve diğ., 1990).so

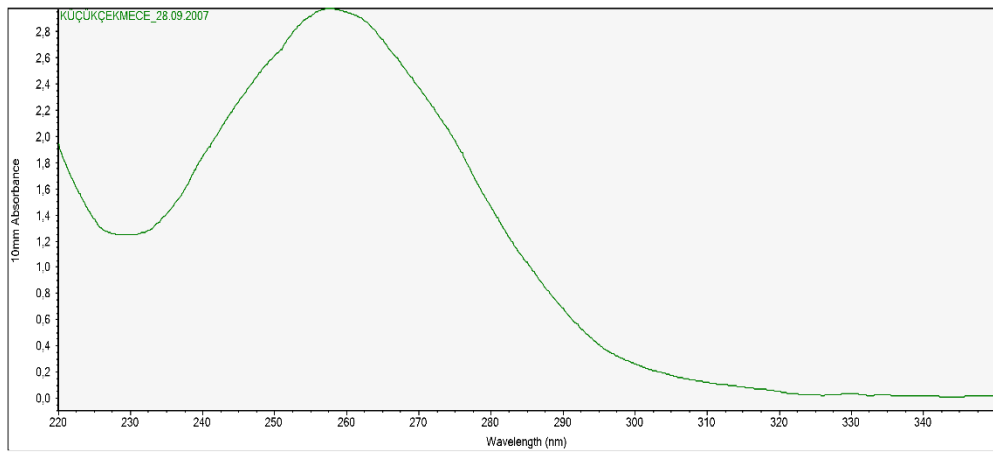
### 3.3.4. Metabolitlerin Miktar Analizi

Çalışmada Geosmin ve MIB konsantrasyonları, Katı Faz Mikro Ekstraksiyonu (SPME) kullanılarak Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (GC-MS) ile Kaloudis ve diğ. (2016)'nin yöntemleri modifiye edilerek ölçüldü. Çevre ve kültür örneklerinden 10 ml alınarak 3,5 gram sodyum klorür (Merck 1.06404.1000  $\geq$ %99,5 NaCl) içeren 20 ml'lik viallere konuldu. 500 devir/dakika hızda 55°C'de 30 dakika boyunca fiber (Supelco 57348-U) kullanılarak ekstraksiyon gerçekleştirildi. Ekstraksiyon bitiminde fiber GC enjeksiyon bölgesine yerleştirildi ve örnek cihaza 250°C'de enjekte edildi. Fiber 15 dakika boyunca enjeksiyon portunda bırakıldı. Ölçümler GC (PerkinElmer Clarus 680) - MS (Clarus SQ 8T) cihazında uzunluğu 30 m, iç çapı 0,25 mm ve film kalınlığı 0,25  $\mu$ m olan kolon (PerkinElmer Elite-5MS N9316282) kullanılarak gerçekleştirildi. GC fırın sıcaklığı 60°C'de başlayarak 260°C'ye 15°C/dakika artacak şekilde getirildi. Hareketli faz olarak Helyum (1 ml/dakika) kullanıldı. MIB ve Geosmin sırasıyla kütle/yük (m/z) oranları 95 ve 112 olan bileşiklerin kolonda alıkonma zamanlarına göre ayırt edildi. Miktar tayini, daha önce Geosmin standardı (Dr. Ehrenstorfer XA14005000ME) ve MIB standardı (Dr. Ehrenstorfer XA15088400ME) ile elde edilen 3 noktalı (5 ng/l, 10 ng/l ve 20 ng/l) kalibrasyon eğrisine göre yapıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1.NÜKLEİK ASİT İZOLASYONU SONUÇLARI

Çevresel örneklerden ve kültür örneklerinden izole edilen nükleik asitlerin miktar ve saflık kontrolü nanodrop cihazında NanoDrop 2000/2000c programı aracılığıyla yapıldı (Şekil 4.1). Çift iplikli DNA konsantrasyonu 20-500 ng/µl arasında olacak şekilde tüm örneklerde PZR öncesi seyreltme yapıldı.  $A_{260}/A_{280}$  oranları 1,1- 2,4 arasında değişti. Pozitif kontrol olarak kullanılan kültür örneğinde de benzer safsızlıkların PZR’de ürün oluşumunu engellemediğinin görülmesi üzerine PZR işlemlerine devam edildi. İzolasyon sonrası nükleik asitler PZR deneylerinde kullanılmak üzere  $-20^{\circ}\text{C}$ ’de saklandı.

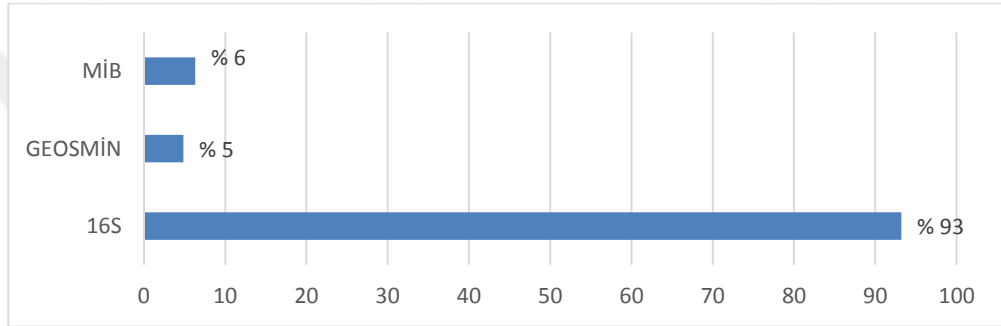


Şekil 4.1: Nükleik asit izolasyonu sonrası saflık ve miktar kontrolü<sup>22</sup>.

<sup>22</sup> Küçükçekmece Gölü Eylül 2007 yılı örneği

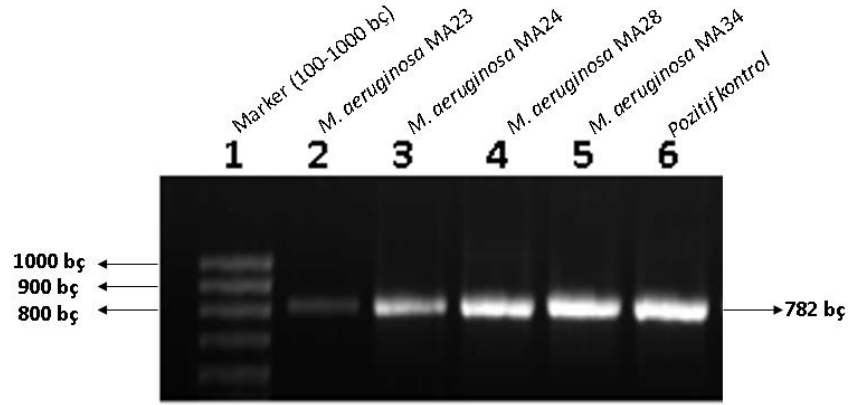
#### 4.2.PZR SONUÇLARI

Çalışmada 206 farklı DNA izolatınının 82 adedi kültür, 124 adedi çevre örneğinden elde edildi. Bu izolatlar sırasıyla 16S rDNA PZR, Geosmin PZR ve MİB PZR analizlerinde kullanıldı. Toplamda 16S rDNA PZR’de 192, Geosmin PZR’de 10 ve MİB PZR’de 13 adet DNA örneği ile ürün elde edildi. Buna göre; izole edilen DNA örneklerinin % 93’ü 16S rDNA PZR, % 6’sı MİB PZR, % 5’i Geosmin PZR ile başarılı bir şekilde çoğaltıldı (Şekil 4.2).



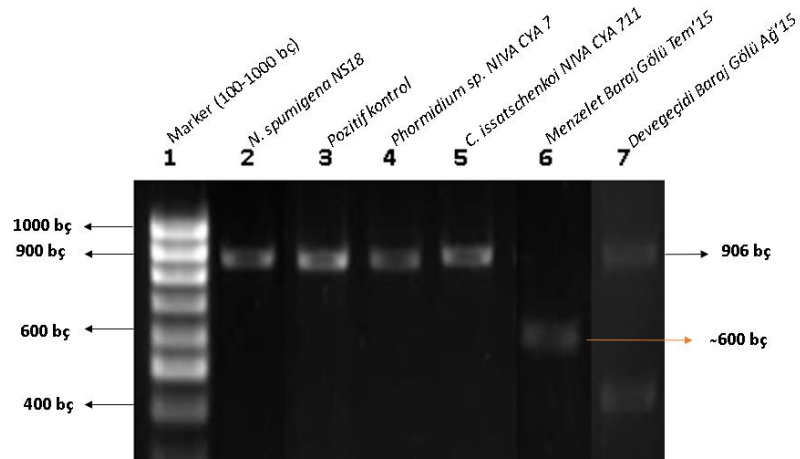
Şekil 4.2: Toplam DNA örneği sayısına göre ürün elde edilen PZR’lerin yüzdeleri dağılımları.

16S rDNA PZR sonucunda ürün elde edilen örneklerde siyanobakteri varlığı doğrulandı (Şekil 4.3). Çevre örneklerinde 124 DNA izolatından 112’sinde ürün elde edildi. 16S rDNA PZR’de ürün elde edilemeyen örneklerden bazıları; Ömerli Baraj Gölü (Eylül), Sapanca Gölü (Eylül), Azap Gölü (Ağustos), Manyas Gölü (Ağustos) ve Uluabat Gölü (Ağustos)’ne ait çevresel örnekler oldu. 16S rDNA PZR sonucunda ürün elde edilebilen örneklerde siyanobakteri var kabul edilerek Geosmin ve MİB PZR analizi yapıldı. 16S rDNA sonuçları negatif olan (PZR ürünü elde edilemeyen) örnekler (Ilıca örneği hariç) Geosmin ve MİB PZR çalışmalarında kullanılmadı.



Şekil 4.3: 16S rDNA PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

Çalışmada Geosmin PZR için pozitif kontrol olarak daha önceki çalışmalarda pozitif sonuç verdiği bilinen *Planktothrix* sp. 328 suşu kullanıldı. Bu suşun tüm PZR çalışmalarında (16S, GEO ve MİB) pozitif sonuç verdiği görüldü. Çalışmada, siyanobakterilerin *geoA* nükleotit dizilerine göre tasarlanmış dört farklı primer seti kullanıldı. Geosmin PZR analizlerinde, pozitif sonuç veren *geo78F/geo982R*, *250F/971R* ve *288AF/288AR* olmak üzere siyanobakterilere özgün şekilde tasarlanmış üç primer seti kullanıldı. Yapılan Geosmin PZR sonucunda sırasıyla yaklaşık 905 bç'lik, 743 bç ve 288 bç'lik ürünler elde edilerek hedeflenen gen bölgeleri çoğaltıldı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: Geosmin PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü<sup>23</sup>.

<sup>23</sup> *geo78F-geo982R* primer seti ile gerçekleştirildi. Menzelet Baraj Gölü PZR ürünü, primer dimerinden daha büyük (>100 bç), hedeflenen ürün boyutuna yakın ve diğer primer çifti (*250F/971R*: 743 bç) ile elde edilen ürüne yakın boyutta olduğundan ileri çalışmalar için önemi olabileceği düşünülerek gösterildi.

Geosmin PZR yapılan kültür örneklerinden 3 farklı cinste ürün elde edildi. Bunlardan *Planktothrix rubescens* PR04 suşunda 250F/971R primer çifti ile *Nodularia spumigena* NS18 suşunda ve *Cuspidothrix issatschenkoi* NIVA CYA 711 suşunda ise geo78F/geo982R primer çifti ile (**Tablo 4.1**) PZR ürünü elde edildi.

**Tablo 4.1:** Çalışma sonucunda potansiyel Geosmin üreticisi olduğu tespit edilen siyanobakteri kültürleri.

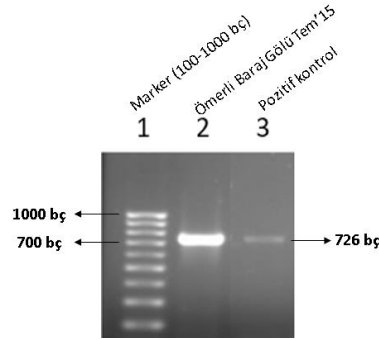
Örnek	Açıklama
<i>Nodularia spumigena</i>	NS18 suşu (Kaynak: Bafa Gölü)
<i>Cuspidothrix issatschenkoi</i>	NIVA CYA 711 suşu
<i>Planktothrix rubescens</i>	PR04 suşu (Kaynak: Sapanca Gölü)

Ürün elde edilen çevre örnekleri; Devegeçidi Baraj Gölü ve Malatya Günpınar Şelalesi (**Tablo 4.2**) örnekleri oldu.

**Tablo 4.2:** Çalışma sonucunda Geosmin gen varlığı tespit edilen çevre örnekleri.

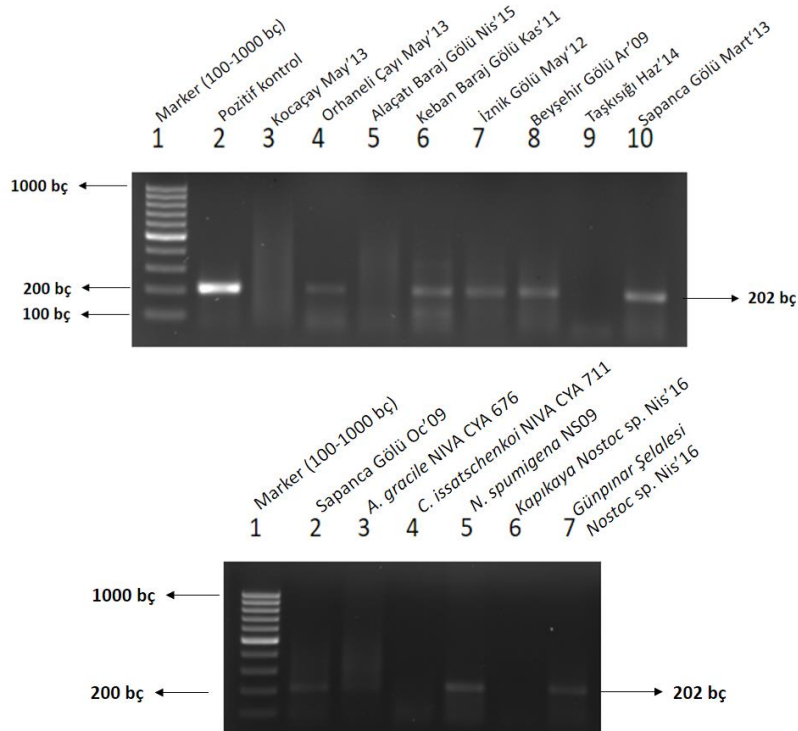
Örnek	Açıklama
Devegeçidi Baraj Gölü	Ağustos 2015 tarihli fitoplankton örneği (Baskın türler: <i>Aphanizomenon</i> sp., <i>Planktolyngbya</i> sp. ve <i>Microcystis aeruginosa</i> )
Malatya Günpınar Şelalesi	Nisan 2016 tarihli su örneği (Baskın tür: <i>Nostoc</i> sp.)

MIB3324F/MIB4050R ve MIB-Rf/MIB-Rr primer çiftleri kullanılarak yapılan MİB PZR çalışmasında kültür örnekleri ve çevresel su örnekleri kullanıldı ve hedeflenen bölgeler çoğaltıldı (**Şekil 4.5** ve **Şekil 4.6**).



Şekil 4.5: MİB PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü 1<sup>24</sup>.

726 ve 202 bazçiftlik PZR ürünleri elde edilerek örneklerde potansiyel MİB üreticisi olan siyanobakterinin varlığı ortaya konmuş oldu.



Şekil 4.6: MİB PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü 2<sup>25</sup>.

Çalışmada 13 adet MİB PZR ürünü elde edildi. MİB PZR'de ürün elde edilen çevre örnekleri; Susurluk Havzası'ndan Orhaneli Çayı örneği, Fırat-Dicle Havzası'ndan Keban

<sup>24</sup> MIB3324F/ MIB4050R primer seti ile gerçekleştirildi.

<sup>25</sup> MIB-Rf/ MIB-Rr primer seti ile gerçekleştirildi.

Baraj Gölü örneği ve Malatya Günpınar Şelalesi örneği, Marmara Havzası'ndan İznik Gölü örneği, Ömerli Baraj Gölü örneği, Sakarya Havzası'ndan Sapanca Gölü örneği ile Konya Kapalı Havzası'ndan Beyşehir Gölü örneği oldu (**Tablo 4.3**).

**Tablo 4.3:** Çalışma sonucunda tespit edilen potansiyel MİB üreticisi bulunan çevre örnekleri.

Örnek	Açıklama
Beyşehir Gölü (Konya)	Aralık 2009 tarihli liyofilize fitoplankton örneği (baskın tür: <i>Aphanizomenon gracile</i> )
Keban Baraj Gölü (Elazığ )	Kasım 2011 tarihli liyofilize fitoplankton örneği (baskın tür: <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> )
İznik Gölü	Mayıs 2012 tarihli liyofilize fitoplankton örneği (baskın tür: <i>Anabaena</i> sp.)
Orhaneli Çayı	Mayıs 2013 tarihli liyofilize fitoplankton örneği (Baskın tür: <i>Lyngbya</i> sp.)
Ömerli Baraj Gölü	Temmuz 2015 tarihli çevresel fitoplankton örneği (Baskın tür: <i>Pseudanabaena limnetica</i> )
Malatya Günpınar Şelalesi	Nisan 2016 tarihli çevresel su örneği (Baskın tür: <i>Nostoc</i> sp.)
Sapanca Gölü	Ocak 2009 ve Mart 2013 tarihli liyofilize fitoplankton örnekleri (Baskın tür: <i>Planktothrix rubescens</i> )

Kültür örneklerinden *Nodularia spumigena* NS09 suşunda (**Tablo 4.4**) MİB PZR ürünü elde edildi.

**Tablo 4.4:** Çalışma sonucunda potansiyel MİB üreticisi bulunan kültür örneği.

Örnek	Açıklama
<i>Nodularia spumigena</i>	NS09 suşu (Kaynak: Bafa Gölü)

Çalışma sonucunda elde edilen 16S rDNA, Geosmin, MİB PZR ve GC-MS sonuçları toplu olarak **Tablo 4.5**'te verilmiştir.

**Tablo 4.5:** 16S rDNA, Geosmin, MİB Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve GC-MS sonuçları.

KÜLTÜR ÖRNEKLERİ						
TÜR	SUŞ	KAYNAK	16S rDNA PZR Sonucu	Geo PZR Sonucu	MİB PZR Sonucu	GC-MS Sonucu (ng/l)
<i>M.aeruginosa</i>	IFCC-MA01	Küçükçekmece Gölü	+	-**	-*	GEO: Tespit edilmedi MİB: 2,89
	IFCC-MA04	Taşkısığı Gölü	+	-	-	Ölçüm Yapılmadı
	IFCC-MA23	Elmalı Baraj Gölü	+	-**	-*	GEO: Tespit edilmedi MİB: 4
	IFCC-MA28	Manyas Gölü	+	-**	-**	GEO ve MİB: Tespit edilmedi
<i>M.flos-aquae</i>	IFCC-MF01	Küçükçekmece Gölü	+	-**	-*	GEO: Tespit edilmedi MİB: 13,74
<i>M.wesenbergii</i>	IFCC-MW01	Taşkısığı Gölü	+	-**	-*	GEO: Tespit edilmedi MİB: 9,01
<i>A.elenkinii</i>	IFCC-AE01	İzник Gölü	+	-	-	Ölçüm Yapılmadı
<i>A.mendotae</i>	IFCC-AM02	İzник Gölü	+	-**	-*	GEO: Tespit edilmedi MİB: 6,95
<i>A.aphanizomenoides</i>	IFCC-AA02	İzник Gölü	+	-**	-**	GEO ve MİB: Tespit edilmedi
<i>C.raciborskii</i>	IFCC-CR01	Manyas Gölü	+	-**	-**	GEO ve MİB: Tespit edilmedi
<i>N.spumigena</i>	IFCC-NS03	İzник Gölü	+	-	-	Ölçüm Yapılmadı
	IFCC-NS05	Bafa Gölü	+	-	-	Ölçüm Yapılmadı

\*: GC-MS sonucu buna zıt sonuçlar içermektedir (+ ise -, - ise +)

\*\* : GC-MS sonuçları bu sonuçları doğrulamaktadır.

**Tablo 4.5 (Devam):** 16S rDNA, Geosmin, MİB Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve GC-MS sonuçları.

KÜLTÜR ÖRNEKLERİ						
TÜR	SUŞ	KAYNAK	16S rDNA PZR Sonucu	Geo PZR Sonucu	MİB PZR Sonucu	GC-MS Sonucu (ng/l)
<i>N.spumigena</i>	IFCC-NS09	Bafa Gölü	+	-**	+**	GEO: Tespit edilmedi MİB: 5,5
	IFCC-NS18	Bafa Gölü	+	+*	-*	GEO: Tespit edilmedi MİB: 1,79
	IFCC-NS04	Baltık Denizi	+	-	-	Ölçüm Yapılmadı
<i>P. rubescens</i>	IFCC-PRO4	Sapanca Gölü	+	+	-	Ölçüm Yapılmadı
<i>M. aeruginosa</i>	PCC 7806	Pasteur Kültür Koleksiyonu	+	-	-	Ölçüm Yapılmadı
<i>Cuspidothrix issatschenkoi</i>	NIVA CYA 711	Norveç Su. Ar. Ens. Kültür Kol.	+	+*	-*	GEO: Tespit edilmedi MİB: 2,27
<i>Aphanizomenon gracile</i>	NIVA CYA 676		+	-	-	Ölçüm Yapılmadı
<i>Phormidium</i> sp.	NIVA CYA 7		+	+**	-*	GEO: 12 µg/l MİB: 400
<i>Planktothrix</i> sp.	328 (pozitif kontrol)	Helsinki Üniversitesi	+	+**	+**	GEO: 480 MİB: 6,5 µg/l
ÇEVRE ÖRNEKLERİ			16S rDNA PZR Sonucu	Geo PZR Sonucu	MİB PZR Sonucu	GC-MS Sonucu (ng/l)
Malatya Günpınar Şelalesi			+	+**	+**	GEO: 553,6 MİB: 2
Devegeçidi Baraj Gölü (Diyarbakır)			+	+*	-	GEO ve MİB tespit edilmedi (Ağ'15)
İznik Gölü (Bursa)			+	-	+	Ölçüm Yapılmadı
Küçükçekmece Gölü (İstanbul)			+	-	-	Ölçüm Yapılmadı
Manyas Gölü (Balıkesir)			+	-	-	Ölçüm Yapılmadı
Kocaçay ve Orhaneli Çayı (Balıkesir)			+	-	+	Ölçüm Yapılmadı

\*: GC-MS sonucu buna zıt sonuçlar içermektedir (+ ise -, - ise +)

\*\*: GC-MS sonuçları bu sonuçları doğrulamaktadır.

**Tablo 4.5 (Devam):** 16S rDNA, Geosmin, MİB Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve GC-MS sonuçları.

ÇEVRE ÖRNEKLERİ	16S rDNA PZR Sonucu	Geo PZR Sonucu	MİB PZR Sonucu	GC-MS Sonucu (ng/l)
Ömerli Baraj Gölü (İstanbul)	+	-**	+**	GEO: Tespit edilmedi MİB:21,31 (Ağ'15)
Sapanca Gölü (Sakarya)	+	-*	+**	GEO: 22,6 MİB:29,82 (Tem'16)
Alaçatı Baraj Gölü (İzmir)	+	-	-	Ölçüm Yapılmadı
Menzelet Baraj Gölü (Kahramanmaraş)	+	-**	-*	GEO: < 1 MİB: 1,37 (Ey'15)
Kapıkaya Kanyonu (Adana)	+	-	-	Ölçüm Yapılmadı
Beyşehir Gölü (Konya)	+	-	+	Ölçüm Yapılmadı
Azap Gölü (Aydın)	+	-	-	Ölçüm Yapılmadı
Elmalı Baraj Gölü (İstanbul)	+	-	-	Ölçüm Yapılmadı
Keban Baraj Gölü (Elazığ)	+	-	+	Ölçüm Yapılmadı
Taşkısığı Gölü (Sakarya)	+	-	-	Ölçüm Yapılmadı
Uluabat Gölü (Bursa)	+	-*	-*	GEO: 2,38 MİB: 10,79 (Ağ'15)
Ilıca sıcak su kaynağı (Bursa)	-	-*	-*	GEO: 493,2 MİB: 85,2 (Mart'16)

\*: GC-MS sonucu buna zıt sonuçlar içermektedir (+ ise -, - ise +)

\*\* : GC-MS sonuçları bu sonuçları doğrulamaktadır.

### 4.3.DİZİLEME ANALİZİ SONUÇLARI

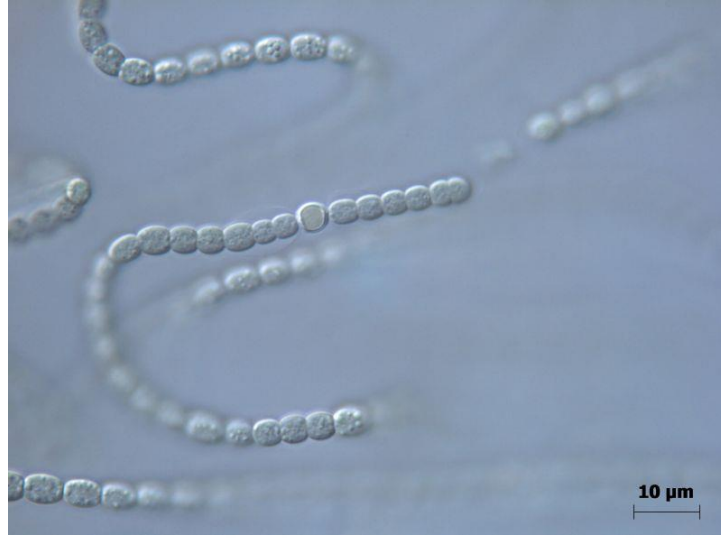
Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden alınan su örneklerinden, MİB ve Geosmin PZR ürünü tespit edilen Ömerli Baraj Gölü ve Malatya Günpınar Şelalesi örnekleri dizi analizine gönderildi. Dizi analizi sonucunda, Ömerli Baraj Gölü örneğinden elde edilen PZR ürünündeki nükleotit dizileri MİB üreticisi olarak bilinen *Pseudanabaena limnetica*'nın (Şekil 4.7) MİB sentaz dizileri ile % 99 benzerlik gösterdi (Altschul ve diğ., 1990). Bu sonuç, potansiyel MİB üreticisi organizmanın bu tür olabileceğini işaret etti.



Şekil 4.7: *Pseudanabaena limnetica* 'nın mikroskop görüntüsü<sup>26</sup>.

Malatya Günpınar Şelalesi'nden alınan örnekte, Geosmin PZR sonucunda hedef gen bölgesinden ürün elde edildi. Elde edilen PZR ürünündeki nükleotit dizilerinin *Nostoc punctiforme*'ye (Şekil 4.8) ait *Geosmin sentaz* genindeki dizilerle % 87 benzerlik gösterdiği görüldü.

<sup>26</sup> (Andrusch, 2003)



**Şekil 4.8:** *Nostoc punctiforme* 'nin mikroskop görüntüsü<sup>27</sup>.

Çalışmada aynı zamanda kültür örnekleri de incelendi. Geosmin üreticisi olduğu bilinen *Phormidium* sp. NIVA CYA 7 (Şekil 4.9) suşunda GC-MS analizi ve Geosmin PZR analizi yapıldı. Böylece hem analitik yöntemlerle geosminin varlığı tespit edildi hem de moleküler yöntemlerle Geosmin PZR ürünü elde edildi. Böylece bu suşun, Geosmin sentaz enzimini kodlayan nükleotit dizilerine sahip olduğu gösterilerek Geosmin üreticisi olduğu analitik ve genetik yöntemlerle doğrulandı.



**Şekil 4.9:** *Phormidium* sp.'nin mikroskop görüntüsü<sup>28</sup>.

<sup>27</sup> (Royal Netherlands Institute for Sea Research NIOZ, 2014)

<sup>28</sup> (Culture Collection of Autotrophic Organisms CCALA, 2008)

Tablo 4.6: Dizileme Sonucu.

Örnek	Hedef Gen	Dizileme sonucu
Ömerli Baraj Gölü	<i>MIB Sentaz</i>	TTTTAAATCCTGATGCAAGCTCGTCATAGCA GACGATTTCTTCCATCCACGCGTCCGTCACG CAGCGTTCCTAGCTGGAACGGCAGTCGTTCT GGTCAACGATCTCCTTTTCGGTTGCCAAAGAT CTGGCAGACGAGCAGCCACCTGTCAACATGG TGCTACAGATTGCGGCAAGG
Malatya Günpınar Şelalesi	<i>Geosmin Sentaz</i>	ACTGTCGTATTAGACGCTACAGGGAGATAGG AGAACAGGTCGTTAAGCACGGCGTTTGTCTA TACCGTACTCCCCTACAGGGAGGGCAACTCA GTGACAGCAGTGTGTCGAACTGGTATAACCG CGAGCTTAACAGTTCGTTGGTCAGGTTAGCTG CCTCTTGGGTACTGATATTCAAGAAGCGCTCC AAAACCAACACGCAGTTGGAATTCTCCCCTTC ATCTTCCACTTCTCTCTGGTAGGAGAACAGGT CGTTTTAGG
<i>Phormidium</i> sp. NIVA CYA 7	<i>Geosmin Sentaz</i>	TAAAGACAGGGAGATTCCAAGTGCAGTGTTG GTTTTGCGAGCCGACTTCTTGAATATCAGTAC CCAAGAGGCAGCTAACCTGACCAACGAACTG TTAAGCTCGCGGTTATACCAGTTCGACAACAC TGCTGTCACTGAGTTGCCCTCCCTGTTTTCGG AGTACGGTATAGACCCCGCAGAGCAGGTAAG CGTTCTGTTATATATCAAGGGACTTCAGGACT GGCAATCTGGGGGTCACGAGTGGCACATGAC AATCGAGCGAACATGAGATCGGGCACATGAA ATCGGGCACATGAGATCGCACACATGACATC GAACACGAG

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sularda tat ve koku problemleri tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de yaygın olarak görülmektedir. Ancak, bu problemin kaynağına yönelik yeterli sayıda çalışma mevcut değildir. Koku eşik değerleri çok düşük olan (ng/l) uçucu organik bileşikler, sulardaki tat ve koku bozulmalarının önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Genellikle GC-MS gibi analitik yöntemler kullanılarak sularda tat ve koku tespiti yapılmaktadır. Ancak, üretici organizmaların tespiti ve bu organizmaların sularda artış potansiyellerinin ve zamanlarının belirlenmesi su yönetimi açısından önemlidir. Üretici ve üretici olmayan organizmalar birlikte bulunabileceğinden, tat ve koku üretiminden sorumlu olanların tespiti için, sorunun kaynağı olan bileşiklerin biyosentezinde kritik rol oynayan enzimleri kodlayan gen bilgisinden yararlanılarak moleküler yöntemlerle üretici organizmaların tespiti sağlanabilmektedir.

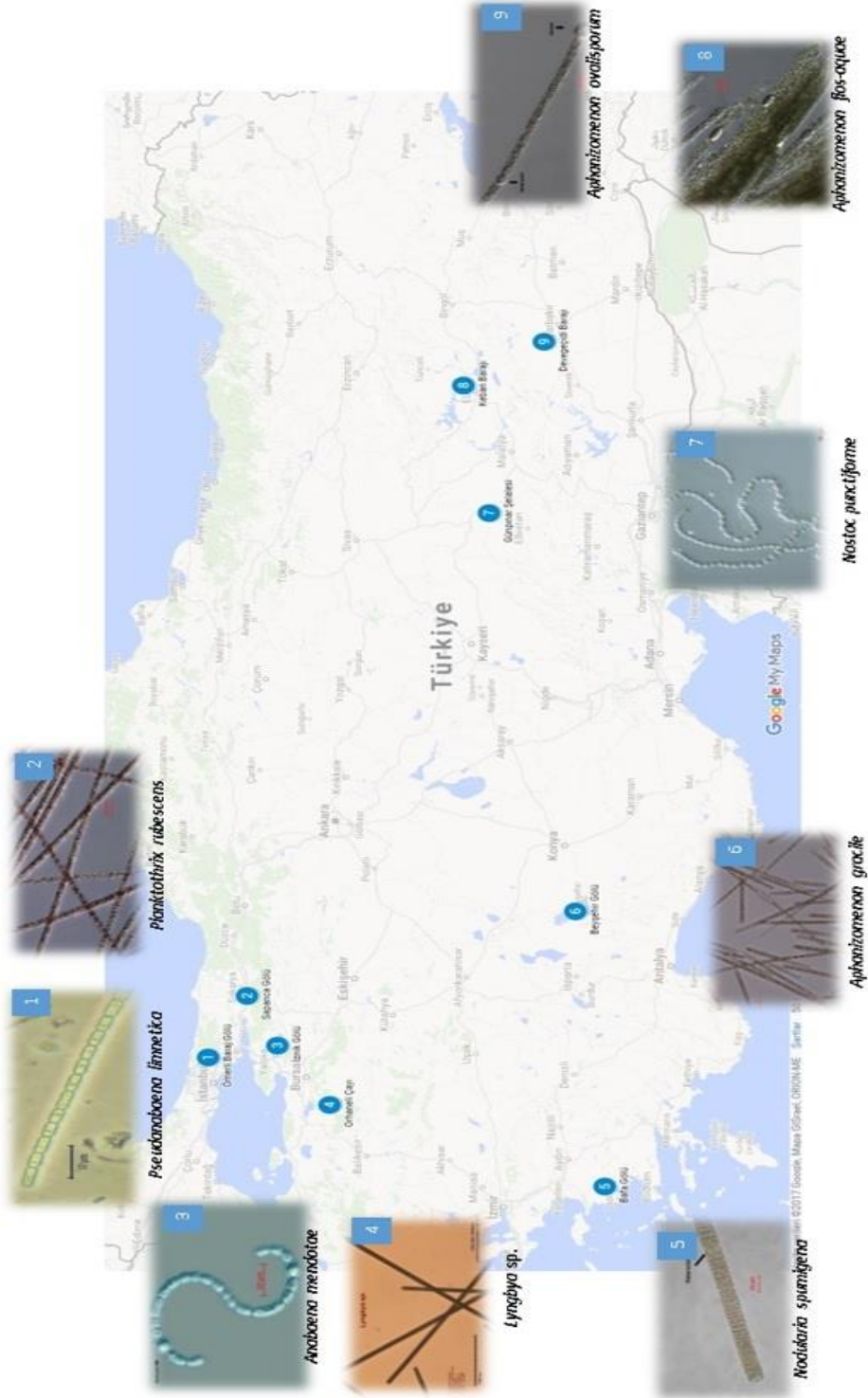
Bu çalışmada, potansiyel Geosmin ve MİB üreticisi siyanobakterilerin varlığı moleküler yöntemler kullanılarak tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, ülkemizde çeşitli göl ve barajlarda tat ve koku problemine yol açabilecek siyanobakterilerin hangi türler olabileceğinin ortaya konabilmesi için öncelikle İçsular Biyolojisi Anabilim Dalı Alg Kültür Koleksiyonu'nda yer alan siyanobakteri suşları incelenmiş ve Geosmin ve MİB üretme potansiyelleri ortaya konmaya çalışılmıştır. İncelenen 46 suştan 3 adedinde *Geosmin sentaz* ve 1 adedinde *MİB sentaz* genlerinin varlığı tespit edilmiştir. Kültür koleksiyonunda bulunan türler üzerinde yapılan çalışmalar, elde edilen sonuç ile ilgili daha net bilgiler sunmaktadır. Bu suşlardan çok azında bu genlerin tespit edilmiş olması kültür koleksiyondaki türlerin çoğunun planktonik türler olmasından kaynaklanıyor olabilir. Literatürde Geosmin ve MİB üreten türler incelendiğinde genellikle bentik siyanobakterilerin baskın olduğu görülmektedir (Watson ve diğ., 2016).

*Geosmin* veya *MİB sentaz* genlerine sahip siyanobakteri türlerinin örneklendiği/izole edildiği alanlar **Tablo 5.1** verilmiş ve **Şekil 5.1'** de gösterilmiştir. Bu alanlar içinde 3 baraj gölü (Ömerli, Devegeçidi ve Keban), 4 doğal göl (İznik, Sapanca, Bafa ve Beyşehir) ve 1 nehir (Orhaneli Çayı) ile Malatya Günpınar Şelalesi bulunmaktadır. Örneklerin

alındığı dönemler genellikle aşırı artış olan dönemler olduğundan baskın siyanobakteriler genellikle tek bir türü içermektedir.

**Tablo 5.1:** *Geosmin* veya *MIB sentaz* genlerine sahip siyanobakteri türlerinin örneklendiği/izole edildiği alanlar.

No.	Bölge Adı	Havza	Su Kütleinin Tipi
1	Ömerli Baraj Gölü	Marmara	Derin, Baraj Gölü
2	Sapanca Gölü	Sakarya	Derin, Doğal Göl
3	İznik Gölü	Marmara	Derin, Doğal Göl
4	Orhaneli Çayı	Susurluk	Akarsu
5	Bafa Gölü	Büyük Menderes	Derin, Doğal Göl
6	Beyşehir Gölü	Konya Kapalı H.	Sığ, Doğal Göl
7	Günpınar Şelalesi	Fırat-Dicle	Şelale
8	Keban Baraj Gölü		Derin, Baraj Gölü
9	Devegeçidi Baraj Gölü		Derin, Baraj Gölü



Şekil 5.1: Türkiye’de tespit edilen potansiyel Geosmin ve MIB üreticisi siyanobakteriler ve buldukları alanlar<sup>29</sup>.

<sup>29</sup> (GoogleMaps, 2017)

Doğal ortamdan alınan örneklerde birden fazla türün bulunması asıl üretici organizmanın hangisi olabileceği konusunda soru işaretleri oluşturmaktadır. Ancak, farklı moleküler teknikler kullanılarak üretici organizma konusunda fikir yürütmek mümkün olabilmektedir. Bu çalışmada Ömerli Baraj Gölü'nden alınan örneklerde siyanobakteri grubundan *Pseudanabaena limnetica*, *Aphanizomenon flos-aquae* ve *Microcystis* sp.'nin baskın olduğu tespit edilmiştir. Literatür incelendiğinde, bu türlerden; *Pseudanabaena limnetica*'nın yaygın olarak bulunan bir MİB üreticisi olduğu, *Aphanizomenon flos-aquae*'nin ise Geosmin sentezleyebildiği, ancak MİB ürettiğine dair bir kayıt bulunmadığı görülmüştür (Suurnäkki ve diğ., 2015). Benzer şekilde *Microcystis* sp., istenmeyen kokuya neden olan bazı bileşiklerin (Örn.  $\beta$ -cyclocitral) doğrudan veya dolaylı yoldan kaynağı olarak görülürken, MİB sentezlediğine dair bir kayıt bulunmamaktadır (Watson ve diğ., 2016). Bu örnekte GC-MS'te yapılan analizde 15 ng/l MİB tespit edilmiştir. Aynı zamanda *MİB sentaz* gen bölgesinin varlığı doğrulanmıştır. PZR ürününün dizileme analizi sonucunda, nükleotit dizilerinin MİB üreticisi olarak bilinen *Pseudanabaena limnetica*'nın *MİB sentaz* dizileri ile % 99 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Buna bağlı olarak, *Pseudanabaena limnetica*'nın Ömerli Baraj Gölü'nde tespit edilen MİB'in potansiyel üreticisi olduğu düşünülmektedir.

Çalışmada moleküler yöntemler kullanılarak 3 farklı siyanobakteri takımında (Nostocales, Oscillatoriales ve Synechococcales) yer alan *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Nostoc*, *Nodularia*, *Cuspidothrix*, *Lyngbya*, *Pseudanabaena*, *Planktolyngbya* ve *Planktothrix* cinslerini içeren kültür veya çevre örneklerinin analizi sonucunda potansiyel Geosmin ve/veya MİB üreticisi olarak tespit edilmiştir. Literatürde *Nodularia* ve *Planktolyngbya* cinslerinin Geosmin-MİB ürettiğine dair moleküler veya analitik veriler bulunmamaktadır. Diğer siyanobakteri türleri ise bilinen Geosmin-MİB üreticileridir (Watson ve diğ., 2016). Bu çalışmada, *Nodularia spumigena* NS09 suşu MİB açısından hem analitik hem de moleküler olarak pozitif sonuç vermiştir. Diğer taraftan, *Planktolyngbya* cinsi çevresel örneklerde diğer siyanobakteri türleri ile beraber bulunmaktadır ve bu nedenle bu iki cinsin tat ve koku üretme potansiyelleri olduğuna dair kesin bir yorum yapmak doğru olmayacaktır. Üretici siyanobakteri olduklarının gösterilmesi için bu türlerin öncelikle kültüre alınması gerekmez. Bu kültürlerin aksenik olduğunun gösterilmesinin ardından analitik ve ileri moleküler yöntemler kullanılarak üretici tür oldukları gösterilebilir.

Çalışmada siyanobakterilerde *Geosmin sentaz* ve *MİB sentaz* genlerinin tespitine yönelik farklı uzunlukta hedef bölgelerine sahip primer setleri kullanılmıştır. Bu primer setlerinden MİB için daha kısa bölgeleri hedefleyen primerler, daha uzun bir bölgeyi çoğaltan primer setleri ile karşılaştırıldığında daha fazla örnekte pozitif sonuç vermiştir. Uzun bölgeyi (726 bç'lik) hedefleyen *MİB sentaz* primer seti ile sadece Ömerli Baraj Gölü'nden alınan örnekte ürün elde edilirken, 202 bç'lik primer seti ile İznik Gölü, Sapanca Gölü, Keban Baraj Gölü, Orhaneli Çayı, Beyşehir Gölü ve Günpınar Şelalesi örneği ile *Nodularia spumigena* NS09 suşunda PZR ürünü elde edilebilmiştir.

Siyanobakterilerde *Geosmin* ve *MİB sentaz* genleri türler arasında değişen oranlarda farklılık gösterebilmektedir (Jørgensen ve diğ., 2016). Farklı primer çiftleri kullanılarak elde edilen sonuçların farklı olmasında, incelenen örneklerdeki siyanobakterilerin *Geosmin sentaz* ve *MİB sentaz* gen bölgesinde, literatürde mevcut nükleotit dizilerine göre genetik farklılık olmasının etkili olabileceği düşünülmektedir. Mevcut dizi bilgilerine göre tasarlanmış uzun bir gen bölgesini hedefleyen primerlerle yapılan PZR deneylerinde ürün alınmazken daha kısa bölgelerin hedeflendiği primerler ile ürün alınabilmesi kısa primerlerin daha küçük bir gen bölgesini çoğaltmasına bağlı olarak daha fazla sayıda siyanobakterinin *MİB sentaz* gen bölgesine bağlanabilmesinden kaynaklanabilir.

Öte yandan, Ömerli Baraj Gölü örneğinde 726 bç'lik *MİB sentaz* ürününün elde edilmiş olması, ülkemizde bulunan tat ve koku problemi yaratan siyanobakterilerin diğer ülkelerde tespit edilen siyanobakteriler ile bu genler açısından benzerlik gösterdiği anlamına gelmektedir. Bu bakımdan, ülkemizde yapılacak olan moleküler çalışmalar, diğer ülkelerde meydana gelebilecek tat ve koku sorunlarının ortaya konmasında da etkili olacak ve elde edilen veriler küresel ölçekte önem arz edecektir.

Çalışmada moleküler yöntemler kullanılarak elde edilen sonuçların doğrulanması için çevre örnekleri (önceki yıllarda alınmış ve kurutulmuş örnekler hariç) ve kültür örneklerinde analitik yöntem kullanılarak *Geosmin* ve *MİB* tespiti de yapılmıştır. Buna göre; çevre örneklerinden Ömerli Baraj Gölü (MİB), Malatya Günpınar Şelalesi (*Geosmin* ve MİB), Ilıca (*Geosmin* ve MİB), Sapanca Gölü (*Geosmin* ve MİB), Menzelet Baraj Gölü (MİB), Uluabat Gölü (*Geosmin* ve MİB) ve kültür örneklerinden *Microcystis* spp.(MİB), *Planktothrix* (*Geosmin* ve MİB), *Anabaena* (MİB), *Nodularia* (MİB),

*Cuspidothrix* (MİB) örneklerinde Geosmin ve MİB tespit edilmiştir. Örneklerin önemli bir bölümünde sonuçlar, insanlar tarafından algılanabilen koku eşik değerinin (10 ng/l) altında olmasına karşın, Günüpınar Şelalesi (Geosmin: 553,6 ng/l) ve Sapanca Gölü (Geosmin: 14,3 ng/l ve MİB: 12,9 ng/l) gibi rekreasyonel ve içme suyu olarak kullanılan sularda yüksek konsantrasyonda Geosmin ve MİB tespit edilmesi, su kaynaklarımızda gelecekte meydana gelebilecek tat ve koku bozulmalarına işaret eden önemli bir bulgu olarak görülmektedir. Ayrıca kültür ortamındaki siyanobakterilerde düşük konsantrasyonda da olsa Geosmin ve MİB tespit edilmesi, bu siyanobakterilerin bulunduğu doğal su kaynaklarımızda potansiyel tat ve koku bozucu organizmalar olabilecekleri anlamına geldiğinden alınabilecek önlemler açısından önem taşımaktadır.

Analitik çalışmalarda Geosmin ve/veya MİB varlığına rastlanan kültür örneklerinden *Microcystis* suşları, *Anabaena mendotae* IFCC-AM02 suşu, *Nodularia spumigena* IFCC-NS18 (MİB PZR negatif)/ IFCC-NS09 (GEO PZR negatif) suşu, *Cuspidothrix issatschenkoii* NIVA CYA 711 suşu ve çevre örneklerinden Menzelet Baraj Gölü, Uluabat Gölü ve Ilıca örneklerinde *Geosmin sentaz* ve *MİB sentaz* geni varlığı tespit edilmemiştir. Bu durumun birden fazla nedeni olabileceği düşünülmektedir:

- Çalışmada incelenen bazı siyanobakteri türlerinin sahip olduğu *Geosmin sentaz* veya *MİB sentaz* geni, dizi bilgisi mevcut siyanobakterilerden farklılık gösterebilir (Jørgensen ve diğ., 2016). Özellikle *Geosmin sentaz* geninin dikey gen transferi (bir türün farklı jenerasyonları arasında gen transferi) şeklinde değil horizontal gen transferi (farklı evrimsel soylar arasındaki genetik değişim) şeklinde gerçekleştiği ve 16s rRNA genleri kadar eski bir evrimsel geçmişe sahip olmadığı düşünülmektedir (Wang ve diğ., 2014). Bu nedenle, genetik çeşitliliğin görülme olasılığı mevcuttur.
- Çalışmada analitik yöntemlerle tespit edilen Geosmin veya MİB siyanobakteri dışında farklı bir organizma grubu tarafından üretilmiş olabilir (Chiu ve diğ., 2016). Örneğin, karasal kaynaklardan suya karışabilen Aktinobakterilerin sucül ekosistemdeki ekolojilerine dair yeterli bilgi bulunmamaktadır. Sucül ortamda, Aktinobakterilerin yalnızca dormant spor durumunda mı veya gelişerek Geosmin veya MİB sentezi yapabilecek durumda olup olmadıklarıyla ilgili tartışmalar günümüzde de devam etmektedir (Asquith ve diğ., 2013).

- 16s rDNA PZR’de ürün edilmemiş çevresel örneklerde PZR inhibisyonuna neden olabilecek bileşikler bulunabilir. Örneğin, Ilıca örneğinde gözlenen yüksek miktardaki kalsiyum karbonat (CaCO<sub>3</sub>), nükleik asitlerin yapısında bozulmalar meydana getirebilmektedir (Schrader ve diğ., 2012).

Moleküler çalışmalarda *Geosmin sentaz* ve *MİB sentaz* geni varlığına rastlanırken aynı örneklerde analitik yöntemlerle Geosmin ve MİB tespit edilmemesinin gen anlatımının baskılanması ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Örneğin; Bafa Gölü’nden izole edilmiş *Nodularia spumigena* IFCC-NS18 suşunda Geosmin PZR ürünü elde edilmiştir. Ancak, GC-MS analizlerinde Geosmin tespit edilmemiştir. Doğal ortamdan kültür ortamına alınan siyanobakterilerde *Geosmin* ve *MİB sentaz* geni anlatımının ortamdaki ekolojik rekabetin azalması gibi çeşitli faktörler nedeniyle baskılanmış olabileceği düşünülmektedir.

*Nodularia spumigena*’nın Geosmin veya MİB üretimi ile ilgili olarak literatür taraması yapılmış ve herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak, bu türün genom haritası çıkarılmış ve genom yapısı incelendiğinde Geosmin sentezleme potansiyelinin olabileceği görülmüştür (Popin ve diğ., 2016). Bu çalışmada, aynı gölden izole edilen iki *Nodularia spumigena* suşundan bir tanesinde (NS18 suşu) *Geosmin sentaz* geni ve diğerinde (NS09 suşu) *MİB sentaz* geni tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, aynı türe ait iki suşun Geosmin ve MİB metabolitlerini üretme potansiyellerinin farklılık gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Diğer yandan, elde edilen sonuçlar *N. spumigena*’nın tat ve koku problemi yaratan bu iki metaboliti üretme potansiyeline dair ilk sonuçlardır.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, yeni veriler ışığında PZR yönteminin çevresel su örneklerinde ve kültür örneklerinde Geosmin ve MİB üreten siyanobakteri tespitinde pratik, güvenilir ve olası tat ve koku problemlerinin belirlenmesi için uygun bir yöntem olarak kullanılabilirliğini göstermektedir.

Türkiye’de potansiyel Geosmin ve/veya MİB üreticisi siyanobakteri tespit edilen su kütlelerinin özelliklerinin (baraj gölü, şelale, dere, sığ göl ve derin göl) ve kullanım amaçlarının (içme suyu kaynağı, rekreasyonel amaçlı, balıkçılık faaliyetleri vb.) çeşitlilik göstermesi bakımından (**Şekil 5.1**) elde edilen sonuçlar, bu sularda gelecekte

yaşanabilecek tat ve koku sorunlarının yönetimi açısından önem taşımaktadır. Ayrıca, Geosmin ve MİB ile ilgili henüz çalışma yapılmamış diğer su kaynaklarımızla ilgili yapılacak moleküler çalışmaların hem ülkemiz hem de diğer ülkelerdeki sularda meydana gelen tat ve koku sorununun çözümünde önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.



## KAYNAKLAR

- Akçaalan, R., 2008, 21. yüzyılda içsularda ortaya çıkan en önemli sorun; Toksik mavi-yeşil algler, SÜMDER Dergisi, 33-34, 68-70.
- Albay, M., Akcaalan, R., Aykulu, G., Tufekci, H., Beattie, K. A. ve 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(1), 67-78, doi: <https://doi.org/10.1127/1864-1318/2003/0109-0067> .
- Alkam, F., AL-Taee, M. M. ve Alghanmi, H., 2015, Effect of different concentrations of nitrate and phosphate on Geosmin and 2-Methylisoborneol production by some species of cyanobacteria, *AL-Qadisiya Journal For Science*, 19(4), ISSN: 1997-2490.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D. J., 1990, Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, 215, 403-410.
- Andrusch, T., 2003, *Pseudanabaena limnetica (TS Weida, VS Pisselsmühle) görseli*, (IWU GmbH).
- Anonim, 1995, *CyanoCite adlı internet sitesi*, Biological Sciences of Purdue University and Wichita State University, <http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/>, [Ziyaret tarihi: 18.01.2017].
- Anonim, 2017, *Siyanobakteri hücresi şematik gösterimi*, Cronodon, BotRejectsInc, [www.cronodon.com](http://www.cronodon.com), [Ziyaret tarihi: 17.01.2017].
- Arı, Ş., 2010, *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler-1 Ders Notu*, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul.
- Arnold, N., Palfner, G., Kuhnt, C. ve Schmidt, J., 2016, Chemistry of the earthy odour of basidiomata of *Cortinarius hinnuleus* (Basidiomycota, Agaricales). *Österr. Z. Pilzk.* 25, 5-10.
- Asquith, E. A., Evans, C. A., Geary, P. M., Dunstan, R. H., Cole, B., 2013, The role of Actinobacteria in taste and odour episodes involving geosmin and 2-methylisoborneol in aquatic environments, *Journal of Water Supply: Research and Technology*, 62(7), 452-467.
- Bellinger, E. G. ve Sigeo, D. C., 2010, Introduction to Freshwater Algae, *Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators*, Chichester, UK: John Wiley ve Sons Ltd., 1-40, Online ISBN: 9780470689554.

- Bozkurt, Ö., 2006, Koku Fizyolojisi, *Online Kozmetoloji Dergisi*, 1 (5).
- Brookes, J. C., Horsfield, A. ve Stoneham, A., 2009, Odour character differences for enantiomers correlate with molecular flexibility, *Journal of the Royal Society Interface*, 6(30), 75-86.
- Bryant, D. A., 1994, *Advances in Photosynthesis: The Molecular Biology of Cyanobacteria*, Springer Netherlands, Online ISBN: 978-94-011-0227-8.
- Burgos, L., Lehmann, M., Simon, D., Andrade, H. H. de, Abreu, B.R. de, Nabinger, D.D., Grivicich, I., Juliano, V.B., Dihl, R.R., 2014, Agents of Earthy-Musty Taste and Odor in Water: Evaluation of Cytotoxicity, Genotoxicity and Toxicogenomics, *Science of the Total Environment*, 15(490), 679-685, doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.05.047.
- Cane, D. E. ve Ikeda, H., 2012, Exploration and mining of the bacterial terpenome, *Acc. Chem Res*, 45(3), 463-472, doi: 10.1021/ar200198d .
- Cane, D., Giglio, S., Jiang, J., Saint, C. P., Monis, P. T., 2013, *Methods of detecting sources of microorganism contamination*, Amerika Birleşik Devletleri, Patent No. US8535883.
- Culture Collection of Autotrophic Organisms (CCALA), 2008, *Phormidium* sp., *Snokhousova et Elster Görseli*, Institute of Botany CAS, Dukelská 135, TŘEBŇ.
- Chiu, Y.T., Yen, H.K. ve Lin, T.F., 2016, An alternative method to quantify 2-MIB producing cyanobacteria in drinking water reservoirs: Method development and field applications, *Environ Res*, 151, 618-627, doi: 10.1016/j.envres.2016.08.034.
- Cooke, G. D. ve Carlson, R. E., 1989, *Reservoir Management for Water Quality and THM Precursor Control*, Kent State University, Water Research Foundation, Proje No: 308.
- Çolakoğlu, G., 1999, *Tohumuz Bitkiler Sitematiği*, Marmara Üniversitesi, İstanbul, Yayın No: 648.
- Deveci, Ö., 2017, *Şikayetvar adlı internet sitesi*, <https://www.sikayetvar.com/> [Ziyaret tarihi: 18.04.2017].
- Dickschat, J. S., 2016, Bacterial terpene cyclases, *Nat. Prod. Rep.*, 33(1), 87-110, doi: 10.1039/c5np00102a.
- Dickschat, J. S., 2017, Fungal volatiles—a survey from edible mushrooms to moulds, *Natural Product Reports*, 34, 310-328, doi:10.1039/C7NP00003K.
- Dickschat, J. S., Bode, H. B., Mahmud, T., Müller, R. ve Stefan Schulz, 2005, A Novel Type of Geosmin Biosynthesis in Myxobacteria, *J. Org. Chem.*, 70(13), 5174–5182, doi: 10.1021/jo050449g.

- Dittmann, E., Gugger, M., Sivonen, K. ve Fewer, D. P., 2015, Natural Product Biosynthetic Diversity and Comparative Genomics of the Cyanobacteria, *Trends Microbiol*, 23(10), 642-652, doi: 10.1016/j.tim.2015.07.008.
- Dokulil, M. T. ve Teubner, K., 2000. Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiologia*, 438, 1-12, doi: 10.1023/A:1004155810302 .
- Dunlap, C. R., Sklenar, K. ve Blake, L., 2015, A Costly Endeavor: Addressing Algae Problems in a Water Supply, *Journal AWWA*, 107, E255-E262, doi: <http://dx.doi.org/10.5942/jawwa.2015.107.0055> .
- Frisvad, J. C., Samson, R., Rassing, B. R., Horst, M. I., Rijn, F.T.J. ve Stark, J., 1997, *Penicillium discolor*, a new species from cheese, nuts and vegetables, *Antonie van Leeuwenhoek*, 72(2), 119–126, doi:10.1023/A:1000244502608.
- Gagné, F., Ridal, j., Blaise, C. ve Brownlee, B., 1999, Toxicological Effects of Geosmin and 2-Methylisoborneol on Rainbow Trout Hepatocytes, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 63(2), 174-180.
- Gerber, N. N., 1969, A Volatile Metabolite of Actinomycetes, 2-Methylisoborneol, *The Journal of Antibiotics*, 22(10), 508-509.
- Gerber, N. N. ve Lechevalier, H. A., 1965, Geosmin, an Earthy-Smelling Substance Isolated from Actinomycetes, *Applied Microbiology*, 13(6), 935-938.
- Giglio, S., 2013, *Advances in the biochemistry and genetics of taste and odour producing cyanobacteria*, Australian Society for Microbiology, A dissertation for the consideration for Fellowship.
- Giglio, S., Chou, W. K., Ikeda, H., Cane, D. E., Monis, P. T., 2011, Biosynthesis of 2-methylisoborneol in cyanobacteria, *Environ. Sci. Technol.*, 45(3), 992-998, doi: 10.1021/es102992p.
- Giglio, S., Jiang, J., Saint, C. P., Cane, D., Monis, P. T., 2008, Isolation and Characterization of the Gene Associated with Geosmin Production in Cyanobacteria, *Environ. Sci. Technol.*, 42(21), 8027–8032.
- Godo, T., Saki, Y., Nojiri, Y., Tsujitani, M., Sugahara, S., Hayashi, S., Kamiya, H., Ohtani, S., Seike, Y., 2017, Geosmin-producing Species of *Coelosphaerium* (Synechococcales, Cyanobacteria) in Lake Shinji, Japan, *Sci. Rep.*, 14 (7), 41928, doi: 10.1038/srep41928.
- GoogleMaps, 2017, *Türkiye Haritası*, <https://www.google.com.tr/maps/place/Türkiye/>, [Ziyaret tarihi: 20.04.2017].
- Gözükırmızı, N., 2013, *Bitki Doku Kültürü Lisans Dersi Notu*, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul.

- Gross, E. M., 2003, Allelopathy of Aquatic Autotrophs, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22(3-4), 313-339, doi: <http://dx.doi.org/10.1080/713610859> .
- Guiry, M. ve Guiry, G., 2017, *AlgaeBase isimli internet sitesi*, <http://www.algaebase.org>, [Ziyaret tarihi: 17.01.2017].
- Hayes, S. J., Hayes, K. P. ve Robinson, B. S., 1991, Geosmin As an Odorous Metabolite In Cultures of A Free-Living Amoeba, *Vannella* Species (Gymnamoebia, Vannellidae), *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 38(1), 44-47, doi: 10.1111/j.1550-7408.1991.tb04798.x.
- İstanbul Su ve Kanalizasyon İdaresi (İSKİ), 2010-2016, *Su Kalite Raporları*, İstanbul.
- Izaguirre, G., Taylor, W. ve Pasek, J., 1999, Off-flavor Problems in Two Reservoirs, Associated with Planktonic *Pseudanabaena* Species, *Water Science and Technology*, 40(6), 85-90, doi: [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(99\)00542-9](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(99)00542-9) .
- Jašić, M., 2009, İzopren Biriminin Kimyasal Yapısı, *Technologija Hrane isimli internet sitesi*, <http://www.tehnologijahrane.com/>, [Ziyaret tarihi: 7.03. 2017].
- Jiang, J., He, X. ve Cane, D. E., 2007, Biosynthesis of the earthy odorant geosmin by a bifunctional *Streptomyces coelicolor* enzyme, *Nat. Chem. Biol.*, 3(11), 711-715, doi: 10.1038/nchembio.2007.29.
- Jørgensen, N. O. G., Podduturi, R. ve Burford, M. A., 2016, Relations between abundance of potential geosmin- and 2-MIB-producing organisms and concentrations of these compounds in water from three Australian reservoirs, *Journal of Water Supply: Research and Technology – Aqua*, 65(8), 504-513, doi: 10.2166/aqua.2016.001.
- Jüttner, F. ve Watson, S. B., 2007, Biochemical and Ecological Control of Geosmin and 2-Methylisoborneol in Source Waters, *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 4395-4406, doi: 10.1128/AEM.02250-06
- Kajino, M. ve Sakamoto, K., 1995, The Relationship Between Musty-Odor-Causing Organisms and Water Quality in Lake Biwa. *Water Science and Technology*, 31(11), pp. 153-158, doi: [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(95\)00470-8](https://doi.org/10.1016/0273-1223(95)00470-8) .
- Kakimoto, M., Ishikawa, T., Miyagi, A., Saito, K., Miyazaki, M., Asaeda, T., Yamaguchi, M., Uchimiya, H., Kawai-Yamada, M., 2014, Culture temperature affects gene expression and metabolic pathways in the 2-methylisoborneol-producing cyanobacterium *Pseudanabaena galeata*, *J. Plant Physiol.*, 171(3-4), 292-300, doi: 10.1016/j.jplph.2013.09.005.
- Kaloudis, T., Triantis, T. M. ve Hiskia, A., 2016, Determination of Geosmin and 2-Methylisoborneol in Water by HS-SPME-GC/MS, in *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis* (eds J. Meriluoto, L. Spoof and G. A. Codd), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, doi: 10.1002/9781119068761.ch59.

- Kilcast, D., 1996, Sensory evaluation of taints and off-flavours, *Food Taints and Off-Flavours*, Springer US, 1-40, Online ISBN: 978-1-4615-2151-8.
- Komárek, J., 2016, A Polyphasic Approach for the Taxonomy of Cyanobacteria: Principles and Applications. *European Journal of Phycology*, 51(3), 346-353, doi: 10.1080/09670262.2016.1163738.
- Komárek, J. ve Johansen, J. R., 2015, Filamentous Cyanobacteria, *Freshwater Algae of North America*, . 2. Ed., Academic Press, 135-235, Boston, ISBN: 978-0-12-741550-5.
- Komárek, J., Kaštovský, J., Mareš, J. ve Johansen, J. R., 2014, Taxonomic Classification of Cyanoprokaryotes (Cyanobacterial Genera), *Preslia*, 86, 295-335.
- Köker, L., 2016, *Küçükçekmece Gölü'nde su ve sedimentteki Microcystis genotiplerinin ve potansiyel toksisitelerinin yıllık değişimi*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Krishnani, K. K., Ravichandran, P. ve Ayyappan, S., 2008, Microbially Derived Off-Flavor from Geosmin and 2-Methylisoborneol: Sources and Remediation, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 2008;194,1-27.
- Kulasooriya, S. A., 2012, Cyanobacteria: Pioneers of Planet Earth, *Ceylon Journal of Science (Bio. Sci.)*, 40(2), 71-88, doi: <http://dx.doi.org/10.4038/cjsbs.v40i2.3925> .
- Kutovaya, O. A. ve Watson, S., 2014, Development and Application of a Molecular Assay to Detect and Monitor Geosmin-Producing Cyanobacteria and Actinomycetes in the Great Lakes, *Journal of Great Lakes Research*, 40(2), 404-414, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2014.03.016>.
- Lee, J., Rai, P. K., Jeon, Y. J., Kim, K., Kwon, E. E., 2017, The role of algae and cyanobacteria in the production and release of odorants in water, *Environmental Pollution*, 227, 252-262, doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.058>.
- Leffingwell, J. C., 2001-2002, MİB'in enantiyomerleri, *Chirality ve Odour Perception*, <http://www.leffingwell.com/chirality/methylisoborneol.htm>, [Ziyaret tarihi: 7.01.2017].
- Legrand, C., Rengefors, K., Fistarol, G. O. ve Granéli, E., 2003, Allelopathy in phytoplankton - biochemical, ecological and evolutionary aspects, *Phycologia*, 42(4), 406-419, doi: <http://dx.doi.org/10.2216/i0031-8884-42-4-406.1> .
- Lu, G., Edwards, C. G., Fellman, J. K., Mattinson, D. S.; Navazio, J., 2003, Biosynthetic Origin of Geosmin in Red Beets (*Beta vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 51(4), 1026-1029, doi: 10.1021/jf020905r.
- Mackey, E. D., Suffet, I. ve Booth, S. D., 2013, *A Decision Tool for Earthy/Musty Taste and Odor Control*, Water Research Foundation, Proje No: 3032.

- Mandal, S. ve Rath, J., 2015, Secondary Metabolites of Cyanobacteria and Drug Development, *Extremophilic Cyanobacteria For Novel Drug Development*, Springer Briefs in Pharmaceutical Science ve Drug Development, 23-43, doi: 10.1007/978-3-319-12009-6\_2.
- Mattheis, J. P. ve Roberts, R. G., 1992, Identification of geosmin as a volatile metabolite of *Penicillium expansum*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(9), 3170–3172.
- Mazard, S., Penesyan, A., Ostrowski, M., Paulsen, I. T., Egan, S., 2016, Tiny Microbes with a Big Impact: The Role of Cyanobacteria and Their Metabolites in Shaping Our Future, *Mar. Drugs*, 14(5), 97, doi: 10.3390/md14050097 .
- Meriluoto, J. (Editor), Spoof, L. (Editor), Codd, G. A. (Editor), 2005, *Hand Book of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*, Åbo Akademi University Press, 576 syf, ISBN: 978-1-119-06868-6 .
- Micallef, M. L., D'Agostino, P. M., Sharma, D., Viswanathan, R., Moffitt, M. C., 2015, Genome mining for natural product biosynthetic gene clusters in the Subsection V cyanobacteria, *BMC Genomics*, 3 (16), 669; doi: 10.1186/s12864-015-1855-z.
- Moss, G. P., 2016, Enzyme Reaction Diagrams, *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, School of Biological and Chemical Sciences, Queen Mary, University of London, London, <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>, [Ziyaret tarihi: 27.01.2017].
- National Center for Biotechnology Information (NCBI), 2017, ID: 903025, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/proteinclusters/>, [Ziyaret tarihi: 27.01. 2017].
- Royal Netherlands Institute for Sea Research (NIOZ), 2014, *Nostoc punctiforme*'nin mikroskop görüntüsü, <https://ccy.nioz.nl/>, [Ziyaret tarihi: 27.01. 2017].
- Ômura, H., Kuwahara, Y. ve Tanabe, T., 2002, 1-Octen-3-ol Together with Geosmin: New Secretion Compounds from a Polydesmid Millipede, *Niponia nodulosa*, *Journal of Chemical Ecology*, 28(12), 2601-2612.
- Pabuççu, K. ve Yücer, T. D., 2017, Oscillatoria Türlerinin Tıbbi Özelliklerinin Araştırılması, *Gaziosmanpasa Journal of Scientific Research*, 6(1), 46-59.
- Paerl, H. ve Otten, T., 2013, Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls, *Microb. Ecol.*, 65(4), 995-1010.
- Ploek, M., Tucker, C. S., Boyd, C. E., 1992, Geosmin and 2-Methylisoborneol Production by Cyanobacteria in Fish Ponds in the Southeastern United States, *Water Science and Technology*, 25(2), 283-290.
- Popin, R. V., Rigonato, J., Abreu, V. A. C., Andreote, A. P. D., Silveira, S. B., Odebrecht, C., Fiore, M. F., 2016, Draft Genome Assembly of the Bloom-Forming

Cyanobacterium *Nodularia spumigena* Strain CENA596 in Shrimp Production Ponds. 4(3).

PubChem Compound Database, 2017, *CID=29746 ve CID= 16913*, National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/>, [Ziyaret tarihi: 11.01.2017].

Rodriguez, I., Fraga, M., Alfonso, A., Guillebault, D., Medlin, L., Baudart, J., Jacob, P., Helmi, K., Meyer, T., Breitenbach, U., Holden, N. M., Boots, B., Spurio, R., Cimarelli, L., Mancini, L., Marchegg, S., 2017, Monitoring of freshwater toxins in European environmental waters by using novel multi-detection methods, *Environmental Chemistry*, 36(3), 645-654.

Saadoun, I. M., Schrader, K. K. ve Blevins, W. T., 2001, Environmental and nutritional factors affecting geosmin synthesis by *Anabaena* sp., *Water Research*, 35(5), 1209-1218.

Saker, M. L. ve diğerleri, 2005, Detection of microcystin synthetase genes in health food supplements containing the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*, *Toxicon*, 46(5), 555-562.

Salmon, T. P. ve Neilan, B. A., Amplification of cyanobacterial small subunit-rRNA from natural assemblages, *Yayınlanmamış veri*.

Santo-Pietro, K. A. ve Delgado, G., 2006, *Microbial Volatile Organic Compounds (MVOC's)*, 4 (4).

Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L. ve Johne, R., 2012, PCR inhibitors – occurrence, properties and removal, *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014-1026.

Schuergers, N., Lenn, T., Kampmann, R., Meissner, M. V., Esteves, T., Temerinac-Ott, M., Korvink, J. G, Lowe, A. R; Mullineaux, C. W., Wilde, A., 2016, Cyanobacteria use micro-optics to sense light direction, *eLife*, 5, e12620, doi: <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.12620.001> .

Sheath, R. G. ve Wehr, J. D., 2015, Introduction to the Freshwater Algae, Second Edition, *Freshwater Algae of North America*, Elsevier Inc., 1-11, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385876-4.09989-8> .

Smith, J. L., Boyer, G. L. ve Zimba, P. V., 2008, A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: Impacts and management alternatives in aquaculture, *Aquaculture*, 280(1-4), 5-20.

Spörle, J., Becker, H., Allen, N. S. ve Gupta, M. P., 1991, Occurrence of (-)-Geosmin and Other Terpenoids in an Axenic Culture of the Liverwort *Symphyogyna brongniartii*, *Zeitschrift für Naturforschung C.*, 46(3-4), 183-188.

Srivastava, A. K., Ara, A., Bhargava, P., Mishra, Y., Rai, S. P., Rai, L. C., 2007, A rapid and cost-effective method of genomic DNA isolation from cyanobacterial culture,

- mat and soil suitable for genomic fingerprinting and community analysis, *Journal of Applied Phycology*, 19(4), 373-382.
- Stensmyr, M. C., Dweck, H. K., Farhan, A., Ibba, I., Strutz, A., L. Mukunda, Linz, J., Grabe, V., Steck, K., Lavista-Llanos, S., Wicher, D., Sachse, S., Knaden, M., Becher, P.G., Seki, Y., Hansson, B. S., 2012, A conserved dedicated olfactory circuit for detecting harmful microbes in *Drosophila*, *Cell*, 151(6), 1345-1357.
- Suffet, I. H., Corado, A., Chou, D., McGuire, M. J., Butterworth, S., 1996, AWWA Taste and Odour Survey, *Journal AWWA*, 88(4), 168-180.
- Sugiura, N., Iwami, N., Inamori, Y., Nishimura, O., Sudo, R., 1998, Significance of Attached Cyanobacteria Relevant to the Occurrence of Musty Odor in Lake Kasumigaura, *Water Research*, 32(12), 3549-3554.
- Suurnäkki, S., 2015, *Anatoxin-a and odorous metabolites in cyanobacteria: molecular detection of the producers*, Department of Food and Environmental Sciences, Division of Microbiology and Biotechnology, University of Helsinki, PhD Thesis.
- Suurnäkki, S., Gomez-Saez, G. V., Rantala-Ylinen, A., Jokela, J., Fewer, D. P., Sivonen, K., 2015, Identification of geosmin and 2-methylisoborneol in cyanobacteria and molecular detection methods for the producers of these compounds, *Water Res.*, 68, 56-66, doi: 10.1016/j.watres.2014.09.037.
- Tabachek, J.-A. L. ve Yurkowski, M., 1976, Isolation and Identification of Blue-Green Algae Producing Muddy Odor Metabolites, Geosmin, and 2-Methylisoborneol, in Saline Lakes in Manitoba, *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 33(1), 25-35.
- Temizkan, G., 1999, *Genetik (II. Moleküler Genetik)*, 1. Baskı, İ.Ü. Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul.
- Tillett, D. ve Neilan, B. A., 2000, Xanthogenate nucleic acid isolation from cultured and environmental cyanobacteria, *Journal of Phycology*, 36(1), 251-258.
- Umay, A., 2007, *Lavandula stoechas, Melissa officinalis ve Tribulus terrestris Bitkilerinin Kimyasal İçeriklerinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı, Adana.
- Uwins, H. K., 2012, *Triggers for Taste and Odour Events: A study of Microbial Production of Geosmin and 2-Methylisoborneol*, Griffith University, Brisbane, PhD Thesis.
- Vilalta, E., Guasch, H., Muñoz, I., Romani, A., Valero, F., Rodriguez, J. J., Alcaraz, R., Sabater, S., 2004, Nuisance Odours Produced by Benthic Cyanobacteria in a Mediterranean River, *Water Science and Technology*, 49(9), 25-31.

- Wang, C. M. ve Cane, D. E., 2008, Biochemistry and molecular genetics of the biosynthesis of the earthy odorant methylisoborneol in *Streptomyces coelicolor*, *J. Am Chem Soc*, 130(28), 8908-9.
- Wang, Z., Shao, J., Xu, Y., Yan, B., Li, R., 2014, Genetic Basis for Geosmin Production by the Water Bloom-Forming Cyanobacterium, *Anabaena ucrainica*, *Water*, 7(1), 175-187.
- Wang, Z., Song, G., Shao, J., Tan, W., Li, Y., Li, R., 2015, Establishment and field applications of real-time PCR methods for the quantification of potential MIB-producing cyanobacteria in aquatic systems, *Journal of Applied Phycology*, 28(1), 325-333.
- Wang, Z., Xu, Y., Shao, J., Wang, J., Li, R., 2011, Genes associated with 2-methylisoborneol biosynthesis in cyanobacteria: isolation, characterization, and expression in response to light, *PLoS One*, 6(4), e18665, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018665> .
- Watson, S. B., 2003, Cyanobacterial and Eukaryotic Algal Odour Compounds Signals or Byproducts – a Review of Their Biological Activity, *Phycologia*, 42(4), 332-350.
- Watson, S. B., Monis, P., Baker, P. ve Giglio, S., 2016, Biochemistry and Genetics of Taste- and Odor-Producing Cyanobacteria, *Harmful Algae*, 54, 112-127.
- Watson, S., Ridal, J. ve Boyer, G., 2008, Taste and Odour and Cyanobacterial Toxins: Impairment, Prediction, and Management in the Great Lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 65(8), 1779-1796.
- Wolk, C. P., 1973, Physiology and cytological chemistry blue-green algae, *Bacteriological reviews*, 37(1), 32-101.
- Wu, J.-T. ve Jüttner, F., 1988, Differential Partitioning of Geosmin and 2-methylisoborneol Between Cellular Constituents in *Oscillatoria tenuis*, *Archives of Microbiology*, 150(6), 580-583.
- Yamada, Y., Kuzuyama, T.; Komatsu, M.; Shin-ya, K., Omura, S., Cane, D.E., Ikeda, H., 2015, Terpene synthases are widely distributed in bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112(3), pp. 857-862.
- Young, W.F., Horth, H., Crane, R., Ogden, T., Arnott, M., 1996, Taste and Odour Threshold Concentrations of Potential Potable Water Contaminants, *Water Research* 30(2), 331-340.
- Zaitlin, B. ve Watson, S. B., 2006, Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: myths, tenets and truths, *Water Research*, 40(9), 1741-1753.
- Žak, A. ve Kosakowska, A., 2016, Cyanobacterial and microalgal bioactive compounds the role of secondary metabolites in allelopathic interactions, *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 45(1), 131-143.

- Zhang, T., Li, L., Song, L. ve Chen, W., 2009, Effects of temperature and light on the growth and geosmin production of *Lyngbya kuetzingii* (Cyanophyta), *Journal of Applied Phycology*, 21(3), 279-285.
- Zhang, T., Zheng, L., Li, L. ve Song, L., 2016, 2-Methylisoborneol production characteristics of *Pseudanabaena* sp. FACHB 1277 isolated from Xionghe Reservoir, China, *Journal of Applied Phycology*, 28(6), 3353–3362.



## ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	ZUHAL TUNÇ ZENGİN
Doğum Yeri	BAKIRKÖY
Doğum Tarihi	01.03.1990
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	5347609489
E-Posta Adresi	zuhaltunc@mail.com
Web Adresi	Zuhal_Tunc (Researchgate)



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı	2012

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Su Ürünleri Temel Bilimleri
Programı	İçsular Biyolojisi
Mezuniyet Tarihi	2017

Makale ve Bildiriler	
Tunç, Z., Akcaalan, R., Siyanobakteri Kaynaklı Tat ve Koku Bozulmalarının Moleküler ve Analitik Yöntemlerle Tespiti, 19. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, Sinop, 2017 (Sözlü sunum olarak kabul edilmiştir).	
Gaygusuz, Ö., Aydın, F., Tunç, Z., Serezli, E. E., Oğuz, A., Dorak, Z., Gürevin, C., Akcaalan, R., Poyrazlar Gölü (Sakarya) ve Sır Baraj Gölü (Kahramanmaraş) İçin Tatlısu Süngeri ( <i>Spongilla cf. lacustris</i> ) Kaydı, VII. Limnoloji Sempozyumu, Mersin, 2016.	
Tunç, Z., Akcaalan Albay, R., Köker, L., Albay, M., İçme Sularında Tat ve Koku Problemlerine Yol Açan Siyanobakteri Türlerinin Belirlenmesinde PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Yönteminin Kullanımı, Uluslararası Katılımlı Ulusal Su ve Sağlık Kongresi, Antalya, 2015.	