

**T.C.
NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KIZILIRMAK'TAN İZOLE EDİLEN
SİYANOBAKTERLERİN TOKSİNLERİNİN
BELİRLENEREK BİYOTEKNOLOJİK AÇIDAN
ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan
Neslihan EMİRAOĞLU**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Şahlan Öztürk**

**Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Ocak 2018
NEVŞEHİR**

Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK danışmanlığında Neslihan EMİRAOĞLU tarafından hazırlanan “Kızılırmak’tan İzole Edilen Siyanobakterlerin Toksinlerinin Belirlenerek Biyoteknolojik Açıdan Öneminin Araştırılması” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

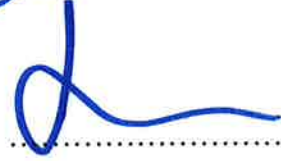
26.01.2018

JÜRİ

Başkan: Prof. Dr. Serkan YILMAZ



Üye: Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK



Üye: Doç. Dr. Zeliha LEBLEBİCİ



ONAY:

Bu tezin kabulü Yönetim Kurulunun **02./02./2018** tarih ve.....**05-42**..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

09./02./2018

Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK
Enstitü Müdürü



TEZ BİLDİRİM SAYFASI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada yer alan bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu ve bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Neslihan EMİRAOĞLU



TEŞEKKÜR

‘‘Kızılırmak’tan izole edilen siyanobakterlerin siyanotoksinlerinin belirlenerek biyoteknolojik açıdan öneminin araştırılması’’ konulu tez çalışmam boyunca kıymetli deneyim ve bilgilerini benimle paylaşan, sabrını esirgmeden sonsuz destek veren çok değerli danışmanım ve hocam sayın Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK’e;

Labaratuvar çalışmalarında çok kıymet verdiğim yardımları için Uzman Enver Ersoy ANDEDEN ve Araştırma Görevlisi Ezgi KESKİN’e;

Tez yazım aşamasında verdiği teknik destekten ötürü kardeşim gibi gördüğüm sevgili Can DURU’ya;

Hayatımın her anında yanımda olan, destekleyen, sabırlarını esirgemeyen her türlü yardımına koşan ve her daim yanımda olacaklarını bildiğim canım ailem; değerli babam Ertuğrul Yaşar DEĞİRMENCİ, sevgili annem Lutfiye DEĞİRMENCİ ve çok sevdiğim canım kardeşim Aslıhan DEĞİRMENCİ’ye;

Hayatımda desteğini hep hissettiğim, sevgisini ve sabrını hiç eksik etmeyen, sonsuz güveniyle her daim güçlü hissettiğim sevgili eşim Hüseyin EMİRAOĞLU ve varlığı ile var olduğum, sonsuz neşe kaynağım, koşulsuz sevgisiyle hayatıma anlam katan, hayatımdaki en büyük zenginliğim olan biricik kızım Elisa EMİRAOĞLU’na;

Sonsuz ve en içten sevgilerimi sunarım.

**KIZILIRMAK'TAN İZOLE EDİLEN SİYANOBAKTERLERİN
TOKSİNLERİNİN BELİRLENEREK BİYOTEKNOLOJİK AÇIDAN
ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI**

(Yüksek Lisans Tezi)

Neslihan EMİRAOĞLU

**NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Ocak 2018

ÖZET

Siyanobakterlerin ürettiği sekonder metabolitler geçmişten günümüze kadar birçok araştırmacının ilgi odağı olmuştur. Özellikle ürettikleri toksinler ve bunların çevreye ve canlılara etkileri çok ciddi boyutlardadır. Bu çalışmada siyanotoksinlerin zararlı etkilerine karşılık bu toksinlerden olumlu anlamda fayda sağlanabilirliği ve biyoteknoloji alanında ticari olarak kullanılabilirliği tartışılarak ortaya konmuştur.

Bu çalışmada Kızılırmak nehrinden izole edilen 31 adet siyanobakter izolatının toksin içerikleri tespit edilmiş olup aynı zamanda izolatların antimikrobiyal ve antioksidan etkileri de incelenmiştir. İzolatların mikrosistin içerikleri ELISA yöntemi ile tayin edilmiştir. Yapılan deneyler sonucu 5 adet izolatta toksin belirlenmiş olup bu izolatlar sırasıyla *Leptolyngbya sp.N2*, *Oscillatoria sp.N38*, *Oscillatoria sp.N53*, *Oscillatoria sp.N71* ve *Oscillatoria sp.N82*'dir. Toksin miktarı en fazla olan izolatın *Oscillatoria sp.N71* olduğu belirlenmiştir. Toksik izolatların DNA'ları izole edildikten sonra 16S rRNA sekanslarına göre tanımlamaları yapılmıştır. Anti mikrobiyal etkileri incelendiğinde toksik olan türlerin yüksek antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiş olup en yüksek antimikrobiyal etkiyi toksin içeriği en fazla olan *Oscillatoria sp.N71* izolatının gösterdiği belirlenmiştir. Antioksidan özellikler incelendiğinde; en yüksek DPPH yakalama aktivitesi *Oscillatoria sp.N38* izolatında (10,27 mg/ml), en yüksek metal şelatlama aktivitesi *Oscillatoria sp.N81* izolatında (464,5 mg/ml), total fenol içeriği en yüksek olan izolatın *Leptolyngbya sp.N2* (341,2 mg/g) olduğu saptanmıştır. Toksin içeren türlerin DPPH radikalini yakalama etkisi ve total fenol içeriğinin yüksek olduğu tespit edilmiş olup bu sonuçlar arasında bir korelasyon olduğu söylenebilir.

Sonuç olarak; çevreyi ve canlıların yaşamını tehdit eden toksik türlerin biyoteknolojik olarak değerlendirmesi yapılmış ve bu türlerin kimyasal ilaçlara alternatif olarak kullanımlarının mümkün olduğu yapılan deneylerle gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Siyanotoksin, antimikrobiyal aktivite, antioksidan aktivite, Oscillatoria sp., ELISA*

Tez danışmanı: Prof. Dr. şahlan Öztürk

Sayfa adedi: 79



**DETERMINATION OF TOXINS OF CYANOBACTERIA ISOLATED FROM
KIZILIRMAK SEA AND INVESTIGATION OF BIOTECHNOLOGICALLY
BASIC**

(M. Sc. Thesis)

Neslihan EMIRAOĞLU

**NEVSEHIR HACI BEKTAS VELI UNIVERSITY GRADUATE SCHOOL OF
NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

January 2018

ABSTRACT

The secondary metabolites produced by cyanobacteria have been the focus of many researchers, from the past to the present day. Particularly the toxins they produce and their effects to the environment and the living organism are very serious. In this study, the harmful effects of cyanotoxins versus the benefit ability of these toxins and the commercial availability in the field of biotechnology were discussed.

In this study, the toxin contents of 31 cyanobacteria isolates which are isolated from the Kızılırmak river, were determined and the antimicrobial and antioxidant effects of the isolates were also determined. The microcystin content of the isolates was determined by ELISA method. After the experiments toxins were determined in 5 isolates and these isolates are *Leptolyngbya* sp. N2, *Oscillatoria* sp.N38, *Oscillatoria* sp.N53, *Oscillatoria* sp.N71, *Oscillatoria* sp.N82, respectively. It was determined that the most toxin amount was found in *Oscillatoria* sp.N71 isolate. After DNA isolation of the toxin isolates, they were identified by their 16S rRNA sequences. When antimicrobial effects are examined, it has been found that toxic species show high antimicrobial activity and as relevant to this it was determined that the highest antimicrobial effect was shown by *Oscillatoria* sp.N71 isolate which has the highest toxin content. When antioxidant properties are examined; the highest DPPH free radical scavenging potential was found in *Oscillatoria* sp.N38 isolate (10,27 mg/ml), the highest metal ions chelating capacity was found in *Oscillatoria* sp.N81 isolate (464,5 mg/ml), the highest total phenolic content was found in *Leptolyngbya* sp.N2 isolate (341,2 mg/g). Toxin-containing species have been found to have a high DPPH free radical scavenging potential and high total phenolic content which can be said that there is a correlation between these results.

As a result, biotechnological evaluation of the toxic species threatening the environment and the life of the living organism has been carried out and experiments have shown to make it possible to use these species as an alternative to chemical drugs.

Keywords: *Cyanotoxin, antimicrobial activity, antioxidant activity, Oscillatoria sp., ELISA*

Thesis supervisor: Assoc. Prof. Dr. Şahlan Öztürk

Page number: 79



İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI:	i
TEZ BİLDİRİM SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
RESİMLER LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	xiv
1.BÖLÜM	1
GİRİŞ	1
2.BÖLÜM	2
GENEL BİLGİLER	2
2.1. Araştırma Bölgesi.....	2
2.2. Siyanobakterlerin Morfolojisi ve Taksonomisi.....	2
2.3. Siyanobakter Toksinleri	6
2.3.1. Siklik Peptitler.....	10
2.3.2. Alkoloitler	15
2.3.3. Silindrospermopsisler.....	17
2.3.4. b-N-metilamino-L-alanin (BMAA)	18
2.3.5. Lipopolisakkarit (LPS) Endotoksinler	18
2.3.6. Dermatotoksik Alkoloitler	19
2.4. Siyanobakterilerin Ürettiği Metabolitler ve Biyoteknolojide Kullanım Alanları	19
2.5. Antioksidan Aktivite	21

2.6. Siyanobakterilerle Yapılan Moleküler Çalışmalar	23
2.7. Siyanotoksinlerin Etkileri.....	24
2.8. Siyanotoksin Belirleme Yöntemleri.....	26
2.8.1. Biyolojik Analizler.....	26
2.8.2. Biyokimyasal Analizler.....	26
2.8.3. Analitik Analizler.....	27
3.BÖLÜM	29
MATERYAL VE YÖNTEM	29
3.1 Materyal	29
3.1.1. Siyanobakter İzolasyonu ve Tanımlanması	29
3.1.2. Çalışmada kullanılan siyanobakter izolatları	29
3.1.3. Siyanobakterlerin Geliştirilmesinde Kullanılan Besiyerleri	30
3.2. Yöntem.....	32
3.2.1. Siyanobakter ekstraktlarının hazırlanması ve muhafazası	32
3.2.2. ELISA Yöntemi ile Toksin Analizi	32
3.2.2.1. Ticari Test Kiti İle İndirek ELISA Analizi	32
3.2.3. Toksik örneklerin 16S rRNA'larına göre tanımlanmaları	34
3.2.4. Antimikrobiyal Aktivite	34
3.2.4.1. Siyanobakter ekstraktlarının hazırlanması:	35
3.2.5. Antioksidan Aktivite	35
3.2.5.1. DPPH Yöntemi	35
3.2.5.2. Metal Şelatlama Aktivitesi.....	36
3.2.5.2.1 Örneklerin Analize Hazırlanması.....	36
3.2.5.3. Total Fenol Miktarı Tespiti	37
3.2.5.4. β -karoten ve Likopen Miktarının Tespiti	37
4.BÖLÜM	38
BULGULAR.....	38

4.1. ELISA Yöntemi ile ekstraktların toksin içeriklerinin belirlenmesi	39
4.2. Toksik örneklerin 16S rRNA'larına göre tanımlanmaları	40
4.3 Antimikrobiyal Aktivite	44
4.4. Antioksidan Aktivite	48
4.4.1. DPPH serbest radikal yakalama etkileri.....	48
4.4.2. Metal iyonlarını şelatlama aktivitesi	49
4.4.3. β -karoten, likopen ve total fenol içeriklerinin belirlenmesi.....	50
TARTIŞMA	52
6.BÖLÜM	60
SONUÇ VE ÖNERİLER	60
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ	78

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.3 Siyanobakter toksinleri, toksinleri üreten cinsler ve toksinlerin etkileri	8
Tablo.2.4 Bazı siyanobakter sekonder metabolitleri ve bu metabolitlerin biyoaktiviteleri	21
Tablo 3.2 Siyanobakter suş kodları ve türleri	29
Tablo 3.3 Siyanobakter besiyerinin içeriği	31
Tablo 4. Siyanobakter suşlarının izole edildiği kaynaklar ve cins adları.....	38
Tablo 4.1 Siyanobakter ekstraktların mikrosistin miktarları.....	39
Tablo 4.2 Toksik izolatların 16S rRNA sekansının NCBI database sonuçlarına göre % homolojisi	41
Tablo 4.3 Mikroalg ekstraktlarının antimikrobiyal etkileri.....	47
Tablo 4.4.1 31 siyanobakter izolatının DPPH IC ₅₀ değerleri (mg/ml).....	48
Tablo 4.4.2 31 Siyanobakter izolatının metal şelatlama aktivitesi için IC ₅₀ değerleri....	49
Tablo 4.4.3 31 siyanobakter izolatının β-karoten, likopen ve total fenol içerikleri	51

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.3.1.1 Microcystin-LR'nin yapısı ve konfigürasyonu	13
Şekil 2.3.1.3 Mikrosistin ve nodularinin yapısı	15
Şekil 2.3.2Anatoksinlerin genel yapıları. Anatoksin-a, homoanatoksin-a ve anatoksin-a(s)	16
Şekil 2.3.3 Silindrospermopsin yapısı	17
Şekil 3.2 4 DPPH Radikali	35



RESİMLER LİSTESİ

Resim 4.2 <i>Leptolyngbya</i> sp.N2 izolatının 100x10x4 büyütmede ışık mikroskobu görüntüsü	41
Resim 4.3 <i>Oscillatoria tenuis</i> N38 izolatının 100x10x4 büyütmede ışık mikroskobu görüntüsü	42
Resim 4.4 <i>Planktothrix rubescens</i> N53 izolatının 100x10x4 büyütmede ışık mikroskobu görüntüsü	42
Resim 4.5 <i>Microcoleus vaginatus</i> N71 izolatının 100x10x4 büyütmede ışık mikroskobu görüntüsü	43
Resim 4.6 <i>Oscillatoria tenuis</i> N82 izolatının 1000x10x4 büyütmede ışık mikroskobu görüntüsü	43

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

°C	Santigrat
mg/L	Miligram/Litre
µg	Mikrogram
mg	Miligram
g	Gram
kg	Kilogram
nm	Nanometre
ppb	milyarda bir
cfu/ml	Koloni forming unit/mililitre
rpm	revolutions perminute/dakikadaki devir sayısı
bp	baz çifti
UV	Ultraviole
O ₂	Oksijen
BG-11	Siyanobakter besi yeri çeşidi
SCF	Sulfactam/cefoperazone
PDA	Potato dekstroz agar
NaNO ₃	Sodyum nitrat
Na ₂ CO ₃	Sodyum karbonat
FeCl ₂	Demir klorür
K ₂ HPO ₄	Dipotasyum hidrojenfosfat
MgSO ₄ .7H ₂ O	Magnezyum sülfat heptahidrat
H ₃ BO ₃	Borik asit
MnCl ₂ .4H ₂ O	Mangan(II)klorür tetrahidrat
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Çinko sülfat heptahidrat
CaCl ₂ .2H ₂ O	Kalsiyum klorür dihidrat
CuSO ₄ .5H ₂ O	Bakır sülfat pentahidrat
NaMoO ₄ .2H ₂ O	Molibidikaist sodyum dihidrat
CO(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	Kobalt(II)nitrat hegzadihidrat
MeOH	Metanol
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
RNA	Ribonukleik asit

rRNA	Ribozomal ribonukleik asit
DNA	Deoksiribonukleik asit
MC	Mikrosistin
CYN	Silindrospermopsin
LPS	Lipopolisakkarit
LD ₅₀	%50 öldürücü konsantrasyon
PSB	Paralitik kabuklu zehirlenmesi
MC-LR	Mikrosistin lösin-arginin
MC-RR	Mikrosistin arginin-arginin
MC-YR	Mikrosistin tirozin-arginin
DPPH	2,2-diphenil-1-picrylhydrazil radikal söndürücü kapasite yöntemi
ORAC	Oksijen radikal absorpsiyon kapasitesi yöntemi
TEAC	Troloks eşdeğer antioksidan kapasite analizi
FRAP	Demir(III) indirgeme antioksidan gücü yöntemi
CUPRAC	Bakır(II) indirgeyici antioksidan kapasite analizi
LDL	Low density lipoprotein
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
ELISA	Emzime bağlı immünosorban yöntem
MIC	Minimum inhibitör konsantrasyon
BHA	Bütillenmiş hidroksianisol
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
Gr (-)	Gram negatif
Gr (+)	Gram pozitif
ark.	Arkadaşları
diğ.	Diğerleri

1.BÖLÜM

GİRİŞ

Siyanobakterler, 16S rRNA ve klorofil-a içeren, karbondioksit ve atmosferik azotu fikse edebilen, fotosentez yapabilen, organik karbon ve oksijen üretebilen tek prokaryot organizma grubudur. Mavi yeşil algler olarak da adlandırılırlar ve çoğu zaman sucul ve karasal habitatlarda yaşarlar, aynı zamanda ekolojik, evrimsel ve ekonomik önemi olan fotosentetik organizmalardır [1, 2].

Kozmopolit bir dağılım gösterirler ve termal kaynaklar ile antarktik gölleri de içeren farklı habitatlarda bulunurlar. Buldukları ortamda pH ve sıcaklık yükselirse ve bununla beraber özellikle fosforlu ve azotlu maddelerin miktarı artarsa siyanobakterler sayılarını hızla arttırarak alg patlamasına (ötrofikasyon) neden olurlar. Ötrofikasyona sebep olan etmenler arasında kentleşme ve tarımsal faaliyetler sonucu suyun kirletilmesiyle beraber küresel ısınma [3] ve herbisitler tarafından suyun kirletilmesi sayılabilir [4]. En yaygın, deniz ve tatlısu çevrelerinin planktonik üyeleri olarak bilinirler. Siyanobakterler, siyanotoksin olarak adlandırılan toksik özelliklere sahip ikincil metabolitlerin sebep olduğu çevresel riskler ve sağlığı tehdit eden etkileri bakımından gittikçe artan bir önem kazanmaktadır. Siyanotoksinler, suyla temas halinde direkt olarak, ya da kontamineli gıdaların tüketimi ile indirekt olarak zehirlenmelere neden olurlar. Siyanotoksin üreticilerinin en yaygın olanları ve en çok çalışılmış olanları: *Microcystis aeruginosa*, *Aphanisomenon flos-aquae*, *Anabaena flos-aquae*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Planktothrix agardhii*, *Lyngbya majuscula*, *Nodularia* ve *Oscillatoria* [5, 6] Siyanobakterilerin ürettiği toksinler deney hayvaları üzerindeki olumsuz etkilerine göre; dermatotoksinler (lipopolisakkaritler, lyngbyatoksin-a, aplysiatoksin), nörotoksinler (anatoksin-a, homoanatoksin-a, anatoksin-a(s), saksitoksin) ve hepatotoksinler (mikrosistin, nodularin, silindrospermopsin) şeklinde üç sınıfta incelenmektedirler [7, 8, 9]. Bu kadar olumsuz etkisi olmasına rağmen bu bakterilerin başka kullanım alanları da mevcuttur. Siyanobakterler farklı enzimlerin inhibisyonu, immunosupresyonu, antiviral, antifungal ve antikanser gibi çeşitli biyolojik aktivite gösteren biyoaktif bileşikleri üretmeleri ile de bilinirler.

2.BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

2.1. Araştırma Bölgesi

Kızılırmak Türkiye topraklarından doğarak yine Türkiye topraklarına denize dökülen en uzun akarsuyumuzdur. Adını akarsu yatağında bulunan, 3.zaman ortalarında çökelmiş kırmızı renkteki kumlu –killi tortudan almıştır. Kızılırmak nehri deniz seviyesinden 910-930m yükseklikte akar. Nehrin uzunluğu 1355 km'dir. Nehir, İç Anadolu'nun en doğusundaki Sivas ilindeki Kızıldağ'ın güney yamaçlarından yaklaşık 39,8' doğu noktasından doğar, ilk önce batı ve güney batıya doğru akar, daha sonra yay şeklinde biçimlenir. Bu noktadan sonra ilk olarak batıya, daha sonra güney batıdaki Tuz Gölü'nün kuzey doğusundan geçerek kuzey batıya akar. Daha sonra kuzey ve kuzey doğuya yönelir. Bu kesimde en büyük kollarından biri olan Delice Irmağı ile 40.47'doğu 34.14' batı noktasında birleşir. Sonra kıvrımlar yaparak kuzeybatıya akar. Bu kesimden sonra 41.10'doğu 34.42' batıdaki Devrez Nehri ile birlikte akar ve kuzey doğuya doğru döner. Bu noktadan sonra aşağı çığırına ulaşılır ve Karadeniz'e 41.72' kuzey 35.95' doğu noktasından boşalır. Bu akışı sırasında sırasıyla Sivas, Kayseri, Nevşehir, Kırşehir, Kırıkkale, Ankara, Çankırı, Çorum ve Samsun illerinden geçerken çok sayıda dere ve çayın sularını toplayarak Bafra Burnu'ndan Karadeniz'e ulaşır [10].

Yağmur ve kar sularıyla beslenen nehrin rejimi düzensizdir. Temmuz ve Şubat arasında düşük su düzeyinde akan nehir, Mart ayında hızla kabarır ve Nisan ayında en yüksek su seviyesine ulaşır. Ortalama debisi 184m küp/sn olan nehrin 35 yıllık gözlem süresince ortalama akımı en az 18,4m küp/sn ve en çok 1,673m küp/sn debiye ulaştığı tespit edilmiştir. Kızılırmak'ın suları yazın alçalarak Ağustos ayında en düşük düzeye iner. Özellikle bazı yıllardaki Temmuz ve Ağustos aylarında debi değeri 10m küp/sn olarak ölçülmüştür [11].

2.2. Siyanobakterlerin Morfolojisi ve Taksonomisi

Siyanobakterler çok eski yaşam formlarıdır ve fosil kayıtları yaklaşık 3,5 milyar yıl önce var olduklarını göstermektedir [12].

Siyanobakterler yeryüzünün ilk fotosentetik mikroorganizmaları olarak kabul edilir ve dünya üzerinde yaklaşık 3,5 milyar yıldır bulunur. Diğer alg grupları arasında prokaryotik yapıda olan tek gruptur. Hücrelerinde plastit çeperi ve çekirdek olmayışı, mitokondri, vakuol ve golgi aygıtı bulunmayışı ve cinsiyet görünmemesinden dolayı bakteriologlar tarafından Cyanobacteria bölümünde sınıflandırılırlar. Fotosistem 1 ve Fotosistem 2'ye sahip olmalarından dolayı fikologlar tarafından Cyanophyta grubunda incelenmektedirler [13, 14, 15].

Hücreleri homojen renkli olup türlere göre mavi yeşil ve menekşe renkleri arasında değişkenlik göstermektedir. Fotosentezin gerçekleştiği çift lamelli tilakoitlerin üzerinde klorofil a pigmenti, lamellerin arasında fikosiyanın ve fikoeritrin gibi fikobiliproteinler bulundurmaktadır. Tilakoidler atmosferdeki azotun fiksasyonunda ve solunumda görev almaktadırlar [13, 16]. Hücre çeperleri pektin ve selülozdan oluşur. Yedek besin maddeleri siyanofisin ve volitindir [17, 13].

Siyanobakterler daha çok tatlı su, tuzlu su ve deniz sularında bulunan fotoototrofik mikroorganizmalardır. İnsan kaynaklı aktiviteler sebebiyle, halen siyanobakteriler aşırı derecede büyüme gösterirler ve toksin üretirler. Ürettikleri toksinler insanlar, hayvanlar ve su organizmaları için yüksek derecede toksik etki gösterir ve bu sebeple dünya çapında ciddi bir endişe haline gelmiştir [18].

Siyanobakterler evrim ağacının en dikkat çekici mikroorganizmalarından bazılarıdır. Siyanobakterlerin ekolojik önemleri bilim dünyasında yaygın olarak kabul görülmektedir [19].

Metabolizmaları yoluyla, biyoyakıtlar ve biyopolimerlerden ilaçlara kadar çeşitli biyoaktif bileşikler üretirler ve bu özelliklerinden dolayı biyoteknoloji alanlarında epey ilgi görmektedirler [20, 21, 22]. Öte yandan çok geniş bir yelpazede sekonder metabolit yani diğer bir deyişle toksin üretirler. Birçok organizma için ispatlanmış olan bu bileşiklerin toksisitesi [19] tüm dünyadaki tatlı su yataklarında bulunan, siyanotoksinlerin birikmesinden kaynaklanan sorunların çözümü için ön plana çıkmaktadır.

Son yıllara kadar bu toksisite konusunun bilinmesine rağmen, özellikle mikroorganizmalar tarafından parçalama/dönüştürme yolu ile gerçekleşen

biyoteknolojik ilaçlara çok az rağbet gösterilmiştir. Buna sebep olarak siyanotoksinlerin kimyasal tepkimeye karşı kırılğan olmaları gösterilebilir [23].

Mavi yeşil alglerin hücre çeperlerinin murein yapıda olması ve azot fikse etme özelliğine sahip özelleşmiş hücrelerin (heterosist) bulunması bakterilere benzeyen özellikleridir. Klorofil-a içermeleri ve oksijenik fotosentez yapmaları da alglerle olan ortak özellikleridir [24].

Genel olarak bir mavi yeşil alg hücresi dıştan içe doğru incelendiğinde; en dışında ince ya da kalın olabilen bir müsilaj tabakası yer alır [25]. Dış kısımda yer alan bu müsilaj tabaka canlının su üstünde asılı kalmasıyla beraber canlının sudan besin sağlamasını ve siyanobakterlerle beslenmek isteyen mikroskobik canlıları uzaklaştırmayı sağlar [26]. Müsilaj tabakanın altında pektin yapıda bir hücre çeperi yer almaktadır. En iç kısmı tamamen plazma ile kaplıdır. Bu plazmanın dış kısmı fikosiyanın adlı bir madde içerir ve bu madde canlının mavi yeşil renkte görünmesini sağlar. Siyanobakter hücrelerinde tilakoid denilen hücre içi zar yapıları bulunur. Fotosentez için gerekli olan klorofil-a ve diğer moleküller bu zara gömülü halde bulunmaktadır [25].

Siyanobakterlerin üremeleri sadece eşeysiz olarak gerçekleşmektedir. Tek hücreli olup olmamalarına ve koloni halinde bulunup bulunmamalarına göre bölünmeleri farklılık göstermektedir. Tek hücreli olanlarda çoğalma hücrenin enine bölünmesiyle gerçekleşirken ipliksi yapıda olanlarda ise ipliğin herhangi bir yerinden koparak iki ayrı ipliksi yapı oluşturmasıyla gerçekleşmektedir. Siyanobakterler uygun olmayan orta koşullarında heterosist, devam hücresi veya hormosist gibi yapılarla devamlılığını sağlar. Koşullar uygun olduğunda ise endospor, egzospor, planokok veya hormogonyum gibi yapılarla çoğalmaktadırlar. Bunların yanısıra nitrogenaz enzimi sayesinde atmosferdeki serbest azotu amanyoğa çevirirler ve bu azot fiksasyonu olayını heterosistleri sayesinde yaparlar [25].

Siyanobakterler içerdikleri fotosentetik pigmentler nedeniyle mavi-yeşil al olarak adlandırılmıştır. Mavi-yeşil algler sıcak su kaynaklarından, Antartika'daki geçici olarak donan su habitatlarına kadar geniş bir yayılım gösteren en eski organizma grubudur [5].

Siyanobakterler diğer bakterilerden fotokimyasal işlemleri yürüten kromatoforların varlığı ile ayrılırlar. Bunlarda renk, fikosiyanın pigmentinden kaynaklanmaktadır.

Bazıları kırmızı renk içerdiğinden kırmızımtırak veya erguvan da görünebilir. Hücrede depo edilen fotosentetik ürün hayvanlardakine benzer bir polisakkarit olan glikojendir.[27] Diğer önemli özelliği ise, oksijen üreterek fotosentez işlemini gerçekleştiren tek prokaryot fototrof organizma olmalarıdır [28]. İpliksi siyanobakterler heterosist adıda hücreler vasıtasıyla havadaki serbest azotu alabilmektedirler. Havadaki serbest azotun alınımı ile de yüksek miktarda H₂ üretmektedirler [28]. Yaklaşık 150 yıl kadar bir süre alglerin özel bir grubu olarak mavi-yeşil algler kavramıyla incelenmiştir. Yapılan moleküler analizler sonucunda siyanobakterlerin prokaryotlardan Gr(-) bakteri grubunda olduğu tespit edilmiştir [28].

Canlıların, özellikle prokaryotların tanımlanmalarında kullanılan en önemli yöntem, moleküler olarak 16S rRNA' larının birbirine yakın grupların gen sekanslarının mukayesesi prensibine dayanmaktadır [28].

Siyanobakterlerin teşhisi 2 şekilde yapılmaktadır:

- Morfolojik karakter ve bölünme fizyolojilerine göre,
- 16s rRNA 'larına göre [28].

Morfolojik tanımlamada siyanobakter ordoları hücrelerin ipliksi veya tek hücreli olmaları, ipliksi olanların dallanmalarına veya tek düzlemde büyümelerine, çoklu veya ikili bölünmelerine, hücre bölünmesinin tek veya çok düzlemde olmasına göre ayrılır. Cinslerin tanımlanmasında daha kapsamlı ve detaylı karakterler kullanılır. Deniz veya Tatlısularda yaşamaları, hücre büyüklükleri, plazma membranında tilakoidlerin bulunması, hücrelerin dairesel veya çubuk şeklinde olması, üreme fizyolojileri, musilaj kılıfının bulunmasına göre ayrılır [28].

16s rRNA veya DNA ile de çok sık tanı yapılmaktadır. 16s rRNA hücrede çok bulunması ve mutasyonlara karşı daha korunaklı olmasından dolayı tanımlama ve filogeni oluşturulması açısından önemlidir [28]. Moleküler yöntemlere göre tanımlanan siyanobakter filumuna ait 5 takım bulunmaktadır. Bunlar; Chroococcales, Pleurocapsales, Oscillatoriales, Nostocales ve Stigonematales takımlarıdır.

Mikro alg sınıfları içerisinde prokaryotik organizmaları içeren tek grup Cyanophyceae'dir. Arkeyan devirde ortaya çıkmış olan bu gruba ait algler birincil üretimde önemli bir role sahiptir [28].

Mavi yeşil algler adaptasyon yeteneklerinin yüksek olmasından dolayı tuz gölleri, deniz ve tatlı su ortamları, sıcak su kaynakları gibi birçok ortamda dağılım göstermektedirler [29].

Siyanobakterler, çekirdek şekli açısından etrafının belirgin bir membranla çevrili olmaması ve fotosentezin bitkilerde olduğu gibi kloroplastlarda gerçekleşmemesiyle bakterilere benzer [30].

Kimyasal kompozisyonlarına göre ekzopolisakkaritler homo ve heteropolisakkarit olmak üzere ikiye ayrılır. Homopolisakkaritler tek tip monosakkarit içerirken heteropolisakkarit birden fazla monosakkarit içerir [28].

Azot atmosferde bol bulunmasına karşın, N₂ halde inaktiftir. Azotun biyolojik sistemlerde kullanılabilmesi için amonyuma dönüşmesi gerekir. Biyolojik olarak indirgenme enzim kompleksi olan nitrogenaz vasıtası ile gerçekleşir. Nitrogenaz enzimi oksijen varlığında etkisini kaybeder. Azot fikse eden mikroorganizmalar arasında sadece siyanobakterler anaerobik enzimle O₂ üretir [28]. İpliksi olanlarda heterosistler hücre içine O₂ girişini engelleyerek nitrogenaz enziminin çalışması için uygun ortam sağlar.

Prokaryotik genom ve organizasyona sahip olmaları, bitkiler gibi fotosentez yapıyor olmaları, kontaminasyon riskinin diğer bakterilere göre daha az olması, geniş spektrumlu antibakteriyel, antifungal ve antiviral aktiviteye sahip olmaları, ağır metal ve herbisitler gibi toksik maddelere ve stres şartlarında dirençli olmaları nedeniyle siyanobakterler biyoteknoloji çalışmalarında en çok tercih edilen mikroorganizmalardır [28].

2.3. Siyanobakter Toksinleri

Siyanobakterlerin toksin ürettikleri uzun bir süredir bilinmektedir [31]. Dünyanın birçok yerinde bulunan iç sularda oluşan ötrofikasyonların aşırı siyanobakter kümelenmeleri ve bununla beraber siyantoksinleri de ürettiği belgelenmiştir [32]. Birçok siyanobakter türünün ürettiği toksinlerin omurgalılar üzerinde çok farklı ve zararlı etkilere neden olduğu bilinmektedir [32]. Siyanobakterlerin ürettiği bu biyoaktif ve zehirli maddelere siyanotoksin adı verilmektedir [33, 32].

Farklı siyanotoksinlerin toksisitesi, siyanobakterlerin büyümesi ve toksin üretimi derecesi ile doğru orantılıdır. Farklı siyanobakterlerin büyümesi ve toksin üretimleri ışık yoğunluğu, kısa dalga boyundaki radyasyonlar, sıcaklık, pH ve besin maddeleri gibi abiyotik faktörlerden ciddi oranda etkilendiği gözlemlenmiştir [32, 34, 35]. Küresel ısınma ve sıcaklık gradyanları da tür kompozisyonunu önemli ölçüde etkileyen ve toksik fitoplanktonların çoğalmasını destekleyen etmenler arasında gösterilebilir [34].

Siyanobakteriyel toksinlerin kimyasal yapıları birbirinden farklı yapı gösterir ve kimyasal yapıları bakımından sitotoksin ve biyotoksin olarak gruplandırılırlar. Sitotoksin grubundaki toksinlerin kimyasal yapıları çok karmaşık olup insanlar ve hayvanlar için öldürücü olmamasına rağmen algler için toksik etki göstermektedir. Biyotoksinlerin ise insanlar ve hayvanlar üzerinde ciddi toksik etkileri olup bu canlılar üzerinde ölümcül etkileri olabilmektedir [34].

Toksik mavi yeşil algler (cyanobacteria) dünyanın her yerinde tüm iç sular ve denizlerde bulunmaktadır ve günümüze kadar omurgalı canlılarda toksik etki yapan 46 mavi yeşil alg türü bulunmuştur. Bunlardan en önemli olanları *Microcystis* spp., *Planktothrix rubescens*, *Planktothrix agardhii*, *Anabaena* spp., *Aphanizomenon* spp., bazı *Oscillatoria* spp., *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Synechococcus* spp., *Gloeotrichia* spp., *Lyngbya* spp., *Nostoc* spp., *Schizothrix* spp., ve *Synechocystis* spp.'dir [32].

Biyotoksinler; nörotoksinler (sinir sistemini etkileyen), hepatotoksinler (karaciğeri etkileyen) ve dermatotoksinler olarak 3 grupta incelenirler [28].

Toksin üreten siyanobakterler toksikolojik özelliklerine göre gruplandırılırlar. Bu gruplarda nörotoksinler (anatoksin-a, saksitoksin, neosaksitoksin), tümör promotörleri (mikrosistinler ve lipopolisakkaritler), dermatotoksinler (lyngbyatoksin A, apylsiatoksin), hepatotoksinler (mikrosistin, nodularin, cylindrospermopsin) olmasına rağmen kimyasal yapıları baz alındığında üç ana grupta toplanırlar.

- 1- Siklik peptitler (mikrosistin ve nodularin)
- 2- Nörotoksik alkaloitler (nörotoksinler ve cylindrospermopsin)
- 3- Lipopolisakkaritler

Son zamanlarda özellikle sulardaki geniş yayılımları dikkate alındığında siklikpeptit hepatotoksinlerin, nörotoksik alkoloitler ve lipopolisakkaritlerden daha etkili olduğu bildirilmiştir [29, 30].

En çok bilinen potansiyel siyanotoksinler büyük ölçüde düşük molekül ağırlıklı alkoloitler ve siklikpeptitlerdir. İsimleri genelde üretici organizmalardan esinlenerek alınmıştır [28].

Tatlısulardaki siyanobakterilerin ani çoğalmalarının dünya çapında artmasıyla alakalı olarak birçok türün ürettiği toksinler insanlar ve diğer organizmalar için zararlıdır.

Tablo 2.3 Siyanobakter toksinleri, toksinleri üreten cinsler ve toksinlerin etkileri [41, 42]

Hepatotoksinler	Kimyasal yapısı- sayısı	Etki	Toksijenik cinsler
Mikrosistin	Halkasal heptapeptit-71	Hepatotoksisite, Protein fosfataz inhibisyonu, Membran bütünlüğünü bozma, Tümör uyartımı	<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Anabaenopsis</i> , <i>Haplalosiphon</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Rivularia</i>
Nodularin	Halkasal pentapeptit-9	Hepatotoksisite, Protein fosfataz inhibisyonu, Membran bütünlüğünü bozma, Tümör uyartımı	<i>Nodularia</i>
Cylindrospermopsin	Guanidin alkoloit- 3	Karaciğerde sinirsel hasar, Protein sentez inhibisyonu,	<i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Oscillatoria</i> ,

genotoksisite

Umezaki,
Raphidiopsis

Nörotoksinler

**Kimyasal
yapısı-sayısı**

Etki

Toksijenik cinsler

Anatoksin-a

*Tropan ilişkili
alkoloit-5*

Postsinaptik
inhibisyon

Aphanizomenon,
Anabaena,
Oscillatoria,
Raphidiopsis,
Planktothrix,
Cylindrospermum

Anatoksin-a(s)

Guanidin metil
fosfat ester-1

Asetilkolinesteraz
inhibisyonu

Anabeana,
Oscillatoria,
Phormidium

Saksitoksin

Karbamat
alkolit-20

Sodyum kanal
inhibisyonu

Apahnizomenon,
Lyngbya,
Anabaena,
Planktothrix,
Cylindrospermopsis

Dermatotoksin ve sitotoksin	Kimyasal yapısı-sayısı	Etki	Toksijenik Cinsler
Lyngbyatoksin-a	Alkoloid-1	Protein kinaz c aktivasyonu	<i>Lyngbya</i> , <i>Schizothrix</i> , <i>Oscillatoria</i>
Aplysiatoksin	Alkoloid-2	Protein kinaz c ativasyonu	<i>Lyngbya</i> , <i>Schizothrix</i> , <i>Oscillatoria</i>

2.3.1. Siklik Peptitler

Mikrosistinler *Microcystis*, *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Hapalosiphon*, *Aphanizomenon*, *Gloeotrichia echinulata*, *Nostoc*, *Plectonema*, *Phormidium*, *Rivularia*, *Fisherella*, *Tolypothrix*, *Planktothrix* [43] gibi ondan fazla farklı genus tarafından üretilen, diğerlerinin arasında en yaygın siyanotoksinlerdir [19].

Mikrosistinlerin (MC) biyosentezi 48 ardışık katalitik reaksiyon içeren karmaşık bir süreçten oluşur ve proteinojenik olmayan aminoasit sentezi gibi alışılmadık özellikler içerir. Çok ilginçtir ki siyanobakterlerdeki mikrosistinlerin biyolojik fonksiyonları halen tartışma konusudur [44]. Mikrosistinler; 2 ve 4 pozisyonlarında iki l-amino asidi, 1, 3, ve 6 pozisyonlarında 3 d-amino asidi ve 7 pozisyonunda bir Michael grubu alıcısına sahip N-metil aminoasit olan Mdha'dan oluşur. Bunlardan ikisi halkada bulunan yan zincirler aracılığıyla komşularına bağlanırlar (3.cü pozisyonda β -d-MeAsp ve 6.cı pozisyondaki γ -d-Glu). Proteinojenik olmayan β -amino asit Adda, 5.ci pozisyonda bulunmaktadır [45].

Mikrosistinler en yaygın ve en iyi bilinen siyanotoksinlerdir. Bunlar siyanobakterlerin türleri olan *Anabaena*, *Nostoc*, *Microcystis*, *Oscillatoria* cinsleri tarafından üretilen siklik heptapeptit hepatoksin grubundan([cyclo-(D-Ala¹-X²-D-MeAsp³-Z⁴-Adda⁵-D-Glu⁶-Mdha⁷)] oluşmaktadır [46, 47]. Bu peptitlerin ikisi (x ve y) değişkendir ve 70'ten fazla değişik biçimlerde bulunur [48]. İkinci pozisyonda bulunan L (lösin) ve dördüncü pozisyonda bulunan arginini ile MC-LR, mikrosistinler arasında en toksik olanıdır [49]. İnsanların mikrosistinlere maruz kalması teneffüs yoluyla, cilde temas

yoluyla ve çoğunlukla kontamineli su veya gıdanın ağız yolu ile alınması ile gerçekleşmektedir [50].

Nodularin *Nodularia spugimena* cinsi tarafından üretilir ve daha çok tuzlu habitatlarda bulunmuştur. [51] Yapıları MC lere benzemekle beraber farklı olarak pentapeptit [cyclo-(D-MeAsp¹-L-Arg²-Adda³-D-Glu⁴-Mdhb⁵)] içermeleri ile ayrılırlar [48]. Nodularinler, *Nodularia spugimena* tarafından üretilen yapı ve fonksiyon olarak mikrosistinlere benzer yapıda olan siyanotoksinlerdir. Mikrosistinlerden farklı olarak 1 ve 2 pozisyonlarında aminoasitleri yoktur.

Alkoloid siyanotoksin grubundan olan silindrospermopsin daha çok *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Umezakia natans*, *Anabaena bergii*, *Anabaena lapponica*, *Aphanizomenon ovalisporum*, *Aphanizomenon flosaquae*, *Raphidiopsis curvata* ve *Lyngbya wollei* cinsleri tarafından üretilir. Silindrospermopsinin biyolojik olarak su habitatlarında parçalanabileceğini şimdiye kadar yapılan üç çalışma ortaya koymuştur [52, 53]. Smith ve arkadaşları başlangıçtaki silindrospermopsin konsantrasyonu ile biyolojik bozunma oranı arasında doğrusal bir ilişki kurulabileceğini bulmuştur[52]. Mohamed ve Alamri ise silindrospermopsinin biyolojik bozunumunun bir siyanobakteri tabakasından (bloom) elde edilen *Bacillus* suşu (AMRI-03) tarafından yapılan hızlı bozunma hızının başlangıçtaki silindrospermopsin konsantrasyonuna oldukça bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Ne var ki bugüne kadar hiçbir tanımlanmış metabolik yol açıklığa kavuşmamıştır[53]. Saksitoksinler birçok farklı siyanobakter tarafından üretilen bir grup alkoloid nörotoksini oluşturur. Bu siyanobakter genusları arasında dinoflagellatlar, *Anabaena*, *Raphidiopsis*, *Lyngbya*, *Planktothrix (Oscillatoria)* ve *Cylindrospermopsis* bulunur [46,54].

Donovan ve ark. [55] mavi midyelerin sindirim kanallarından elde edilen kimliği belirsiz 7 potansiyel saksitoksin degradasyonuna sebep olan bakteri tarafından saksitoksin karışımının %90 'a kadar azalmasını göstermişlerdir.

Anatoksin-a, siyanobakterlerin *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Planktothrix*, *Raphidiopsis*, *Arthrospira*, *Cylindrospermum*, *Phormidium*, *Nostoc* ve *Oscillatoria* genusları tarafından üretilen düşük molekül ağırlıklı bir nörotoksik alkoloiddir [56].

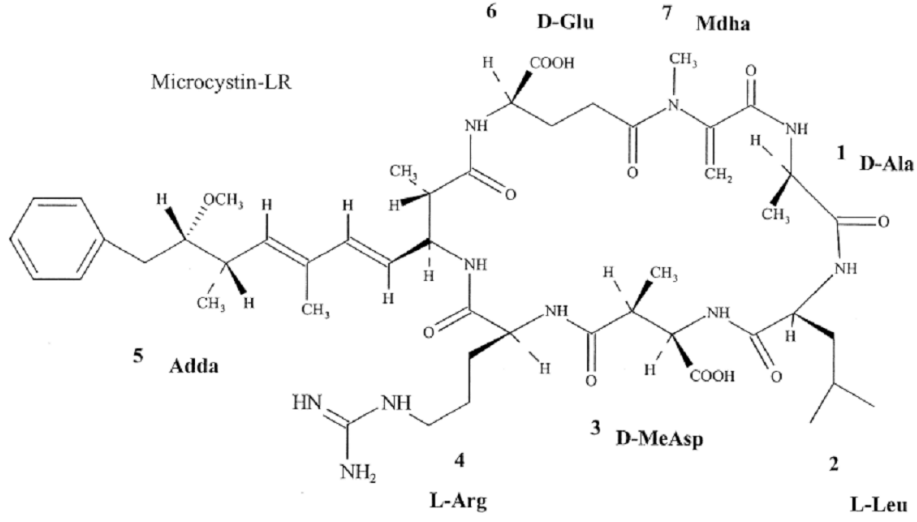
Siyanobakterlerde mikrosistin ve nodularin olmak üzere iki tip siklik peptit sentezlenir. Diğer bilinen siklit polipeptitler siyanopeptolinler ve anabaenopeptinlerdir. Bunlar daha az toksik bulunmuşlardır [57]. Siklik peptitler küçük moleküller olup molekül ağırlıkları 800-1000 DA arasındadır.

Heptapeptit hepatotoksik olan mikrosistin birçok siyanobakteri cinsinde bulunmaktadır, bunlardan bazıları *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Chroococcus*, *Nostoc*, *Anabaenopsis* ve *Hapalosiphon*'dur.

Bilinen en iyi tür *Microcystis aeruginosa* çok geniş bir yayılıma sahip olup, değişik iklimlerde iyi gelişir ve insan sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturur. Belirlenen bu türlerin tanımlanması ve yok edilmesini içeren birçok araştırma yapılmıştır[58, 59].

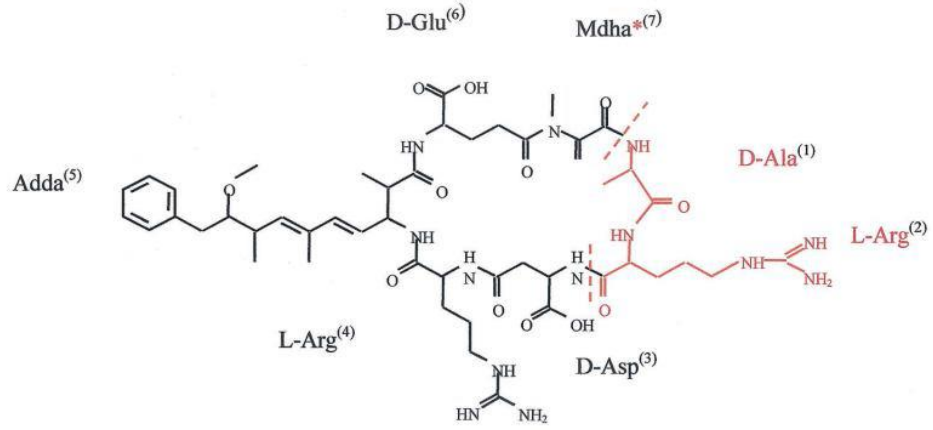
Mikrosistin varyantları arasında en yaygın olanları mikrosistin-LR(lösin-arginin), mikrosistin-RR(arginin-arginin) ve mikrosistin-YR(tirozin-arginin)'dir.[60] MC-LR'nin özellikle *Anabaena*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Anabaenopsis*, *Planktothrix* sp. (CYN60,61), *Rivularia* [7, 33, 61, 62] cinsleri tarafından, MC-YR'nin; *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis* ve *Hapalosiphon spp.* [7, 33] tarafından, MC-RR'nin; *Oscillatoria agardhii*, *Microcystis aeruginosa* ve *M.viridis* tarafından [7] tarafından sentezlendiği bildirilmiştir.

Doğada en çok karşılaşılan ve üzerinde en çok çalışma yapılan mikrosistin varyantı mikrosistin-LR'dir. Molekül ağırlığı 1000 Da civarındadır. Mikrosistin genel yapısında X (2) ve Y(4) ile gösterilen yerlere sırasıyla lösin ve arginin amino asitlerinin bağlanması sonucuyla mikrosistin-LR izoformu oluşmaktadır [63].



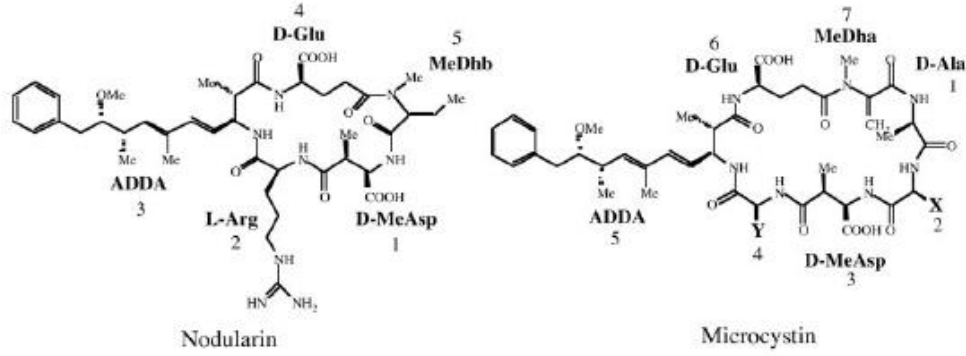
Şekil 2.3.1.1 Microcystin-LR'nin yapısı ve konfigürasyonu [64]

Mikrosistinlerin moleküler yapısında karboksilik asit 3. Ve 6. Pozisyonlarda bulunur, arjinin 4. Pozisyonda ve lösin ise 2. Pozisyonda yer alır. Bundan dolayı bunlar nispeten polar yapı kazanmış moleküllerdir. Diğer taraftan Adda [(2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-metoksi-2,6,8-trimetil-10-fenildeka-4,6-dienoik asit)] kısmı ve hidrofobik aminoasit kısımları ise mikrosistine hidrofobik yapı kazandırır [65].



(D-Ala ¹ -	X ² -	D-MeAsp ³ -	Z ⁴ -	Adda ⁵ -	D-Glu ⁶ -	Mdha ⁷)
D-Ser	L-Leu	D-Asp	L-Ala	DMAdda	D-Glu(OCH ₃)	Dha
D-Leu	L-Ala		Aba	(6Z)Adda		L-Ser
	L-Tyr		L-Leu	ADMAdda		L-MeSer
	L-Glu		L-Arg			Dhb
	L-Val		L-Glu			MeLan
	L-		L-			
	Glu(OMe)		Glu(OMe)			
	L-Arg		L-Phe			
	L-Phe		L-Tyr			
	L-Met(O)		L-LHar			
	L-HPhe		L-Trp			
	L-HTyr		L-Met(O)			
	L-Trp		L-HArg			
	L-HArg					
	L-HIle					
	L-H ₄ Y					
Nodularin						
--	--	D-Asp	L-Arg	Adda	D-Glu	Mdhb

Şekil 2.3.1.2 Mikrosistin ve nodularin izoformları. Amino asitlerin eksilmesi nodularin yapısı içinde kırmızı ile belirlenmiştir. Asteriks Mdha parçası Mdhb nodularin yapısı içinde değiştirilmesi ile belirlenmektedir. Kısaltmalar: Aba, amino-isobütirik asit; Dha, dehidroalanin; Mdha, N-metildehidroalanin; Met(O), metionin-S-oksit; Glu(OMe), glutamat methyl esteri; (H₄)Y, 1,2,3,4-tetrahidrotirosin; DMAdda, desmetil-Adda; Dhb, dehidrobütirik asit; MeLan, N-metillantionin; ADMAdda, O-asetil-Adda [66]



Şekil 2.3.1.3 Mikrosistin ve nodularinin yapısı [67]

Mikrosistin diğer sekonder metabolitler gibi ribozom dışı peptid sentetaz mekanizmasıyla sentezlenir ve genel yapısı şekil 2.1’de gösterildiği gibidir [68]. Mikrosistin ve nodularin farklı kimyasal yapılarına rağmen benzer biyolojik aktivite gösterirler ve insanlar ve hayvanlar için hepatotoksiktirler[69]. Günümüze kadar nodularin zehirlenmesine dair hiçbir insan ölümüne rastlanılmamış olmasına rağmen toksine uzun süreli maruz kalınması durumunda insan sağlığı açısından potansiyel tehlike oluşturduğu görülmüştür[70].

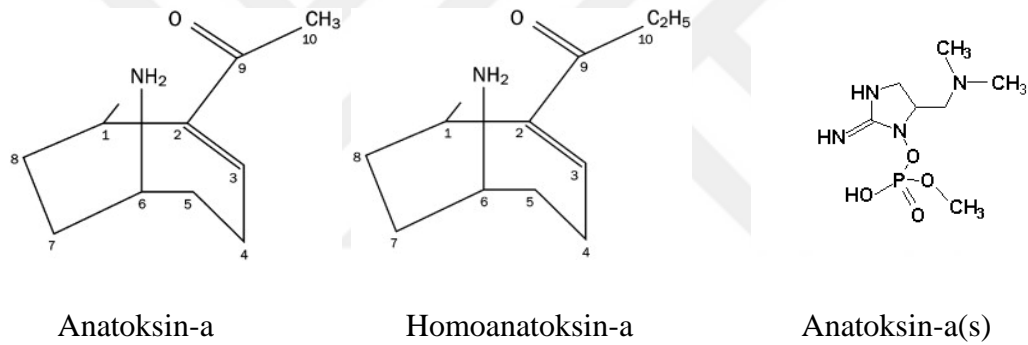
Mikrosistinler siklik yapıda olduklarından kararlıdır ve kimyasal hidroliz ve nötral PH’da oksidasyona karşı dayanıklıdır. Kaynattıktan sonra bile mikrosistin ve nodularinin etkili oldukları görülmüştür [71]. Mikrosistin toksinleri hidrofilik halkasal heptapeptid yapıdadır ve bu toksinler OATP (organic anion transporting polypeptides) aracılığıyla hücreye alınarak hücrel zarara sebep olmaktadır [58, 72]. Kanser hücrelerinde normal hücrelere göre OATP’lerin daha fazla eksprese olduğu ve bu yüzden de mikrosistinlerin kanser ilacı geliştirmek için yüksek potansiyele sahip bileşikler olduğu bildirilmiştir [58, 73].

2.3.2. Alkoloitler

Alkoloitler genellikle kuvvetli fizyolojik ve farmakodinamik aktivite gösterirler. Halka içinde bir veya birden fazla azot taşıyan bazik karakterli maddelerdir. Alkoloitler de diğer sekonder metanolitler gibi herbivor ve patojenlere karşı savunmada görev alırlar [74]. Anatoksin alkoloit yapıda olan bir nörotoksindir ve birçok siyanobakteri (*Anabaeana* ve *Oscillatoria*) tarafından üretilmektedir. Anatoksin-a, homoanatoksin-a

ve anatoksin(s) olmak üzere 3 grupta incelenirler. Güçlü post sinaptik depolarize edici etkisi sebebiyle nöromuskuler blokaja neden olur bu ajan sinir sistemini etkileyerek Na⁺ kanallarının devamlı açık olması sağlamaktadır. Bu sebeple toksinin alınımına bağlı olarak kas demetlerinde kasılma, beyinde O₂ yetersizliği sonucu çırpınmalar, konvulziyon ve siyanoz sonucu ölüm meydana gelebilmektedir [75].

Anatoksin-a(s) bilinen tek doğal organofosfat kolinesteraz inhibitörü olup salivasyona sebep olduğu görülmüştür. Molekül ağırlığı 252'dir ve toksisitesi yüksektir. LD₅₀ değeri 20µg/ kg olduğu tespit edilmiştir. En göze çarpan semptomlar lakrimasyon olup mide bulantısı, kusma, diyare de gözlenmektedir. Solunumun durması sonucu ölüm meydana geldiği bildirilmiştir[76].



Şekil 2.3.2 Anatoksinlerin genel yapıları. Anatoksin-a, homoanatoksin-a ve anatoksin-a(s) [77]

Saksitoksin, trisiklik perhydropurine alkaloiddir ve yaklaşık 30 adet analogu bildirilmiştir[78]. Saksitoksin ve analogları sinir ve kas hücre membranlarında sodyum kanallarını bloke ederler ve paralitık kabuklu zehirlenmesine (PSB) sebep olurlar. Sodyum iyonlarının sinir hücrelerinin membranlarından geçişini engellerler ve sinirler boyunca sinyal iletimini durdururlar. PSB, saksitoksin ve analogları ile kontamine olmuş deniz ürünleri ya da içme sularının tüketimi sonucu oluşmaktadır, hem tatlısu hem de denizel organizmalar tarafından üretilir. *Alexandrium*, *Gymnodinium* ve *Pyrodinium* genusları saksitoksin üreten denizel dinoflagellatlardır. Tatlısu ortamındaki PSB toksin üreticileri ise *Aphanizomenon flos-aquae*, *Cylindrospermopsis raciborskii* ve *Lyngbya wollei*'dir. PSB toksin türevlerinin oldukça yüksek toksisiteye (memelilerde sodyum kanallarını bloke eden maddeler olarak) sahip oldukları görülmüştür [79].

Toksin profilleri çok karmaşık ve değişkendir, dinoflagellatlar ve kontamine olan kabuklu deniz ürünlerine benzer oldukları tespit edilmiştir [80]. Saksitoksin iskelet kası hücrelerinde aksiyon potansiyelini engelleyerek direk olarak etki gösterirler [81].

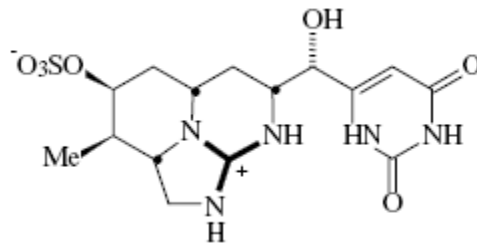
2.3.3. Silindrospermopsisler

Silindrospermopsin (CYN) sitotoksik, nörotoksik ve hepatotoksik etkileri olan alkaloid içeriğe sahip bir toksindir [82]. *Cylindrospermopsis raciborskii* ik bilinen CYN üreticilerindendir [83]. Toksisitesinin sonuçları olarak tümör tetikleyicisi olmasının yanı sıra karsinojen etkiye sahip olduğu da tahmin edilmektedir. Özellikle akciğer, karaciğer, böbrek ve kalbi etkilemektedir [84].

Silindrospermopsin güçlü bir alkaloid ve protein sentezi inhibitörüdür. Son yıllarda rapor edilen dünya çapındaki artışı sebebiyle ciddi bir endişe kaynağı haline gelmiştir [85]. Azot, sülfat ve fosfat açlıkları toksin üretiminde önemli farklılıklara neden olmaktadır. Bu yüzden inorganik besin maddelerinin silindrospermopsis üretiminde önemli bir rol oynadığı görülmektedir [86, 87, 88, 89].

Silindrospermopsis tropik bölgelerdeki siyanobakteri çiçeklenmelerinin bir ürünü olarak kayıtlara geçmesine rağmen, şimdilerde ılıman çevrelerde de rapor edilmektedir. *Cylindrospermopsis raciborski* tarafından üretilir. Ayrıca *Aphanizomenon ovalisporum*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Umezakia natans*, *Raphidiopsis curvata* ve *Anabaena bergii*'nin de ürettikleri görülmüştü [90].

Silindrospermopsin, hepatotoksik alkaloid sınıfındadır. Toksine maruz kalanlarda etkilenen başlıca organ karaciğer ve böbreklerdir [82].



Şekil 2.3.3 Silindrospermopsin yapısı [91]

Silindrospermopsisin hepatotoksik, sitotoksik [92, 93] ve nörotoksik [94] etkileri vardır. Toksikitesi sitokrom P450'nin inhibisyonuna ek olarak glutasyon ve protein sentezinin inhibisyonu ile de ortaya çıkmaktadır [92, 93]. Analiz ürünlerinin toksisite değerlendirilmelerinde, toksisite için molekülün urasil kısmının gerekli olduğu gösterilmiştir [95].

İnsan sağlığına etkisinin yanısıra birçok hayvan ölümüne de sebep olarak büyük ekonomik kayıplara yol açmıştır [96, 97]. Farelerle yapılan deneylerde silindrospermopsisin çoklu organ ve doku hasarına yol açtığı görülmüştür [84]. Silindrospermopsis bitki ve hayvanlarda protein sentezini engellemektedir [98, 99].

2.3.4. b-N-metilamino-L-alanin (BMAA)

Bu aminoasit protein yapısında değildir. *Nostoc* cinsinin simbiyont türleri tarafından üretildiği tespit edilmiştir. İlk olarak tropiklerdeki Cycad ağacının tohumlarında bulunmuştur [100]. Protein yapıda olmayan bu aminoasit ilk defa Guam'da Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) ile ilişkilendirilmiştir. BMAA motor nöronlar üzerinde bir takım toksik etkilere sahiptir [101].

Bu bileşik Parkinson hastalığından ölen Guam'da yaşayan Chamorro'luların beyin dokusunda bulunmuştur [102, 103]. Hemen hemen tüm siyanobakterilerin üretebildiği görülmüştür [104].

2.3.5. Lipopolisakkarit (LPS) Endotoksinler

Siyanobakterilerin en az ürettiği toksinin LPS endotoksinler olduğu görülmüştür [105]. Siyanobakterilerin bütün türleri lipopolisakkaritler gibi benzersiz ve farmakolojik yönden aktif olan çeşitli toksinler üretirler [36]. Bu toksinler kimyasal yapıları ve organlar üzerindeki etkilerine göre sitotoksin, nörotoksin, dermatotoksin, hepatotoksin veya tahriş edici toksinler olmak üzere sınıflandırılmaktadırlar [106, 107].

Dermatotoksik ve inflamatur özellikleri nedeniyle LPS moleküllerine endotoksin veya tahriş edici toksinler de denilmektedir [108]. Siyanobakteriyel LPS insanlarda cilt hastalıkları, gastrointestinal sorunlar, solunum yolu hastalıkları, ateş ve baş ağrısı gibi çeşitli rahatsızlıklara sebebiyet vermektedir [109]. Bunlar LPS den kaynaklı dolaylı etkilerdir ve doğuştan gelen bağışıklık yanıtlarına neden olmaktadır. Siyanobakteriyel

LPS'ler güçlü alerjik reaksiyonlara ciltte ve gözde tahrişlere neden olabilmektedir. Bunun yanı sıra grip için alışılmış titreme, baş ağrısı, uyuşukluk diyare gibi bazı belirtileri de tetiklemektedirler [110]. *Anacystis nidulans*, *Microcystis*, *Anabaena*, *Spirulina* ve *Oscillatoria* gibi cinslerin LPS toksini ürettikleri bildirilmiştir [111, 112].

2.3.6. Dermatotoksik Alkoloitler

Deniz siyanobakterileri olan *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Schizothrix*'in toksinleri yüzücülerde deri enfeksiyonuna sebep olduklarından dermatotoksik alkoloitler olarak tanınmaktadırlar. *Lyngbya* türlerinin neden olduğu iltihaplı yaraların aplisiyatoksin ve debromoaplisiyatoksin yüzünden oluştuğu tespit edilmiştir. Aynı şekilde *Lyngbya*'nın başka bir türünden elde edilen lingibiyatoksin-a toksininin deri, ağız ve bağırsak mukozalarında iltihaba neden olduğu bildirilmiştir [113].

Her iki siyanotoksin çeşidi protein kinaz C aktivatörleridir ve dolayısıyla tümör aktifleştiricisidirler [114, 111]. Bunların tamamıyla siyanobakteriyel ürün olup olmadıkları kesin değildir [115].

2.4. Siyanobakterilerin Ürettiği Metabolitler ve Biyoteknolojide Kullanım Alanları

Siyanobakter toksinleri insan ve hayvan sağlığı açısından büyük bir tehdittir fakat buna rağmen bu toksinlerin birçok patojen olan bakteri, fungus ve diğer mikroorganizmalara karşı öldürücü etki yaptığı bildirilmiştir[1]. [116] Siyanobakterlerden elde edilen fikobiliproteinler antioksidan özellikleri vardır ve bunlar kozmetikte ve gıda sektöründe doğal renklendirici olarak kullanılmaktadır [117, 118] Siyanobakterlerin ürettikleri karotenoidler kansere, yaşlanmaya, kalp krizine, ülser ve koroner damar rahatsızlıklarına karşı koruyucu etkiye sahiptir [119]. *Arthrospira (Spirulina)*, *Chlorella* ve *Dunaliella salina* gibi cinsler gıda olarak kullanımda başı çekenler arasındadır [120]. *Muriellopsis sp.* siyanobakterle içinde lutein gibi karotenoidleri yüksek oranda bünyesinde biriktirme özelliğine sahiptir. Bu karotenoidler dejeneratif hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde kullanılmaktadır [121]. *Hematococcus pluvialis* antioksidan aktivite özelliği ile bilinen astaxanthin adı verilen yüksek değerli karotenoid üretir [122, 123]. *Arthrospira (Spirulina)* yüksek oranda protein içermektedir ve mükemmel besleyici özelliği yine içerisinde yüksek oranda bulunan doymamış yağ

asitleri ve demir ile alakalıdır. Aynı zamanda vitamin B₁₂'nin en zengin doğal bitki kaynaklarından bir tanesidir [124]. *Chlorella*'da bulunan β -1,3-glukan, antioksidan özelliği olan ve kandaki yağ seviyesini azaltıcı etkisi bulunan bir polisakkarittir. *Chlorella* aynı zamanda gıda takviyesi olarak da kullanılmaktadır [125, 126, 127]. Diğer bir antikanser bileşen Dolastatin ise *Lyngbya* ve *Symploca* cinslerinden elde edilmiştir [28]. Siyanobakterilere mavi rengi veren C-fikosiyanin yüksek oranda fikobiliprotein içerir ve bu protein kemoterapik bir ajandır. Yapılan araştırmalarda C-fikosiyaninin apoptik tümör hücrelerini öldürdüğü bildirilmiştir [28]. *Spirulina*'nın insan sindirim sistemindeki *Lactobacillus*'ların gelişmesini arttırdığı görülmüştür [28]. *Spirulina*'nın sentetik pigment maddeleri ile kıyaslandığında en göze çarpan özelliğinin doğal bir renklendirici olduğunun bilinmesidir. *Spirulina*'nın içerdiği pigment maddeleri; fikobiliproteinlerin %75'i fikosiyaninler, %12'si allofikosiyaninler, %12'si fikoeritrin ve pigmentsiz polipeptitlerdir [132].

Tablo.2.4 Bazı siyanobakter sekonder metabolitleri ve bu metabolitlerin biyoaktiviteleri [133]

Sekonder Metabolitler	Siyanobakter	Biyoaktivite
Aplysiatoxin	<i>Lyngbya majuscula</i>	Antikanser
Biselyngbyaside	<i>Lyngbya sp.</i>	Antikanser
Apratoxins	<i>Lyngbya majuscula</i>	Antikanser
	<i>L. Sordid, L. Bouilloni</i>	
Tasipeptins	<i>Symploca sp.</i>	Antikanser
Lagunamide	<i>Lyngbya majuscula</i>	Antikanser
Grassypeptolide	<i>Lyngbya majuscula</i>	Anti-proliferatif
Nostoflan	<i>Nostoc flagelliforme</i>	Antiviral
Sulfolipids	<i>Lyngbya lagerhimii,</i>	Anti-HIV
	<i>Phormidium tenue</i>	
Calcium spirulan	<i>Spirulina platensis</i>	Anti-HIV
Scytovirin	<i>Scytonema varium</i>	Anti-HIV
	<i>Microcoleous</i>	
Abietane diterpenes	<i>lacustris</i>	Antibakteriyel
Ambiguine	<i>Fischerella ambigua</i>	Antibakteriyel
Noscomin	<i>Nostoc commune</i>	Antibakteriyel
Bis-(v-butyrolactones)	<i>Anabena variabilis</i>	Antibakteriyel

2.5. Antioksidan Aktivite

Siyanobakterlerin antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri de mevcuttur. Antimikrobiyal duyarlılık testleri, bir antimikrobiyal ajanın belirli bir bakteri türüne

karşı in-vitro etkinliğini saptamak amacıyla uygulanan testlerdir. Antimikrobiyal duyarlılık testleri başlıca iki metoddan oluşmaktadır. Bunlar;

- 1) Disk difüzyon tekniği
- 2) Tüp dilüsyon tekniği

Disk difüzyon tekniği en sık kullanılan yöntemdir. Bu tekniğe ayrıca Kirby Bauer yöntemi de denmektedir. Bu test kağıt disklere emdirilen antibiyotiğin, duyarlılığı araştırılan organizmanın inoküle edildiği besiyerine difüze olması temeline dayanmaktadır. Dilüsyon testleri antimikrobiyal ajanın mikroorganizmanın üremesini inhibe etmek veya öldürmek için gerekli olan minimum konsantrasyonu belirlemek için uygulanır.

Canlılarda metabolizma sırasında serbest radikal adı verilen son derece reaktif olan ara ürünler oluşur. Serbest radikaller farklı moleküller ile reaksiyona girerek hücrelere zarar verirler. Antioksidanlar serbest radikallerle reaksiyona girerek hücrelere zarar vermelerini önlerler. Siyanobakterlerde fikosiyanın yüksek antioksidan özelliğine sahip bir fotosentetik pigment bileşenidir.

Antioksidanlar radikal zincir reaksiyonlarını bozabilen maddelere denmektedir. Birçok bitki ekstraktları özellikle zengin polifenolik içerenler antioksidatif etki göstermektedirler. DPPH radikali ile redoks reaksiyonlarından faydalanılan DPPH testi ile ekstraktların antioksidatif kapasitesi belirlenebilmektedir. Radikal eşleşmemiş nitrojen elektronlarının sağladığı mor renktedir ve reaksiyondan sonra radikal tutucunun oksijen atomu ile DPPH-H indirgenmesi ile sarı renk oluşmaktadır. Oluşan bu renk değişimi spektrofotometre ile 517 nm dalga boyunda ölçülebilmektedir [134]. DPPH radikali birkaç kararlı organik azot radikalinden bir tanesidir. Koyu menekşe renktedir. Ticari olarak bulunmakta ve deneyden önce hazırlanması gerekmemektedir [134]. Oksidasyonu yavaşlatan veya durduran her türlü bileşiğe antioksidan denmektedir. Son 15 yılda; biyolojik sıvıların ve çeşitli ekstraktların toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesine yönelik birçok metot geliştirilmiştir. Bu metotlar genellikle elektron ve hidrojen atomu transferine dayanmaktadır. ORAC, TEAC, b-karoten, DPPH, Folin metodu, NO radikali temizleme aktivite gibi yöntemler bitkisel veya doğal ekstraktların toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde single oksijen transferine; FRAP,

CUPRAC, LDL-oksidasyonunun inhibisyonu gibi yöntemler ise hidrojen atomu transferine dayanmaktadır [136].

Antioksidanlar, atmosferik oksijen veya reaktif oksijen türlerinin etkisi altında oluşan, oksidasyon süreçlerini geciktiren veya önleyen bileşiklerdir. Polimerik ürünlerin, petrokimyasallarını gıda maddelerinin, kozmetik ürünlerin ve ilaçların stabilizasyonu için kullanılırlar. Antioksidanlar organizmaların serberst radikallerinin saldırısına bağlı olarak savunma mekanizmalarında görev alırlar [137].

DPPH sentetik olarak üretilen bir radikaldır ve 517 nm dalgaboyunda maksimum absorbans oluşturur. Antioksidan maddelerle muamele edildiğinde DPPH'ın sebep olduğu mor renk şiddetle azalır ve absorbansın düşüşüne neden olmaktadır. Bundan dolayı DPPH derişimini yarıya düşüren numune içeriği μg cinsinden IC_{50} olarak tayin edilmektedir. Bu durumda IC_{50} değeri ne kadar düşükse antioksidan kapasite o kadar yüksektir.

2.6. Siyanobakterilerle Yapılan Moleküler Çalışmalar

Siyanobakterler biyoteknolojik açıdan önemlidir ve son zamanlarda siyanobakterlerin metabolik mühendisliği ile ilgili yayınların sayısında artışlar olmuştur. *Synechocystis* cinsinde siyanobakterlerin şeker katabolik enzimlerinin gen ekspresyonunu aktive eden birçok transkripsiyonel regülatör tanımlanmıştır. Bu regülatörlere örnek olarak bir RNA polimeraz sigma faktörü (SiE) ve bir tepki düzenleyici (Rre37)'yi gösterilebilir. [138]. Bu genlerin aşırı ekspresyonu biyoplastik poliestere olan polihidroksibutiratların fazla üretilmesine sebep olmaktadır [139]. *Synechocystis* ve *Synechococcus* gibi tek hücreli siyanobakterler ve *Noctoc* gibi filamentli bakteriler genetik olarak kolay manipüle edilebildiklerinden mikrobiyal hücre fabrikaları olarak tercih edilmektedirler [140, 141].

Synechocystis, *Nostoc punctiforme* ve *Microcoleus* IPPAS B353 siyanobakterlerin genomik bilgileri kullanılarak çeşitli siyanobakteriyel fitokrom tipleri bulunmuştur. Siyanobakterler bilin fotoresptörlerini kullanarak yakın UV ve tüm görünür ışık aralıklarını algılama kapasitesine sahiptirler. Biyolojik işlevleri; pozitif ve negatif fototaksi, tuza dayanıklılık, β -karoten birikimi gibi bazı fotobiyolojik durumlarla açıklanabilir [142]. Mikroalgler biyoyakıt ve biyomateryal üretimleri için ciddi

potansiyeye sahiptirler; bununla beraber bu araştırmalar için moleküler biyoloji ve biyokimya alanlarında bilgi sahibi olmayı gerektirmektedir [143].

2.7. Siyanotoksinlerin Etkileri

Siyanobakteri kökenli toksik zehirlenme vakaları antik çağlara kadar uzanmaktadır. Bilinen en eski vaka, birkaç bin yıl önce Nil nehrinde ortaya çıkan ve suda kırmızı renk oluşturan *Planktothrix (Oscillatoria) spp.*'nin keşfedilmesidir. Günümüzde Mısır'lı araştırmacılar nehirde ve sulama kanallarında toksik *Oscillatoria agardhii* ve toksik *Oscillatoria teneui* gördüklerini belirtmişlerdir[139].

Toksik siyanobakterlerin görölme sıklığı sudaki ekosistemin yanısıra insan ve hayvan sağlığı için potansiyel tehlike oluşturmaktadır. Siyanotoksinler insanlara veya hayvanlara doğrudan temas yolu veya temizlenmemiş su ve yiyecek alımıyla çeşitli zararlı etkilere sebep olmaktadır[48].

Siyanotoksinler içme suyu kaynakları için ciddi tehlike oluşturur. Özellikle ağız yoluyla yeme veya içme ya da siyanotoksin birikmiş yiyeceklerin tüketilmesiyle insanlar için potansiyel sağlık tehditi oluşturmaktadır [43]. Siyanobakter kümelenmesi içeren su kaynakları ile temas sonucu karın ağrısı, kusma, ishal, cilt tahrişi, halsizlik, burunda ve boğazda tahriş, astım atakları, kaslarda titreme, mide bulantısı, parmak uçlarında ve ayak baş parmaklarında karıncalanma, bulanık görme, baş ağrısı, baş dönmesi, yüksek ateş, kanda oksijen eksikliği, vücutta morarma gibi sağlık sorunları ve solunum ile ilgili ya da ani kalp durmasından kaynaklanan ölüm olaylarının görölmesinin muhtemel olduğu bildirilmiştir [43].

MC-LR'nin normosit anemisine ve kemik iliği hasarına neden olduğu ve tavşanların bağışıklık sistemini etkilediği tespit edilmiştir [48]. Su depolarında içinde siyanobakteriyel büyümeler olduğu tespit edilen içme suyu olarak kullanılan sudan kaynaklı zehirlenmeler rapor edilmiştir. Bunlara kanıt olarak Brezilya'da 76 tane diyaliz hastasının mikrosistin yüzünden ölümcül zehirlenmeler geçirdiği [45] Avusturalya'da ise 139 çocuk ve 10 yetişkinin su ihtiyaçlarını *Cylindrospermopsis raciborskii* siyanobakter türü içeren barajdan karşılması sonucu hastaneye yatırılmaları örnek gösterilebilir [43].

Başka bir olayda Avustralya'nın Armidale şehrinde bulunan ve içme suyu olarak kullanılan su deposundan tüketilen suyun içinde bulunan ve karaciğerde hasara sebep olan *Microcystis aeruginosa* siyanobakter türü ile insan hastalıklarının ciddi bağlantısı olduğu tespit edilmiştir [43].

Özellikle Çin'de karaciğer kanseri vakalarının büyük bir çoğunluğunun siyanobakteriyel toksinlerle kontamine olan suların içme suyu olarak tüketilmiş olmasıyla bağdaştırılmaktadır [43].

Siyanotoksinlerle ilişkilendirilmiş hastalık ve ölümler dünyanın birçok farklı ülkesine tespit edilmiş ve rapor edilmiştir. Zhou ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada içme sularında mikrosistin bulunmasının kalın bağırsak kanserinin ilerlemesi ile ilgili olabileceğini öne sürmüşlerdir. Bundan yola çıkarak Çin'in Haining şehrine yaptıkları bir çalışmada içme suyu kaynağı çeşitleri ile bu kansere sebep olan tümörün arasında ciddi bir bağlantı olduğunu bildirmişlerdir [140].

Phragmites australis, *Ceratophyllum demersum* ve *Elodea canadensis*'in mikrosistin-LR'yi absorbe ettikleri bilinmektedir. Mikrosistin içeren suyla sulanan tarım bitkilerinde zamanla biriken toksinler insanlara besin zinciri yoluyla geçmektedirler. Böylece kontamine sularla ilgisi olmayan insanlar dahi mikrosistinden olumsuz etkilenirler [141].

Mikrosistin –LR karaciğerde olduğu kadar böbreklerde ve gastro-intestinal sistemde de toksik etki gösterirler. Böbreklerin zayıflamasıyla birlikte gastro-intestinal sistem bozulur ve deride alerjik reaksiyonlarla tahriş görülür. Mikrosistinler lenfosit üretimini baskırlar, aynı zamanda bağışıklık sistemini de etkilerler [142] . Özellikle balıkların ve diğer organizmaların üremeleri ve yumurtalarını bırakmaları için kıyı bölgelerini kullandıkları bilinmektedir ve siyanobakterilerin bu bölgelerde topluluk oluşturması ciddi bir tehdittir [143, 59, 144].

Bu nedenle siyanobakterilerin düzenli bir şekilde izlenmesi ve toksin seviyelerinin tespit edilmesi önemlidir [143].

2.8. Siyanotoksin Belirleme Yöntemleri

Siyanotoksin belirlenmesinde biyolojik ve analitik yöntemler kullanılır. Biyolojik yöntemler siyanotoksinlerin hepatotoksik, nörotoksik, sitotoksik etkileri ve aynı zamanda enzimatik aktivite ile immünolojik etkileşim esaslarına dayanmaktadır. Daha önceki yıllarda sulara toksin belirlenmesinde fare deneylerinden yararlanılmıştır ve birkaç saat içerisinde sonuç alınmıştır. Ancak bu yöntem toksine özgü bir yöntem olmadığı için ; toksin tipini belirlemede yetersiz kalmıştır ve düşük toksin düzeylerinde sonuç alınamamıştır. Bu sebebler araştırmacıları daha uygun yöntemlerin bulunmasına yöneltmiştir. Siyanotoksin belirlenmesinde birden çok yöntemin bir arada kullanılması tercih edilmektedir.

2.8.1. Biyolojik Analizler

Omurgasız Biyoanalizi: Birçok omurgasız canlı mikrosistin ve diğer siyanobakteri toksinlerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bunlardan en popüler olanı *Artemia salina*'dır. Halen *Artemia salina* ile kısa ve uzun vadeli metodlar içeren çeşitli toksisite testleri yapılmaktadır. Kısa süreli toksisite testleri daha sık kullanılmaktadır. Toksisite testlerinde *Artemia salina*'nın sık ve yaygın kullanımına rağmen uluslararası standartlaştırma faaliyetlerini izleyen protokollerin uyum sürecinde hala eksiklikler mevcuttur [146].

Bakteriyel Biyoanaliz:

Su örneklerinin toksisitesini değerlendirmek için kullanılan biyoluminesans bakterilerine dayanan birkaç dondurularak kurutulmuş toksisite kitleri mevcuttur. Bunlardan bir tanesi Mikrotox testi olup bu testte *Aliivibrio fischeri* bakterisi kullanılır diğeri ToxScreen testi olup bu test *Photobacterium leiognathi* bakterisi ile çalışır [147].

2.8.2. Biyokimyasal Analizler

Enzim bağlı immüno sorbent analizi (ELISA):

ELISA yöntemi hassaslığı, çabukluğu ve ekonomik olması sebebiyle toksin tayininde en çok kullanılan yöntemdir [148, 149]. Bununla birlikte ELISA pozitif sonuçlara neden olan matriks etkisine ya da çapraz seçiciliğe eğilimli olabilir ve zaman zaman daha kesin sonuçlar veren başka bir analiz ile desteklenmesi gerekebilir [150, 151].

Protein Fosfat Testi (PPA):

Mikrosistinler ve nodularinler potansiyel protein fosfataz inhibitörüdürler bu toksinler biyokimyasal bir analiz türü olan protein fosfat testi ile tespit edilebilirler [152]. Kolorimetrik ve florometrik PPA testleri hassas ve düşük maliyetli testlerdir ve rutin mikrosistin taramasında kullanılmaktadır. Ancak bu test enzimatik aktivite inhibisyonuna dayandığı için spesifik değildir [153].

Mikrosistinler ve nodularin, protein fosfataz 1 ve 2A'ya bağlanır ve bu enzimleri inhibe ederler. Çözeltideki bu enzimlerin birinin inhibisyon derecesi toksin konsantrasyonunun bir ölçüsü olarak değerlendirilebilir [154].

2.8.3. Analitik Analizler

Mikrosistin tayininde çeşitli analitik teknikler de mevcuttur. Bu teknikler biyolojik, biyokimyasal ya da fiziko-kimyasal nitelikte olabilir [155].

Uv emiciliği için bir fotodiyot-dizi detektörü ile birleştirilmiş HPLC yaygın olarak mikrosistin ve silindrospermopsin analizinde kullanılmaktadır. Farklı siyanotoksinlere duyarlılığı ve uygulanabilirliğine rağmen HPLC yöntemleri pahalıdır. Ayrıca analitik standartların ve iyi eğitilmiş teknisyenlerin bulunabilirliğine bağlıdır. Kütle spektrofotometresiyle (LC / MS) birlikte kullanılan kromatografik ayırma, yüksek duyarlılıkla siyanotoksin miktarının belirlenmesi ve bir karışımda bulunan varyantları tanımlanmasını sağlayan daha gelişmiş ve güçlü bir tekniktir [153].

Siyanotoksinlerin fizikokimyasal özellikleri esas alınarak geliştirilen analitik yöntemlerin arasında mikrosistin tanımlamasında en çok kullanılan yöntem UV uyarlanmış HPLC (yüksek ışınli sıvı kromatografisi) 'dir. Mikrosistin standartlarına gerek duyulan bu yöntem toksinin alıkonma zamanı esasına dayanır [156, 157]. PDA+UV detektörünün kullanılması ile toksinlerin UV ile tanımlanması daha özgül hale getirilmiştir. Ancak tüm mikrosistin çeşitleri benzer UV spektrumuna sahiptir ve bundan dolayı farklı mikrosistin tanımlamalarında sınırlamalar gerektirmektedir [156, 158, 65].

Matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonizasyon kütle spektrofotometrisi yöntemi de geliştirilen diğer bir yöntemdir.(MALDI-TOF). Hızlı, seçici, hassas ve yüksek

Çözünürlüğe sahip bir tekniktir ve molekül förmülüne dayanmaktadır. Bu yöntem çoğunlukla nitel tayin ve aynı türün toksinlerini belirlemek için kullanılmaktadır [159]. Mikrosistinlerin ve ikincil metabolitlerin belirlenmesi bu yöntemle son yıllarda hız kazanmıştır [160].

Bir diğer analitik analiz ise nükleer manyetik rezonans tekniğidir. Bu teknik molekülün yapısı hakkında ayrıntılı bilgi sağlar ve bazı atom çekirdeğinin manyetik özelliklerini kullanır. Ancak çevresel numunelerde siyanotoksinlerin kantitatif analizi için yararlı bir yöntem olduğu söylenemez [161].

Siyanobakterlerin toksik etkileri yıllardan beri bilinmekte olup, kullanım alanları ile ilgili olarak ayrıntılı çalışmalar yapılmamıştır. Bu çalışmada amacımız siyanobakterlerin toksinlerinin günümüz kimyasal ilaçlara alternatif olarak biyoteknolojik kullanılabilirliğini araştırmaktır.

3.BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1. Siyanobakter İzolasyonu ve Tanımlanması

Siyanobakteriler tek hücre yöntemi ile izole edilmiştir. Steril lamlarda sıvı besiyeri seyreltilerek Pastör pipeti yardımıyla toplanmıştır. Toplanan hücreler sıvı besiyerine aktarılmıştır. Hücreler agarlı besiyerine özel sürme yöntemiyle saflaştırılmıştır [162]. 3 ile 7 gün oda sıcaklığındaki inkübasyondan sonra hücreler BG11 agarlı besiyerinden alınmıştır ve sıvı besiyerine aktararak üretilmiştir. Bu sıvı ortamında 15 gün üreyen örnekler 500 ml BG11 sıvı besiyerine alınarak burada 2 ay üremeye bırakılmıştır. Toksin analizlerinin yapılabilmesi için siyanobakteriler büyük hacimlerde Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü laboratuvarında üretilmiştir. Bu işlemler sonunda toplam 25 mikroalg saf bir şekilde izole edilmiştir. Saflaştırma işlemlerinden sonra, kültürler LEICA marka ışık mikroskobu kullanılarak morfolojik karakter ve bölünme fizyolojilerine göre tanımlanmıştır. Tanımlamada Bergey's Manual of Systematic Bacteriology esas alınmıştır.[28] Siyanobakteri türleri 24 saat sürekli olarak 20-25 C'de floresans ışık altında (25 mEM 2/s) aydınlatılmıştır.

3.1.2. Çalışmada kullanılan siyanobakter izolatları

Tablo 3.2 Siyanobakter suş kodları ve türleri

Suş kodları	Tür
N2	<i>Leptolyngbya sp.</i>
N9	<i>Oscillatoria sp.</i>
N15	<i>Oscillatoria sp.</i>
N16	<i>Oscillatoria sp.</i>
N23	<i>Oscillatoria sp.</i>
N24	<i>Oscillatoria sp.</i>
N27	<i>Oscillatoria sp.</i>
N28	<i>Oscillatoria sp.</i>
N29	<i>Oscillatoria sp.</i>
N32	<i>Oscillatoria sp.</i>
N36	<i>Oscillatoria sp.</i>

N38	<i>Oscillatoria sp</i>
N46	<i>Oscillatoria sp.</i>
N49	<i>Oscillatoria sp.</i>
N52	<i>Oscillatoria sp.</i>
N53	<i>Oscillatoria sp.</i>
N62	<i>Oscillatoria sp.</i>
N65	<i>Oscillatoria sp.</i>
N67	<i>Oscillatoria sp.</i>
N68	<i>Oscillatoria sp.</i>
N69	<i>Oscillatoria sp.</i>
N71	<i>Oscillatoria sp.</i>
N77	<i>Oscillatoria sp.</i>
N79	<i>Chlorococcum sp.</i>
N80	<i>Oscillatoria sp.</i>
N81	<i>Oscillatoria sp.</i>
N82	<i>Oscillatoria sp.</i>
N84	<i>Oscillatoria sp.</i>
N85	<i>Oscillatoria sp.</i>
N87	<i>Oscillatoria sp.</i>
N88	<i>Oscillatoria sp.</i>

3.1.3. Siyanobakterlerin Geliştirilmesinde Kullanılan Besiyerleri

Siyanobakter izolatlarının çoğaltılmasında BG11 besiyeri kullanılmıştır [162, 163]. Toksinlerin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde patojen bakteriler için Nutrient Broth ve Nutrient Agar kullanılmıştır.

BG11 sıvı besiyeri ortamı:

BG11 sıvı besiyeri Tablo 3.3.'te belirtilen miktarlarda, stok-1 kimyasalların her birinden ayrı ayrı 1 litre olarak hazırlanmış ve hazırlanan stok kimyasalların her birinden 10 ml alınarak bir karışım hazırlanmıştır. Toplam 80 ml'lik bu karışım üzerine 920 ml saf su ilave edilmiştir. Stok-2 kimyasalları da Tablo 3.3.'te belirtilen miktarlarda tartılıp 1 lt su içerisinde karışım olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan iz element solüsyonundan 1 ml alınmış ve stok-1 kimyasalları ile hazırlanan 1 lt çözelti içerisine eklenmiştir. İz element solüsyonunun eklenmesiyle BG11 sıvı besiyeri hazır hale gelmiştir.

Algler için katı besiyeri, BG11 sıvı besiyerine % 1,5 oranında agar agar eklenmesiyle hazırlanmıştır. Nutrient Broth ve Nutrient Agar besiyerleri üretici firmanın önerdiği talimatlara uygun olarak hazırlanmıştır. Tüm besiyerleri hazırlandıktan sonra 121 °C 'de 15 dk. sterilizasyon yapılmıştır.

Teşhisi yapılan saf mikroalg kültürleri özel çalkalamalı etüvde; 100 rpm'de, 25 °C'de, 12 saat gündüz ve 12 saat gece periyodunda 15-30 gün inkübasyona bırakılmıştır. Gündüz periyodundaki ışık şiddeti 12 000 Mmol m⁻² s⁻¹ 'dir. Mikroalg örneklerinin kültüre edilmesinde floresan lambalı düzenek ve Minitron marka inkübatör kullanılmıştır.

ELISA analizlerinde toksinin varlığı Envirologix mikrosistin kiti ile saptanmış ve toksinin tayini için mikropate okuyucu kullanılmıştır.

Tablo 3.3 Siyanobakter besiyerinin içeriği

	BG11 sıvı besiyeri		İz element çözeltisi	
	Stok-1 kimyasallar	g/L	Stok-2 kimyasallar	g/L
1	NaNO ₃	150	H ₃ BO ₃	2,86
2	K ₂ HPO ₄	4	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	7,5	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,222
4	CaCl ₂ .2H ₂ O	3,6	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08
5	Sitrik asit	0,6	NaMoO ₄ .2H ₂ O	12,5
6	Ferrik amonyum sitrat	0,6	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,05
7	Na ₂ -EDTA	0,1		
8	Na ₂ CO ₃	2		

3.2. Yöntem

3.2.1. Siyanobakter ekstraktlarının hazırlanması ve muhafazası

Çalışmada kullanılan mikroalgler 4-8 hafta kadar BG11 besiyerinde, $12\ 000\ \text{mmol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ şiddetinde gün ışığı veren ışıklı çalkalamalı etüvde 12 saat gece 12 saat gündüz periyodunda $25\ ^\circ\text{C}$ 'de uygun yoğunluğa gelene kadar inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda mikroalgler $10.000\ \text{rpm}$ 'de 5dk. santrifüj edilerek, biyokütlenin olduğu pellet kısmı $60\ ^\circ\text{C}$ 'de 48 saat kurutulmaya bırakılmıştır. Kuruyan pelletler 0,5 g tartılarak, oranı 7:3 olan metanol:su 'da sonike edilmiştir (50 MHz ultrasonicator, Vibra-Cell, Sonics&Materials Inc. Danbury, CT USA). Ekstraksiyon işleminden sonra ortamdaki metanol $60\ ^\circ\text{C}$ 'de 1 gece bekletilerek uçurulmuştur. Geriye suda çözülmüş halde olan mikroalg metaboliti $-20\ ^\circ\text{C}$ 'de deepfreeze'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. ELISA Yöntemi ile Toksin Analizi

Toksin denemeleri için ekstraksiyonda saf su kullanılmıştır. Ultrasonikasyon işleminden sonra ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Ekstraktlar santrifüj kullanılarak cam tüplerde toplanmıştır [71, 149].

3.2.2.1. Ticari Test Kiti İle İndirek ELISA Analizi

Örnek Hazırlanması:

Hücreler stasyonel fazda ortamlarından santrifüjle uzaklaştırılmıştır ve etüvde $60\ ^\circ\text{C}$ 'de kurularak $-20\ ^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir. Elisa analizi için bu hücreler sonikasyon probu ile % 75 metanol içinde parçalanmıştır. Parçalanmış hücreler, santrifüjle ayrılan süpernatant cam viallere alınmıştır.

Deney:

- 1- Hızlı olarak her kuyuya 125ml Mikrosistin Analiz Seyreltici eklenir, tekrarlı ya da çok kanallı pipetler tercihen kullanılır.
- 2- Her biri 20ml olarak hemen Negatif Kontrol (NC), Pozitif Kontrol (C1-C3) ve örnekler (20ml S1-S8) kendi kuyularına eklenir.(Tüm reaktifler için ek bu aynı sırayla uygulanır.) Bu adımda Mikrosistin Enzim Konjugatı eklenmez.

- 3- Örnekler dökülmeden ve karıştırılmadan dikkatlice dairesel hareketlerle 20-30 saniye sallanır.

NOT: 3 ve daha fazla şeritlerin kullanımında başlatma süresini en aza indirmek için çok kanallı pipet kullanımı 1, 2, 5, 8 ve 10'uncu adımlarda tavsiye edilir.

- 1- İnkübasyon süresinde kuyularından örneklerin buharlaşmaması için üzeri bant veya parafilmle kaplanarak oda sıcaklığında 30dk. 200 rpm'de çalkalanarak inkübe edilir.
- 2- Her kuyuya 100ml Mikrosistin-Enzim Konjugatı eklenir.
- 3- 3.adımda yapıldığı gibi kuyuların içeriği iyice karıştırılır. Kuyuları bant veya parafilmle kapatılarak 30dk.boyunca ortam sıcaklığında çalkalamalı olarak inkübe edilir.
- 4- İnkübasyon sonrası dikkatlice parafilm kaplama kaldırılır ve kuvvetlice sarsılarak bir lavabo veya başka uygun bir kap içine kuyu içeriği boşaltılır. Yıkama Çözeltisi ile kuyular yıkanır. Bu işlem 4 defa tekrarlanır. Kuyuların içersinde Yıkama Çözeltisi kalmadığından emin olunur.
- 5- Her kuyuya 100ml Substrat ilave edilir.
- 6- 3.adımda yapıldığı gibi kuyuların içeriği karıştırılır. Kuyular yeni bant veya parafilmle kapatılarak 30dk.boyunca ortam sıcaklığında çalkalamalı olarak inkübe edilir.
- 7- Her kuyuya 100ml Durdurma Çözeltisi ilave edilir ve iyice karıştırılır. Renginin sarıya dönmesi gerekir.

NOT: Durdurma Çözeltisinin ilavesinden sonra 30dk.içerisinde 450nm'de spektrofotometre ile okuma yapılır.

% Bo= (Ortalama Kalibratör veya Örnek OD Değeri/Ortalama Negatif Kontrol OD) '100

Kalibratör	% Bo
0,16 ppb	%77-91
0,60 ppb	%41-61
2,50 ppb	%11-21

Kalibratörün % Bo'su hesaplandığında istenilen aralıkta olmasına dikkat edilmelidir. Aralıklar arasında çıkmayan sonuçlarda seyreltme işlemleri yapılmalıdır.

3.2.3. Toksik örneklerin 16S rRNA'larına göre tanımlanmaları

Çalışmada kullanılan izolatları toksin içerikleri ELISA (ENVIROLOGIX) testi ile tespit edilmiştir. Toksin içeren izolatların DNA'sı izole edildikten sonra 16S rRNA sekansları için CYA106F, CYA -781R primerleri kullanılmıştır. CYA106F ve CYA -781R primerleri ile 640 bp'lik bir alan çoğaltılmıştır. Çoğaltılan bu bölgenin DNA'sı NCBI gen bankasında var olan diğer bakteriyel 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırılmıştır. Bu şekilde benzerlik oranları belirlenmiştir. Sekans analizleri NCBI gen bankasında bulunan diğer siyanobakterlere ait dizi analizleri ile kıyaslanarak % homolojileri saptanmıştır.

3.2.4. Antimikrobiyal Aktivite

Tanımlamaları yapılan izolatlar Nutrien Broth'da 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Nutrient Broth'daki bütün test bakterileri seri dilüsyon metoduyla 10,6-10,7 cfu/ml konsantrasyona ayarlanmıştır. Aktif kültürlerden 100µl alınarak Nutrient Agar'a ekimi yapılmıştır. %1'lik test izolatıyla aşılınmış olan Nutrient Broth'ların bulunduğu petrilerde 5mm çapında kuyular açılmıştır. Bu kuyucuklara sırasıyla 1, 1,5 2, 2,5 mg/ml konsantrasyonlarındaki siyanobakter ekstraktlarından 100µl aktarılmıştır. 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu takiben antimikrobiyal aktivite test organizmalarına karşı oluşan inhibisyon alanları ölçülerek kaydedilmiştir. Testler çift paralel çalışılmıştır ve sonuçlar inhibisyon alanının çapı cinsinden belirtilmiştir.

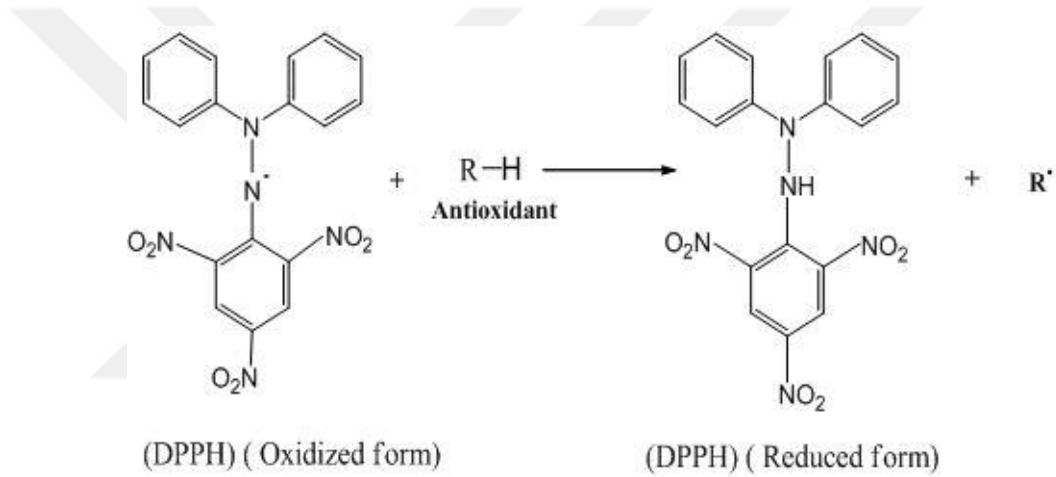
Suda çözülmüş olan siyanobakter ekstraktlarının bakteri ve funguslara karşı etkisi agar disk difüzyon yöntemine göre yapılmıştır. Mikroalglerin antimikrobiyal aktiviteleri ticari antibiyotik ve fungusit ile kıyaslanmıştır. Kullanılan antibiyotik SCF: Sulbactam/Cefoperazone 105µg (Oxoid) ; fungusit ise Nistatin 30µg/ml (Oxoid)'dir. 24 saatlik inkübasyon sonucunda bakteriler ve fungusun antibiyotik ve fungusite karşı gösterdikleri etki / direnç zon çapları ölçülerek hesaplanmıştır.

Bu çalışmada test mikroorganizmaları olarak *Candida albicans* ATCC 10239, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27653,

Listeria monocytogenes ATCC 7644 kullanılmıştır. Bakteriler için nutrient broth ve nutrient agar; fungus için nutrient broth ve PDA (potato dextrose agar) kullanılmıştır.

3.2.4.1. Siyanobakter ekstraktlarının hazırlanması:

10 günlük siyanobakter kültürleri santrifüj edilip üzerindeki pellet kısmı alındıktan sonra hassas terazi kullanılarak tartılmıştır ve antimikrobiyal ajanların ekstraksiyonu için kullanılmıştır. 0,5g tartılan pelletler 10 ml etanol içinde ekstrakte edilmiştir. Bütün ekstraktlar +4 °C’de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.2 4 DPPH Radikali [129]

3.2.5. Antioksidan Aktivite

3.2.5.1. DPPH Yöntemi

Örneklerin antioksidan aktivitelerinin ölçümü için DPPH yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem ile antioksidan aktivitesi ölçümü, antioksidanların DPPH gibi serbest radikalleri absorbe ederek yakalaması esasına dayanmaktadır. Farklı örnekler ile yapılan çalışmalarda seyreltme oranlarının belirlenebilmesi için, spesifik DPPH yöntemleri oluşturulması gerekmektedir. DPPH maddesinin 0,004 g’ı 100 ml MeOH (metanol) ile çözdürülmüştür. Karanlık şişede folyo ile sarılı olarak manyetik karıştırıcıda çözüne kadar karıştırılmıştır. Seyreltik ekstrakt çözeltilerinden farklı konsantrasyonlarda alınarak üzerlerine 1 ml DPPH çözeltisi ilave edilmiştir. Karışımlar oda sıcaklığında 30 dakika karanlık ortamda bekletilmiştir. Örneklerin absorbans değerleri

spektrofotometrik olarak 517 nm dalga boyunda okunmuştur. Sentetik antioksidan olan BHA (Butylated hydroxy-anisole) metanolde çözülmüş ve standart oluşturulmuştur. Örneklerin farklı dilüsyon oranları esas alınarak hesaplama yapılmıştır.

1. Siyanobakter ekstraktlarının 1 ml'sine DPPH çözeltisinden 1ml eklenir.
2. Karışım 30dk oda sıcaklığında inkübe edilir. 517 nm'de okuma yapılır. Siyanobakter ekstraktlarının DPPH radikali giderme aktivitesi (A kontrol- A örnek) / A kontrol x 100) formülüne göre hesaplanır.

0,004'lük (0,1mM) DPPH çözeltisin hazırlanması:

Çözelti metanolde hazırlanır.

DPPH ma=394,32 g/mol

$M=n/v$ $m=0,000 \times 0,1 \times 394,32$

$m = 0,039432 \text{ g}=3,94 \text{ mg}=4 \text{ mg}$

3.2.5.2. Metal Şelatlama Aktivitesi

3.2.5.2.1 Örneklerin Analize Hazırlanması

Örneklerin her biri ilk olarak etüvde kurutulmuştur ve daha sonra homojen halde metal havan kullanılarak öğütülmüştür. Öğütülen her bir örnek ayrı ayrı hassas terazide tartılarak ağırlıkları not edilmiştir.

Bu deney için öğütülen her bir örnekten 1g tartılıp 100 ml'lik falcon tüplerine konmuştur.

- 1- Siyanobakter ekstraktları üzerine 50µl 2 nM FeCl₂ (13 mg 50 ml saf suda çözülmüştür) ve 100µ 5mM ferrozin (37 mg 15 ml saf suda çözülmüştür) eklenmiştir.
- 2- Daha sonra tüplere 2 ml metanol eklenmiştir.
- 3- 10dk inkübasyondan sora örneklerin 562 nm'de absorbansları okunmuştur.
- 4- Fe⁺ iyonu şelatlama aktivitesi (A kontrol- A örnek) / A kontrol x 100) formülüne göre hesaplanmıştır.

Deneyde kontrol olarak saf su kullanılmıştır. Formülde verilen A kontrol değeri ortamda sadece kompleks oluşturan maddeler olan ferrozin ve Fe⁺ iyonlarının varlığındaki kontrol numunesinin absorbans değeridir. A örnek ise ortamda örnek ile Fe⁺ iyonlarının varlığındaki numunenin absorbans değeridir.

Metal şelatlama kapasitesi, fenolik bileşiklerin yapısında bulunan fonksiyonel gruplara, bu fonksiyonel grupların pozisyonuna ve bulunma miktarına bağlıdır. Yapısında –OH, -SH, -COOH, C=O, -S, -O, -PO₃H₂, -NR₂ fonksiyonel gruplarından en az iki adet bulunduran fenolik bileşiklerin şelatama özelliklerinin daha iyi olduğu tespit edilmiştir. [196]

3.2.5.3. Total Fenol Miktarı Tespiti

Total fenol içerik miktarının tayini Folin Ciocalteu metodu kullanılarak belirlenmiştir.

- 1- 0,1 ml ekstrakt 0,2 ml %50 folin ile karıştırılır. 3 dk bekletilir.
- 2- Karışıma 1 ml %2'lik Na₂CO₃ eklenir.(200ml). Karışım vortekslenir. 45 dk inkübasyona bırakılır. 760 nm dalga boyunda ölçüm yapılır.
- 3- Gallik asit standartına göre ekstraktların eş değer gallik asit miktarları belirlenir.

Kör olarak distile su kullanılmıştır.

3.2.5.4. β-karoten ve Likopen Miktarının Tespiti

- 1- 0,1 g siyanobakter ekstraktı 10 ml hekzan:aseton (6:4) karışımında çözülür. (6 ml hekzan 4 ml aseton, toplam 10 ml karışım)
- 2- Daha sonra 0,45 mM disposable filtre ile filtre edilir. Spektrofotometrede 663 nm, 505 nm, 453 nm dalga boylarında ölçümleri yapılır.

Aşağıdaki formüllere göre miktarları hesaplanmıştır.

β-karoten miktarı tayini:

$(0.216a(663)) - (0.304a(505)) + (0.452a(453))$ mg / 100 ml'deki β-karoten miktarıdır.

Likopen miktarı tayini:

$(-0.0458a(663)) + (0.372a(505)) - (0.0806a(453))$ mg /100 ml'deki likopen miktarıdır.

4.BÖLÜM

BULGULAR

Çalışmamızda kullanılan örnekler Kızılırmak nehrinden toplanmıştır. Toplam 31 adet siyanobakter suşu izole edilmiştir. Bu suşların morfolojik yapılarına ve görüntülerine göre identifikasyonları yapılmıştır. Suşlar, Rippka ve ark.(1979) ile Bone ve ark.(2001)'e göre tanımlanmıştır. Aşağıda verilen tabloda izole edilen suşların cins adları ve izole edildiği su kaynakları verilmiştir.

Tablo 4. Siyanobakter suşlarının izole edildiği kaynaklar ve cins adları

Suş Kodları*	Orijin	Tür
N2	Kızılırmak	<i>Leptolyngbya</i> sp.
N9	Kızılırmak	<i>Oscillatoria</i> sp.
N15	Kızılırmak	<i>Oscillatoria</i> sp.
N16	Kızılırmak	<i>Oscillatoria</i> sp.
N23	Kızılırmak	<i>Oscillatoria</i> sp.
N24	Kızılırmak	<i>Oscillatoria</i> sp.
N27	Kızılırmak	<i>Oscillatoria</i> sp.
N28	Kızılırmak	<i>Oscillatoria</i> sp.
N29	Kızılırmak	<i>Oscillatoria</i> sp.
N32	Kızılırmak	<i>Oscillatoria</i> sp.
N36	Kızılırmak	<i>Oscillatoria</i> sp.
N38	Kızılırmak	<i>Oscillatoria</i> sp.
N46	Kızılırmak	<i>Oscillatoria</i> sp.
N49	Kızılırmak	<i>Oscillatoria</i> sp.
N52	Kızılırmak	<i>Oscillatoria</i> sp.
N53	Kızılırmak	<i>Oscillatoria</i> sp.
N62	Sultan Sazlığı	<i>Oscillatoria</i> sp.
N65	Sultan Sazlığı	<i>Oscillatoria</i> sp.
N67	Asi Nehri	<i>Oscillatoria</i> sp.
N68	Asi Nehri	<i>Oscillatoria</i> sp.
N69	Asi Nehri	<i>Oscillatoria</i> sp.
N71	Kızılırmak	<i>Oscillatoria</i> sp.

N77	Kızılırmak	<i>Oscillatoria</i> sp.
N79	Kızılırmak	<i>Chlorococcum</i> sp.
N80	Sultan Sazlığı	<i>Oscillatoria</i> sp.
N81	Kızılırmak	<i>Oscillatoria</i> sp.
N82	Kızılırmak	<i>Oscillatoria</i> sp.
N84	Kızılırmak	<i>Oscillatoria</i> sp.
N85	Kızılırmak	<i>Oscillatoria</i> sp.
N87	Kızılırmak	<i>Oscillatoria</i> sp.
N88	Kızılırmak	<i>Oscillatoria</i> sp.
Toplam	31	

*Suş kodları Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonuna göre verilmiştir.

4.1. ELISA Yöntemi ile ekstraktların toksin içeriklerinin belirlenmesi

Bu çalışmada kullanılan 31 izolatin tamamı toksin içeriklerinin tayini için ELISA (ENVIROLOGIX) yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu izolatlardan 5 tanesinde toksin saptanmıştır. Ticari ELISA kiti kullanılarak yapılan mikrosistin analizinde en yüksek toksin düzeyi *Oscillatoria* sp. N71’de (1,79 ppb) bulunmuştur. Ardından 1,54 ppb ile *Leptolyngbya* sp. N2 en yüksek olarak izlemiştir. Mikrosistin oranı en düşük izolat *Oscillatoria* sp. N53’de 1,07 ppb olarak belirlenmiştir. Tablo 6’da ticari ELISA kiti kullanılarak elde edilen analiz sonuçları verilmiştir. ELISA ile toksin tespit edilen örneklerin fotoğrafları Şekil 1-5’te verilmiştir.

Tablo 4.1 Siyanobakter ekstraktların mikrosistin miktarları

İzolatlar	Mikrosistin miktarları (ppb)
<i>Leptolyngbya</i> sp.N2	1,54
<i>Oscillatoria</i> sp.N9	-
<i>Oscillatoria</i> sp.N15	-
<i>Oscillatoria</i> sp.N16	-
<i>Oscillatoria</i> sp.N23	-
<i>Oscillatoria</i> sp.N24	-
<i>Oscillatoria</i> sp.N27	-
<i>Oscillatoria</i> sp.N28	-

<i>Oscillatoria</i> sp.N29	-
<i>Oscillatoria</i> sp.N32	-
<i>Oscillatoria</i> sp.N36	-
<i>Oscillatoria</i> sp.N38	1,16
<i>Oscillatoria</i> sp.N46	-
<i>Oscillatoria</i> sp.N49	-
<i>Oscillatoria</i> sp.N52	-
<i>Oscillatoria</i> sp.N53	1,07
<i>Oscillatoria</i> sp.N62	-
<i>Oscillatoria</i> sp.N65	-
<i>Oscillatoria</i> sp.N67	-
<i>Oscillatoria</i> sp.N68	-
<i>Oscillatoria</i> sp.N69	-
<i>Oscillatoria</i> sp.N71	1,79
<i>Oscillatoria</i> sp.N77	-
<i>Chlorococcum</i> sp.N79	-
<i>Oscillatoria</i> sp.N80	-
<i>Oscillatoria</i> sp.N81	-
<i>Oscillatoria</i> sp.N82	1,36
<i>Oscillatoria</i> sp.N84	-
<i>Oscillatoria</i> sp.N85	-
<i>Oscillatoria</i> sp.N87	-
<i>Oscillatoria</i> sp.N88	-

(-) = tespit edilememiştir

4.2. Toksik örneklerin 16S rRNA'larına göre tanımlanmaları

Leptolynbya sp.N2, *Oscillatoria* sp.N38, *Oscillatoriaa* sp.N53, *Oscillatoria* sp.N71, *Oscillatoria* sp.N82 izolatlarının DNA'sı izole edildikten sonra 16S rRNA sekansları için CYA-106F, CYA-781R primerleri kullanılmıştır. CYA-106F ve CYA-781R primerleri ile 640 bp'lik bir alan çoğaltılmıştır. Bu bölgenin DNA'sı NCBI Gen Bankası'nda var olan diğer bakteriyel 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırılarak benzerlik oranları tespit edilmiştir.

Sekans analizleri NCBI Gen Bankası'nda bulunan diğer siyanobakterilere ait dizi analizleri ile kıyaslanarak % homolojisi saptanmıştır. Karşılaştırma sonucunda *Leptolyngbya* sp.N2 izolatu *Leptolyngbya* sp. suşuna % 98 oranında, *Oscillatoria* sp.N38 izolatu *Oscillatoria tenuis* suşuna % 99 oranında, *Oscillatoria* sp.N53 izolatu *Planktothrix rubescens* suşuna % 99 oranında, *Oscillatoria* sp.N71 izolatu *Microcoleus vaginatus* suşuna % 99 oranında *Oscillatoria* sp.N82 izolatının *Oscillatoria tenuis* suşuna % 98 oranında benzerlik gösterdiği bulunmuştur. (Tablo 7) ELISA ile toksini tespit edilen örneklerin fotoğrafları Şekil 1-5'te verilmiştir.

Tablo 4.2 Toksik izolatların 16S rRNA sekansının NCBI database sonuçlarına göre % homolojisi

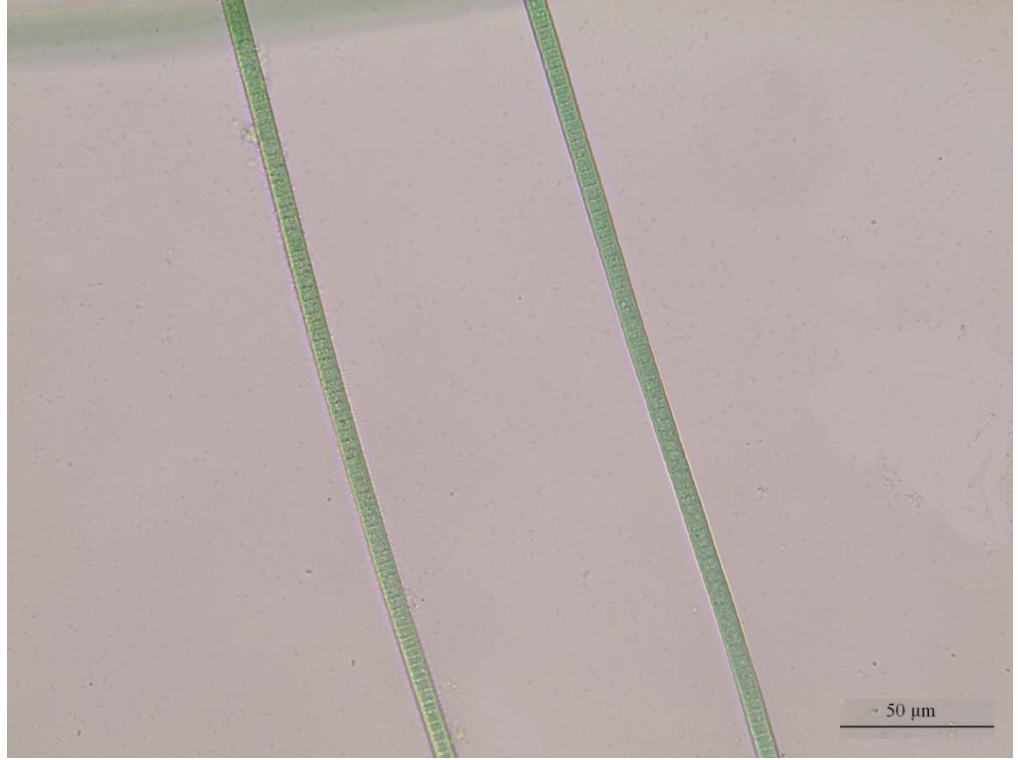
İzolat	EMBL/Gen bank no	Siyanobakter türleri	% Homoloji
N2	JX088103.1	<i>Leptolyngbya</i> sp.	%98
N38	JQ256480.1	<i>Oscillatoria tenuis</i>	%99
N53	HM773409	<i>Planktothrix rubescens</i>	%99
N71	JQ712605.1	<i>Microcoleus vaginatus</i>	%99
N82	JQ256480.1	<i>Oscillatoria tenuis</i>	%98



Resim 4.2 *Leptolyngbya* sp.N2 izolatının 100x10x4 büyütmede ışık mikroskopugörüntüsü



Resim 4.3 *Oscillatoria tenuis* N38 izolatının 100x10x4 büyütmede ışık mikroskobu görüntüsü



Resim 4.4 *Planktothrix rubescens* N53 izolatının 100x10x4 büyütmede ışık mikroskobu görüntüsü



Resim 4.5 *Microcoleus vaginatus* N71 izolatının 100x10x4 büyütmede ışık mikroskobu görüntüsü



Resim 4.6 *Oscillatoria tenuis* N82 izolatının 1000x10x4 büyütmede ışık mikroskobu görüntüsü

4.3 Antimikrobiyal Aktivite

Toplam 25 izolatın 18'i siyanobakter ve 7'si Chlorophyta 'ya ait olup, bu izolatların ekstraktları *Candida albicans* ATCC 10239, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27653, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 patojen fungus ve bakterilere karşı etkisi araştırılmıştır.

Çalışmada kullanılan izolatlardan *Leptolyngbya sp. N2*, *Oscillatoria sp. N38*, *Oscillatoria sp. N71* ekstraktları *Candida albicans*'a Nistatin'e etkisinden daha yüksek etki göstermiştir. Kullanılan patojenlerin hepsine *Leptolyngbya sp. N2*, *Chlorococcum sp. N8*, *Oscillatoria sp. N29*, *Oscillatoria sp. N38*, *Chlorococcum sp. N48*, *Oscillatoria sp. N71*, *Oscillatoria sp. N82* izolatlarından elde edilen ekstraktlar etki göstermiştir. Gram (+) patojen bir bakteri olan *Bacillus subtilis*'e 25 mikroalg ekstraktının 20'sinin antimikrobiyal etki gösterdiği bulunmuştur. Genel olarak mikroalg ekstraktları *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 gibi gram(+)’ler *Escherichia coli* ATCC 35218, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27653 gibi gram (-)’ler gibi neredeyse aynı antimikrobiyal etkiyi göstermişlerdir. 25 adet izolatın sayısal olarak patojenlere karşı antibakteriyel ve antifungal etkileri sırasıyla *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 > *Bacillus subtilis* ATCC 6633 = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27653 > *Escherichia coli* ATCC 35218 > *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 > *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 = *Candida albicans* ATCC 10239'dır. İzolatların patojenlere karşı antimikrobiyal ve antifungal etkileri Tablo'4.3 te verilmiştir.

Tablo 4.3. Mikroalg ekstraktlarının antimikrobiyal etkileri

İzolatlar	Antimikrobiyal Aktivite						
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27653	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	<i>Candida albicans</i> ATCC 10239
<i>Leptolyngbya</i> sp. N2	9,4	8,6	7,9	8,8	10,6	6,5	12,5
<i>Chlorococcum</i> sp. N8	3,4	5,2	3,7	4,8	5,5	4,2	3,6
<i>Oscillatoria</i> sp. N9	4,1	6,2	4,1	3,7	5,9	4,3	-
<i>Oscillatoria</i> sp. N111	-	2,5	-	4,2	3,7	-	-
<i>Chlorococcum</i> sp. N11	2,4	3,8	-	2,6	5,4	3,3	4,2
<i>Chlorococcum</i> sp. N12	6,5	4,3	3,7	5,2	2,8	5,1	-
<i>Oscillatoria</i> sp. N16	5,8	5,3	4,4	-	5,2	-	-
<i>Chlorococcum</i> sp. N21	4,2	3,7	-	-	-	-	-
<i>Oscillatoria</i> sp. N28	3,9	5,3	4,8	-	-	-	-
<i>Oscillatoria</i> sp. N29	3,7	3,8	2,5	2,9	4,2	5,8	5,2
<i>Oscillatoria</i> sp. N32	4,4	5,2	5,4	-	4,9	-	5,8
<i>Oscillatoria</i> sp. N38	5,9	7,9	4,7	7,3	7,5	6,2	10,2
<i>Synechocystis</i> sp. N39	-	-	3,5	-	3,8	-	4,6
<i>Scenedesmus</i> sp. N46	3,5	2,2	-	-	3,5	-	-
<i>Chlorococcum</i> sp. N48	3,8	4,6	4,3	5,2	5,8	3,8	5,5
<i>Oscillatoria</i> sp. N49	4,1	5,4	3,7	-	-	-	-
<i>Oscillatoria</i> sp. N53	5,2	7,7	5,8	8,2	7,6	5,4	-
<i>Chlorococcum</i> sp. N79	4,6	3,3	3,7	5,4	6,1	2,8	4,8
<i>Oscillatoria</i> sp. N71	9,6	9,9	8,6	10,9	12,7	7,9	14,8
<i>Oscillatoria</i> sp. N78	-	-	-	2,7	3,8	-	-
<i>Oscillatoria</i> sp. N82	7,3	6,9	5,4	6,2	7,4	3,3	7,7
<i>Oscillatoria</i> sp. N83	-	-	2,8	3,7	4,2	-	-
<i>Oscillatoria</i> sp. N85	-	-	-	-	-	-	-
<i>Oscillatoria</i> sp. N87	3,6	4,6	4,9	3,2	5,1	-	-
<i>Oscillatoria</i> sp. N88	3,3	3,9	-	-	-	-	4,5
SCF:	26	20	18	22	19	17	TE
Sulbactam/ Cefoperazone							
Fungostatin	TE	TE	TE	TE	TE	TE	8,6

4.4. Antioksidan Aktivite

4.4.1. DPPH serbest radikal yakalama etkileri

Test edilen mikroalg ekstralarının farklı konsantrasyonlarının serbest radikal olan DPPH'ı yakalama aktivitelerine bakıldığında her bir ekstre için konsantrasyon oranı arttıkça buna bağlı olarak aktivite oranının da yükseldiği tespit edilmiştir. 31 siyanobakter izolatının DPPH yakalama aktiviteleri kıyaslandığında en yüksek oran *Oscillatoria sp.*N38 (0,27 mg/ml) izolatında görülmüştür. Siyanobakter ekstralarının çalışmada kullanılan bütün konsantrasyonlarının ortaya çıkardığı DPPH radikallerinin inhibisyon etkileri hesaba katılarak IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. En düşük aktiviteyi *Oscillatoria sp.*N46 izolatının (675,5 mg/ml) gösterdiği saptanmıştır.

Tablo 4.4.1 31 siyanobakter izolatının DPPH IC₅₀ değerleri (mg/ml)

Siyanobakter örnekleri	DPPH IC ₅₀ değerleri
N2	23,4
N9	103,6
N15	110,3
N16	120,4
N23	151,3
N24	54,7
N27	47,4
N28	53,6
N29	287,8
N32	135,0
N36	126,9
N38	10,27
N46	675,5
N49	121,8
N52	163,4
N53	25,5
N62	219,1
N65	101,4
N67	463,7
N68	251,1
N69	87,2
N71	11,8

N77	241,1
N79	162,0
N80	114,2
N81	362,2
N82	19,9
N84	207,0
N85	208,6
N87	159,8
N88	189,3

4.4.2. Metal iyonlarını şelatlama aktivitesi

Test edilen mikroalg ekstralarının farklı konsantrasyonlarının metal şelatlama aktivitelerine bakıldığında her bir ekstre için konsantrasyon oranı arttıkça buna bağlı olarak aktivite oranının da yükseldiği tespit edilmiştir. 31 siyanobakter izolatının metal iyonlarını şelatlama aktivitesi kıyaslandığında en yüksek oran *Oscillatoria* sp.N81 (464,5) izolatında olduğu görülmüştür. En düşük aktiviteyi *Oscillatoria* sp.N88 (1,845) izolatı göstermiştir. Siyanobakter ekstralarının çalışmada kullanılan bütün konsantrasyonlarının ortaya çıkardığı metal şelatlama inhibisyon etkileri hesaba katılarak IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

Tablo 4.4.2 31 Siyanobakter izolatının metal şelatlama aktivitesi için IC₅₀ değerleri

Siyanobakter örnekleri	IC ₅₀ değerleri (mg/ml)
N2	191,8
N9	134,5
N15	212,2
N16	219,5
N23	139,2
N24	120,4
N27	129,4
N28	113
N29	302,7
N32	101,2
N36	100,3
N38	300,1

N46	189,1
N49	211,1
N52	182,6
N53	149
N62	177,5
N65	162
N67	217,6
N68	226
N69	112,8
N71	269,9
N77	117,1
N79	429,1
N80	155,3
N81	464,5
N82	149
N84	276,6
N85	431,8
N87	73,9
N88	61,8

4.4.3. β -karoten, likopen ve total fenol içeriklerinin belirlenmesi

Antioksidan özelliğe sahip biyoaktif bileşikler baz alındığında çalışılan mikroalg izolatlarının β -karoten, likopen ve total fenol içerikleri tespit edilmiştir. β -karoten içeriği en fazla olan izolat *Oscillatoria* sp.N88 (1,15) 'dir. En az β -karoten içeriğine sahip olan izolat ise *Leptolyngbya* sp.N2 (0,17) 'dir.

Likopen miktarı en fazla *Oscillatoria* sp.N88 (0,73) izolatında tespit edilmiştir. Likopen miktarı en az olan izolat *Oscillatoria* sp.N53 (0,02)'tür.

Total fenol miktarına bakıldığında en fazla *Leptolyngbya* sp.N2 (341,2) izolatında olduğu görülmüştür. En az fenolik içeriğe sahip olan izolat *Oscillatoria* sp.N27 (25,25) 'de tespit edilmiştir.

Tablo 4.4.3 31 siyanobakter izolatının β -karoten, likopen ve total fenol içerikleri

Siyanobakter türleri	β -karoten(mg/g)	Likopen (mg/g)	Total fenol miktarı(mg/g)
N2	0,17	0,03	341,2
N9	1,09	0,71	110,6
N15	0,85	0,59	204,4
N16	0,88	0,67	245,5
N23	0,82	0,64	255,2
N24	-	-	293
N27	-	-	25,2
N28	0,89	0,55	104,7
N29	0,89	0,63	119,5
N32	0,84	0,64	257,3
N36	0,85	0,64	235,2
N38	0,66	0,13	337,9
N46	-	-	131,4
N49	0,82	0,56	276,5
N52	0,89	0,56	292,7
N53	0,18	0,02	314,4
N62	0,86	0,61	230,1
N65	0,86	0,60	235,5
N67	-	-	169,6
N68	0,84	0,65	156
N69	0,89	0,68	271,1
N71	0,44	0,06	315,7
N77	0,64	0,64	143,5
N79	0,91	0,58	203,6
N80	-	-	83,34
N81	-	-	54,93
N82	0,24	0,07	308,5
N84	0,91	0,62	253,03
N85	0,88	0,66	227,63
N87	0,87	0,67	273,6
N88	1,14	0,73	170,8

(-) =tespit edilememiştir.

5.BÖLÜM

TARTIŞMA

İçme ve kullanma sularında bulunabilen siyanotoksinlerin insan ve hayvan sağlığı açısından ciddi tehlike oluşturduğu bilinmektedir. Son yıllarda mikroalglerin ürettikleri toksinlerin hem çevreye hem de mikroorganizmalara karşı etkileri araştırılmıştır ve buna bağlı olarak HPLC analizi ile toksin karakterizasyonları yapılmaktadır. Bugüne kadar yaklaşık 40 siyanobakter cinsinde siyanotoksin olduğu tespit edilmiştir. [166]

Şimdiye kadar bu alanda birçok mikroalg ile çalışılmış ve birçok toksinin tanımı yapılmıştır. Siyanobakterlerden toksik olduğu tespit edilmiş cinsler *Microcystis* spp., *Planktothrix* spp., *Oscillatoria* spp., *Nostoc* spp., *Anabaena* spp., *Anabaenopsis* spp., *Haphalosiphon* spp., *Cylindrospermopsis* spp., *Synechococcus* spp., *Gloeotrichia* spp., *Schizothrix* spp., *Synechocystis* spp. ‘tir.[167]

Bu çalışmada çeşitli su kaynaklarından toplam 31 adet siyanobakter izolatı elde edilmiş olup bunların toksin ekstraksiyonu yapılmıştır. İzolat ekstraktlarının çeşitli klinik patojenlere karşı antimikrobiyal etkileri de incelenmiştir. Aynı zamanda antioksidan aktivite olarak DPPH radikalini süpürme etkileri ve metal iyonlarını şelatlama aktiviteleri belirlenmiş; β -karoten, likopen ve total fenolik içeriklerine de bakılmıştır.

Bu çalışmada izole edilen izolatlara ait ekstraktların toksin içerikleri ELISA yöntemi ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *Leptolyngbya* sp.N2, *Oscillatoria* sp. N38, *Oscillatoria* sp. N53, *Oscillatoria* sp. N71, *Oscillatoria* sp.N82 izolatlarında mikrosistin bulunmuştur. Bu izolatların mikrosistin içerikleri sırasıyla *Oscillatoria* sp.N71 > *Leptolyngbya* sp.N2> *Oscillatoria* sp.N82> *Oscillatoria* sp.N38> *Oscillatoria* sp.N53 şeklindedir. Bu sonuçlar ile antimikrobiyal etkiler birbirine paralellik göstermektedir. Çalışmada toksini tespit edilen izolatlar aynı zamanda patojen bakterilere ve *Candida albicans*’a karşı yüksek antimikrobiyal etkiyi göstermişlerdir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre izolatların toksin içerikleri ile antimikrobiyal etkileri arasında bir korelasyon olduğu görülmektedir. Bu izolatların ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerinin yüksek olması aynı zamanda çevre bakımından çok toksik olan mikrosistin içermeleri bu izolatları biyoteknolojik açıdan önemli kılmaktadır.

Bu çalışmada toksin içeren *Leptolyngbya* sp.N2, *Oscillatoria* sp.N38, *Oscillatoria* sp.N53, *Oscillatoria* sp.N71, *Oscillatoria* sp. N82 izolatlarının DNA'ları izole edilmiş olup 16SrRNA'larına göre de tanımlamaları yapılmıştır. Sırası ile *Leptolyngbya* sp.N2 izolatu *Leptolyngbya* sp. suşuna % 98 oranında, *Oscillatoria* sp.N38 izolatu *Oscillatoria tenuis* suşuna % 99 oranında, *Oscillatoria* sp.N53 izolatu *Planktothrix rubescens* suşuna % 99 oranında, *Oscillatoria* sp.N71 izolatu *Microcoleus vaginatus* P09 suşuna % 99 oranında, *Oscillatoria* sp.N82 izolatının *Oscillatoria tenuis* suşuna % 98 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalarda *Leptolyngbya* sp. [168] *Oscillatoria tenuis* [139]*Planktothrix rubescens* [169] *Microcoleus vaginatus* [170] suşlarında mikrosistin olduğu bulunmuştur.

2008 yılında Fathalli ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada Mısır'da elde edilen sonuçlara göre mikrosistinlerin izolasyon ve karakterizasyonlarına bağlı olarak *Microcystis aeruginosa* [171] ve *Oscillatoria tenuis* [139]cinslerinde mikrosistin tespit edildiği bildirmişlerdir.

Dixit ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptığı bir çalışmada morfolojik özellikleri ve 16s rRNA sekans analizleri baz alınarak yapılan analizde *Oscillatoria* sp.RBD01 ve *Leptolyngbya* sp.RBD05 türleri toksik bulunmuştur.

Afef ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptığı bir çalışmada *Oscillatoria tenuis* cinsinin toksin içerdiği tespit edilmiştir.

2017 yılında Zoschke ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada *Planktothrix rubescens*'in demetile (demethylated) mikrosistin ürettiği tespit edilmiştir. 2015 yılında Marie-Eve Garneau ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada filamentöz siyanobakter olan *Planktothrix rubescens*'in mikrosistin ürettiği bildirilmiştir.

Antimikrobiyal aktivite çalışmasında 25 adet mikroalg izolatının *Candida albicans* ATCC 10239, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Echerichia coli* ATCC 35218, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Pseudomonas aureginosa* ATCC 27653, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644'e karşı etkileri araştırılmıştır. *Leptolyngbya* sp.N2, *Oscillatoria* sp. N38, *Oscillatoria* sp.N71 izolatlarının ekstraktları *Candida albicans*'a karşı Nistatin'den daha fazla etki gösterdiği

bulunmuştur. Mian ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptıkları çalışmada kullandıkları mikrolag izolatlarının % 9,1'i *Candida albicans*'a etki göstermiştir. Buna karşılık bu çalışmada kullanılan mikroalg izolatlarının % 48'i *Candida albicans*'a karşı etki göstermiştir. Aynı zamanda bu izolatlardan üçünün de bir fungusit olan Nistatin'den daha yüksek antifungal etki gösterdiği tespit edilmiştir. 2006 yılında, Şahlan ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise 22 adet mikroalgin antibakteriyal ve antifungal etkileri incelenmiş ve iki izolat haricindeki 20 izolatın ticari antifungal olan flukonazol kadar etki gösterdiğini bulunmuştur. Bu çalışma için ticari antifungal olan Nistatin kullanılmış ve belirtilen izolatların ekstraktlarının Nistatinden daha yüksek etki gösterdiği kanıtlanmıştır. Bir değerlendirme yapılacak olursa biyoteknolojik açıdan öneme sahip bu izolatların ekstraktlarının Nistatin fungusitine alternatif olarak endüstriyel anlamda yeni doğal ürünler olarak kullanılabilceği öngörülebilir.

Çalışmada kullanılan 25 izolattan 12'si *Candida albicans*'a, 20'si *Bacillus subtilis*'e, 21'i *Staphylococcus aureus*'a, 18'i *Echerichia coli*'ye, 16'sı *Salmonella enteritidis*'e, 20'si *Pseudomonas aureus*'a, 12'si *Listeria monocytogenes*'e karşı antimikrobiyal etki göstermiştir. Jaki ve arkadaşları 1999 yılında yaptıkları çalışmada 43 adet karasal ve Tatlısu siyanobakter ekstraktları ile çalışmış ve suşların % 16,3'ünün Gram(+), % 5,8'inin Gram(-) bakterilere karşı antimikrobiyal etki, % 10,5 'inin ise antifungal etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu iki çalışma ile kıyaslandığında bu çalışmada izole edilen suşlara ait ekstaktların toksin bakımından patojenlere karşı daha çok antimikrobiyal ve antifungal etki gösterdiği bulunmuştur. 2016 yılında Entesar A. Ahmed'in yaptığı bir çalışmada *Nostoc caeruleum*, *Spirulina platensis*, *Cylindrospermum majus*, *Oscillatoria fiformosa* ve *Chlorella vulgaris* olmak üzere 5 adet türün metanol ekstraktları 3 adet Gr (+) ve 3 adet Gr (-) bakteriye karşı antimikrobiyal etkileri incelenmiş ve en belirgin antimikrobiyal etkiyi *Chlorella vulgaris*'in gösterdiği tespit edilmiştir. 2017 yılında Davoodbasha ve arkadaşlarının yapmış olduğu başka bir çalışmada *Scenedesmus intermedius*'tan ekstrakte edilen FAME'in *Stapylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* ve *Bacillus cereus* gibi Gr(+); *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi Gr(-) ve mantarlardan *Aspergillus parasiticus* ve *Candida albicans*'a karşı yüksek antimikrobiyal ve antifungal etki gösterdiği tespit edilmiştir. 2011 yılında Silva-Stenico ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Oscillatoriales, Chroococcales, Nostocales ve Stigonematales takımlarına ait 50 ekstraktın %30'u Gr(+) bakterilere; % 17'si Gr(-)

bakterilere karşı aktif olduğu tespit edilmiştir. Aktif ekstraktların % 77'sinin *Bacillus subtilis* büyümesini inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Bu çalışmada Chroococcales takımının en etkili inhibisyon gösteren siyanobakter takımı olduğu bildirilmiştir. Osman ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptığı bir çalışmada *Fischerella sp.*, *Oscillatoria sp.*, *Anabaena sp.* türlerinin Gr (+) bakteri olan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 33018; Gr (-) bakteri olan *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 'e karşı antimikrobiyal etkileri incelenmiştir. Çözücü olarak hegzan ve metanol kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda *Oscillatoria sp.*'nin metanol ekstraktının *S.aureus* ATCC 25923'e karşı en yüksek aktiviteyi gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmadaki antimikrobiyal aktivite denemeleri incelendiğinde *Oscillatoria* türlerinin çalışılan diğer türlere oranla daha yüksek antibakteriyal etki gösterdiği saptanmıştır ve bu nedenle iyi bir antibakteriyal bileşik olarak kullanılabilceği belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan bütün patojen bakterilere ve *Candida albicans*'a karşı en yüksek antimikrobiyal etkiyi *Oscillatoria sp.* N71 göstermiştir. *Leptolyngbya sp.* N2 izolatına ait ekstraktın ise çalışmada kullanılan bütün patojen bakteri ve fungusu karşı en yüksek ikinci antimikrobiyal etki gösterdiği bulunmuştur. *Oscillatoria sp.*N85 izolatının çalışmada kullanılan hiçbir patojen bakteri ve fungusu karşı etki göstermediği saptanmıştır. Mian ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları çalışmada 22 adet karasal ve sucül siyanobakter ekstraktının çeşitli Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı etkilerini incelemişlerdir. Ekstraktların hiç biri *Escherichia coli* (ATCC 25922) ve *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) gibi Gram (-) bakterilere karşı etki göstermediği rapor edilmiştir. Bu duruma sebep, çalışmada kullanılan mikroalg türünün ve ekstraktın içeriği ile alakalı olabileceği gösterilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak toksini yüksek olan izolatların aynı zamanda yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği söylenebilir.

Mikroalglerin antimikrobiyal etkileri içerdikleri indoller, terpenler, asetojeninler, yağ asitleri ve fenoller gibi bazı kimyasal maddelerle ilgilidir [172, 173]. Bir mikroalg olan *Chaetoceros muelleri* ile yapılan bir çalışmada, algin lipid kompozisyon içeriğinin antimikrobiyal aktivitede etkin olduğu tespit edilmiştir [174]. *Dunaliella salina* ile yapılan bir çalışmada yağ asitleri, α ve β -ionone, β -cyclocitral, neophytadiene ve phytol gruplarının antimikrobiyal aktiviteden sorumlu oldukları bildirilmiştir [175].

Aydaş ve arkadaşları da fenol bileşiklerinin birçok biyolojik aktiviteden sorumlu olduğunu ve hususi mikroalglerde antimikrobiyal etkiden sorumlu en önemli faktör olduğunu göstermişlerdir [176].

Ramos ve arkadaşlarının 2015 yılında yapmış olduğu bir çalışmada toksik olan *Microcystis*, *Anabaena* ve *Nostoc* cislerinin aynı zamanda antimikrobiyal, antikanser, antiviral ve antifungal etkilerinin de olduğunu belirtilmiştir. Bu çalışmada mikrosistin-LR içeren *Microcystis aeruginosa* RST 9501 cinsinin patojenik *Mycobacterium tuberculosis* bakterisine karşı antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiş olup bu etkinin içerdiği toksinden kaynaklandığı kanıtlanmıştır. Siyanobakterilerin ürettikleri toksin gibi sekonder metabolitlerin sadece hastalık yapıcı ajanlar olmadığı aynı zamanda bu metabolitlerin biyoaktif moleküller olduğu son zamanlarda araştırmacıların dikkat çektiği konulardan bir tanesidir. Bu çalışmada belirtilen; peptitlerdeki aminoasit kalıntılarının patojenik mikroorganizmalara karşı aktiviteyi değiştirdiği ve aslında antibakteriyel aktivite üzerinde önemli etkisinin olduğu kanıtlanmıştır.

Barboza ve arkadaşlarının 2017 yılında yapmış oldukları bir çalışmada *Romeria gracilis* ve *Synechococcus spp.*'nin ethanol ekstraktlarının patojenik bakteri olan *Pseudomas aeruginosa*'nın büyümesini engelledikleri tespit edilmiştir.

Serbest radikalleri yakalama özelliği antioksidanların bilinen bir özelliğidir. Antioksidan bileşikler insan sağlığı için ve koroner kalp hastalıkları, antitümör aktivite ve karsinogeneze sebep olan inflamasyon ve mutagenез gibi bir takım hastalıkların önlenmesinde ciddi bir role sahiptir. [177, 178]

Bu çalışmada kullanılan izolatlara ait ekstraktların antioksidan aktivitelerine bakıldığında, serbest radikal olan DPPH'ı yakalama aktivitesi en yüksek oran *Oscillatoria sp.*N38 (10,27 mg/ml) izolatında; en düşük oran *Oscillatoria sp.*N46 (675,5 mg/ml) izolatında saptanmıştır. DPPH yakalama aktivitesi en yüksek olan izolat *Oscillatoria sp.*N38 'in aynı zamanda mikrosistin içerdiği de belirlenmiştir. Hossain ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları bir çalışmada sırasıyla *Oscillatoria sp.*, *Lyngbya sp.*, *Microcystis sp.* ve *Spirulina sp.* olmak üzere toplam 4 siyanobakteri türü ile çalışmışlar ve en yüksek DPPH yakalama aktivitesi *Oscillatoria sp.* türünde saptanmıştır. Toksin içeren izolatların DPPH radikalini yakalama aktivitelerine bakıldığı zaman; DPPH aktiviteleri sırasıyla *Osillatoria sp.* N38 > *Oscillatoria sp.*N71

> *Oscillatoria* sp.N82> *Leptolyngbya* sp.N2 > *Oscillatoria* sp. N53 izolatları olacak şekilde sıralanabilir.

Aydaş ve arkadaşlarının 2012 yılında yapmış olduğu bir çalışmada DPPH yakalama aktivitesine bakılmış ve en düşük aktivite *Leptolyngbya* sp. BASO704 cinsinde (IC₅₀= 212.04) tespit edilmiştir. Martel ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptığı bir çalışmada *Nostoc* sp., *Leptolyngbya protospira*, *Nodularia spumigena* ve *Phormidiochaete* sp. türlerinin BHA ve BHT standartlarının solüsyonlarına göre yüksek konsantrasyonlarının DPPH yakalama aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir. Konsantrasyon oranı arttıkça DPPH radikali yakalama etkisinin doğru orantılı bir şekilde artış gösterdiği çalışmalarda bildirilmiştir.

Singh ve arkadaşlarının 2017 yılında yapmış olduğu bir çalışmada farklı genuslara ait 20 siyanobakter suşu izole edilmiş ve bunların DPPH yakalama aktivitelere bakılmıştır. İzole edilen suşlar *Anabaena*, *Nostoc*, *Microcheate*, *Oscillatoria*, *Synechocystis*, *Hapalosiphon*, *Mastigocladus*, *Scytonema*, *Westiellopsis*, *Cylindrospermum*, *Aulosira*, *Chroococcus*, *Lyngbya*, *Calothrix*, *Dichothrix*, *Limnothrix*, *Phormidium* genuslarına aittir. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek DPPH yakalama aktivitesini *Anabaena constricta* türü göstermiştir. En düşük DPPH aktivite ise *Microcheate tenera* cinsinde saptanmıştır. Hossain ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptığı bir çalışmada en yüksek DPPH yakalama aktivitesini *Oscillatoria* sp. ve bunu takiben *Lyngbya* sp.göstermiştir. Bizim yaptığımız çalışmada da en yüksek DPPH yakalama aktivitesini *Oscillatoria* sp.N38 izolatı göstermiştir. Araştırmacılar bu sonuçları değerlendirdiğinde *Oscillatoria* sp. ve *Lyngbya* sp.'nin beslenme, eczacılık ve diğer endüstriler için mükemmel bir kaynak olabileceğine dair öngörude bulunmuşlardır.

Bir diğer antioksidan aktivite belirleme çalışması olan metal iyonlarını şelatlama aktivitelere bakıldığında, bu çalışmada en yüksek metal iyonlarını şelatlama aktivitesi gösteren izolat *Oscillatoria* sp.N81 (464,5 mg/ml) 'dir. En düşük aktiviteyi *Oscillatoria* sp.N88 (61,8 mg/m) izolatı göstermiştir. Toksin içeren izolatların metal şelatlama aktiviteleri sırasıyla *Oscillatoria* sp.N38 > *Oscillatoria* sp.N71 > *Leptolyngbya* sp.N2 > *Oscillatoria* sp.N53 = *Oscillatoria* sp.N82 'dir.

Hossain ve arkadaşlarının 2016 yılında *Oscillatoria sp.*, *Lyngbya sp.*, *Microcystis sp.* ve *Spirulina sp.* ile yaptıkları bir çalışmada en yüksek metal şelatlama aktivitesi *Oscillatoria sp.* türünde görülmüştür. Aydaş ve arkadaşlarının 2012 yılında yapmış olduğu bir çalışmada ise yine *Oscillatoria sp.*'nin en yüksek metal şelatlama aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir. Singh ve arkadaşlarının 2017 yılında yapmış olduğu bir çalışmada siyanobakterlerin demir şelatlama aktivitelerine bakıldığında en belirgin demir şelatlama aktivitesi *Anabaena constricta*, *Synechocystis sp.*, *Cylindrospermum sp.*, *Oscillatoria acuta*, *Phormidium tenue*, *Anabaena doliolum*'da görülmüştür. Demir şelatlama aktivitesinin konsantrasyona bağlı olarak değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir.

Hücrel sistemde metal iyonlarının fazlalığı çeşitli anomalilere yol açabilir. Siyanobakter ekstraktlarının metal şelatlama aktiviteleri çok büyük öneme sahiptir. Geçiş metal iyonları oksidatif hasara yol açabilir. Siyanobakteriyel hücrel bileşenlerinin bu tarz faaliyetleri çevresel stres koşulları altında bu organizmalara karşı koruyucu bir görevi olduğu düşünülmektedir. [179]

Çalışmada kullanılan izolatların total fenol içeriklerine bakıldığında, en yüksek total fenol içeriğine sahip olan izolatın *Leptolyngbya sp.*N2 (341,2 mg/g) olduğu görülmektedir. En düşük total fenol içeriğe sahip izolat *Oscillatoria sp.*N27'dir. Total fenol içeriği en yüksek olan türün aynı zamanda toksin içerdiği de belirlenmiştir. Total fenol içeriği yüksek olan bu izolatın toksin içeriğinin de yüksek olduğu bulunmuştur. Toksin içeren izolatların total fenol içerikleri kıyaslandığında sırasıyla *Leptolyngbya sp.*N2 > *Oscillatoria sp.*N71 > *Oscillatoria sp.*N38 > *Oscillatoria sp.*N82 > *Oscillatoria sp.* N53 olduğu görülmektedir. Bu sonuçlardan yola çıkarak toksin içeren izolatların total fenol içeriklerinin yüksek olduğu ve birbiri ile korelasyon gösterdiği söylenebilir.

Yapılan antioksidan çalışmalar incelendiğinde *Oscillatoria* türlerinin iyi derecede antioksidan etki gösterdiği saptanmış ve bu etkiden sorumlu olan maddenin fikosiyanin olabileceği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar *Oscillatoria* türlerinin doğal bir antioksidan besin olabileceği görüşünü desteklemektedir.

2016 yılında Entesar A. Ahmed'in yaptığı bir çalışmada siyanobakterlerin total fenol içeriğine bakıldığında en yüksek değer *Chlorella vulgaris*'te gözlenmiştir. Bu türün antimikrobiyal etkisinin de yüksek bulunduğu gözlemlenmiştir. Hossain ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada total fenol içeriğinin en yüksek olduğu tür *Lyngbya sp.*

olarak tespit edilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada total fenol içeriği en yüksek olan izolat *Leptolyngbya sp.N2* olarak tespit edilmiş olup aynı zamanda toksin içerdiği de saptanmıştır. Singh ve arkadaşlarının 2017 yılında yapmış olduğu bir çalışmada türlerin total fenol içeriklerine bakıldığında total fenol içeriği en yüksek olan tür *Oscillatoria acuta* olduğu görülmüştür. Bu türü sırasıyla *Mastigocladus laminosus* ve *Lyngbya sp.* takip etmektedir.

Toksin içeren türlerin DPPH radikalini yakalama etkisinin de yüksek çıktığı; aynı şekilde bu türlerin total fenol içeriklerinin de yüksek olduğu tespit edilmiştir.



6.BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

Siyanobakterlerin ürettikleri sekonder bileşikler olan toksinlerin önemi ve bu toksinlerin zararlarının yanı sıra bunlardan faydalanacak şekilde yapılan araştırmalar günümüzde ciddi boyut kazanmıştır. Bu çalışmada Kızılırmak nehrinden izole edilen siyanobakter türlerinin toksin içerikleri, antimikrobiyal etkileri ve antioksidan aktivilerini incelenmiş olup bu türlerin biyoteknolojik alanda kullanılabilirliği tartışılmıştır.

Yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlara göre toksin içeren *Leptolyngbya sp.N2*, *Oscillatoria sp. N38*, *Oscillatoria sp. N53*, *Oscillatoria sp.N71* ve *Oscillatoria sp.N82* izolatlarının toksin içeriklerine bağlı olarak antimikrobiyal etkilerinin de doğru orantılı bir şekilde artış gösterdiği saptanmıştır. Bu bağlamda toksin miktarı ile antimikrobiyal etki arasında bir korelasyon olduğu söylenebilir. Toksin içeren türlerin DPPH yakalama etkisi ile total fenol içerikleri arasında da bir korelasyonun olduğu görülmektedir. Total fenol miktarı en yüksek izolat olan *Leptolyngbya sp.N2*'nin toksinin de yüksek olduğu kanıtlanmıştır. En yüksek toksin içeriğine sahip olan *Oscillatoria sp. N71* izolatının yine yüksek DPPH yakalama oranına sahip olduğu belirlenmiştir.

Bunlara ek olarak bu çalışmada elde edilen izolatlara ait β -karoten ve likopen içerikleri de tayin edilmiş olup; bu zamana kadar siyanobakterlerin β -karoten ve likopen içerikleri gösterdikleri antioksidan etki bakımından çok az incelenmiştir. İlk defa bu çalışmada elde edilen siyanobakter izolatlarının toksin içeriklerinin yanı sıra bütün antioksidan aktivite ve antimikrobiyal etkileri incelenmiştir.

Yapılan bu çalışmada çevre ve insan sağlığı açısından risk teşkil eden toksik türlerin biyoteknolojik olarak önemine değinilmiş ve bu türlerin kimyasal ilaçlara alternatif olarak doğal ilaç üretiminde kullanılabileceği öngörülmüştür. Benzer şekilde elde edilen izolatların antioksidan özellikleri dikkate alınarak bu izolatların gıda sektörü, eczacılık ve diğer endüstri alanlarında mükemmel bir kaynak teşkil edebileceği öngörülebilir.

KAYNAKLAR

1. Carmichael, W. W., “An Overview of Toxic Cyanobacterial Research in the United States.” In: Proc. Of Toxic Cyanobacteria A Global Perspective. Adelaide, South Australia: Australian Centre for Water Quality Research. 1994
2. Méjean A, Peyraud-Thomas C, Kerbrat AS, Golubic S, Pauillac S, Chinain M & Laurent D,”First identification of the neurotoxin homoanatoxin-a from mats of *Hydrocoleum lyngbyaceum* (marine *Cyanobacterium*) possibly linked to giant clam poisoning in New Caledonia”. *Toxicon* 56: 829–835. 2010
3. Paerl, H. W., Huisman, J. “Climate change: “A catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms”. *Environmental Microbiology Reports* 1, 27e37. 2009
4. Lurling, M., Roessink, I., “On the way to cyanobacterial blooms: impact of the herbicide metribuzin on the competition between a green alga (*Scenedesmus*) and a cyanobacterium (*Microcystis*)”. *Chemosphere* 65, 618e626. 2006
5. Hitzfeld, B., Lampert, C. S., Spaeth, N., Mounfort, D., Kaspar, H., Dietrich, D. R.,. “Toxin Production in cyanobacterial mats from ponds on the Mcmurdo Ice Shelf. Antarctica”. *Toxicon* 38, 1731-1748. 2000
6. P. V. Lakshmana Rao, N. Gupta, A S. B. Bhaskar, R. Jayarai. “Toxins and bioactive compounds from cyanobacteria and their implications on human health”. *J. Environ. Biol.*, 23 pp.215-224, 2002
7. Dow, C. S., Swoboda, U. K., Cyanotoxins. In: Whitton, B.A., Potts, M. (Eds.), “The Ecology of Cyanobacteria”. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 613–632, 2000
8. Kaebernick, M., Neilan, B.A., Borner, T., Dittman, E.,. “Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster”. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (8), 3387–3392, 2000
9. Briand, J. F., Jacket, S., Bernard, C., Humbert, J. F. “Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems”. *Vet. Res.* 34, 361–377. 2003
10. Önal S.,“Yapay Sinir Ağları Metodu ile Kızılırmak Nehri'nin akım tahmini”, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, s.2-3, Isparta, 2009

11. www.dsi.gov.tr/docs/yayinlarimiz/yamula-baraj-golu-limnolojisi.pdf?sfvrsn=4
12. Oberholster, P.J., Botha, A.M., Grobbelaar, J.U.,” *Microcystis aeruginosa*: source of toxic microcystins in drinking water”, *African Journal of Biotechnology*, 3 (3), 159-168.) 2004
13. Cirik, Ş. & Cirik, S. Su Bitkileri I (Deniz Bitkilerinin Biyolojisi, Ekolojisi, Yetiştirme Teknikleri). Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları No: 58, Ders Kitabı Dizin No.26, Bornova, İzmir, 2011
14. Inman, O. L. “Studies on the Chlorophyll and Photosynthesis of thermal algae from Yellowstone national park”, California and Nevada. *Journal of General Physiology* 23(6): 661-666,1940
15. Meinesz, A. “Yaşam Nasıl Başladı-Evrimin Üç Kökeni”.Şükran Cirik/ Engin Tarhan, S. 120, Ankara, 2010
16. Erikson, N.T. “Production of phycocyanin- a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine”. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80:1-14.doi: 10.1007/s00253-008-1542-y
17. Cirik, S. & Gökpınar, Ş.” Plankton Bilgisi ve Kültürü”. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları No:47, Ders Kitabı Dizin No:19, Bornova, İzmir, 2008
18. D'Anglada LV, Donohue JM, Strong J, Hawkins B, In: 820R15102; O. EPA, Washington DC, 2015.
19. Whitton BA, editor. “*Ecology of Cyanobacteria II. Their Diversity in Space and Time*”. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2012
20. Abed RMM, Dobretsov S, Sudesh K. “Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*”. ;106(1):1–12, 2009
21. Simmons TL, Andrianasolo E, McPhail K, Flatt P, Gerwick WH. “Marine natural products as anticancer drugs”.*Molecular Cancer Therapeutics*; 4(2):333–342, 2005
22. Ducat DC, Way JC, Silver PA. “Engineering cyanobacteria to generate high-value products”. *Trends in Biotechnology*; 29(2):95 103, 2011
23. Pelaez M, Antoniou MG, He X, et al. “Sources and occurrence of cyanotoxins worldwide”. In: Fatta-Kassinos D, Bester K, Kümmerer K, editors. *Xenobiotics in the Urban Water Cycle*. New York, NY, USA: Springer; pp. 101–127, 2010.
24. Whitton, A. ve Potts, M. ‘ The Ecology of Cyanobacteria’, Kluwer Academic Publisher, Netherlands, 2000

25. Güner, H. ve Aysel, V. Tohumuz Bitkiler Sistematiği, Cilt 1 (Algler), Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, s.245, 2006
26. Graham, L., Graham, J. ve Wilcox, L. “Bitki Biyolojisi”s.236 , 2004
27. Öztürk Ş., “Çeşitli tatlı sularda elde edilen bazı *Synechocystis sp.* izolatlarına Cr(VI) ve Cd(II) ağır metallerin etkisi ve giderimi: metal gideriminin protein ve tiyoller açısından değerlendirilmesi, FBE’, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, s.22-25. Ankara, 2008
28. Stall L., Eds: Whitton, B. A., Potts, M., “Cyanobacterial Mats and Stromatolites in: The ecology of Cyanobacteria: Diversity in time and space”. Springer, Netherlands, 2002
29. Ward, D. M., Castenholz, R. W & Miller, S. R “Cyanobacteria in Geothermal Habitats. Eds: Whitton, B. A., In ecology of Cyanobacteria II. Their Diversity in Space and Time “,s. 37-59, Springer. Netherlands, Dordrecht, 2012
30. Cox PA, Banack SA, Murch SJ, Rasmussen U, Tien G, Bidigare RR, Metcalf JS, Morrison LF, Codd GA, Bergman B. Diverse “taxa of cyanobacteria produce beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid”. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 102:5074–5078, 2005
31. Dolu, T., Nas, B., “Siyanobakteriler: Toksik Etkileri, Giderim Yöntemleri ve Yasal Düzenlemeler”, Selçuk Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümü ,s.19-27, Konya, 2016
32. WHO,” Algae and cyanobacteria in fresh water. In: Guidelines for safe recreational water environments”. Vol. 1: Coastal and fresh waters. World Health Organization, Geneva, Switzerland, pp. 136–158, 2003
33. Rastogi, P. R., Madamvar, D., Incharoensakdi A. “Bloom Dynamics of Cyanobacteria and Their Toxins: Enviromental Health Impacts and Mitigation Strategies”, 2015
34. Häder D.-P., Villafañe V. E., Helbling E. W. “Productivity of aquatic primary producers under global climate change”. *Photochem. Photobiol. Sci.* 13 1370–1392. 10.1039/c3pp50418b, 2014
35. Chorus, I., Falconer, I.R., Salas, H.J., Bartram, J., “Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters”, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 3, s.323-347, 2000

36. T.A.M. Msagati, B.A. Siame, D.D. Shushu “Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins” *Aquat. Toxicol.*, s. 382-397, 2006
37. dos Anjos, F.M., Bittencourt-Oliveira, M.D., Zajac, M.P., Hiller, S., Christian, B., Erler, K., Luckas, B., Pinto, E.,. “Detection of harmful cyanobacteria and their toxins by both PCR amplification and LC-MS during a bloom event”. *Toxicon* 48, s.239-245, 2006
38. Metcalf JS, Meriluoto JAO, Codd GA “Legal and security requirements for the air transportation of cyanotoxins and toxigenic cyanobacterial cells for legitimate research and analytical purposes”. *Toxicol Lett* 163: s.85–90, 2006
39. Metcalf JS, Codd GA “The status and potential of cyanobacteria and their toxins as agents of bioterrorism. In: Gault PM, Marler HJ (eds) *Handbook on cyanobacteria: biochemistry, biotechnology and applications*”. Nova Publishers, New York, 2009
40. Catherine, Q., Susanna, W., Isidora, E. S., Mark, H., Aurelie, V., & Jean-François, H. “A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria–ecology, toxin production and risk management”. *Water research*, 47(15), s.5464-5479, 2013
41. Blaha, L., Babica, P., & Marsalek, B. “Toxins produced in cyanobacterial water blooms-toxicity and risks”. *Interdisciplinary toxicology*,2(2), s.36-41, 2009
42. M.C. Bittencourt-Oliveira, T.C. Hereman, M.K. Cordeiro-Araújo, *et al.* *Braz J Biol*, 74 pp .s. 753-760, 2014
43. D. Schatz, Y. Keren, A. Vardi, A. Sukenik, S. Carmeli, T. Börner *Environ Microbiol*, 9 pp. s.965-970, 2007
44. L. Pearson, T. Mihali, M. Moffitt, R. Kellmann, B. Neilan *Mar Drugs*, 8 pp. 1650-1680 , 2010
45. Sivonen K, Jones J. Cyanobacterial toxins. In: Chorus I, Bartram J, editors. “*Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*”. E & FN Spon on behalf of the World Health Organization; 1999
46. Falconer IR. *Cyanobacterial Toxins in Drinking Water Supplies: Cylindrospermopsins and Microcystins*. Boca Raton, Fla, USA: CRC Press; 2005

47. Edwards C, Lawton LA. Bioremediation of cyanotoxins. *Advances in Applied Microbiology*. 67: s.109–129, 2009
48. Imanishi S, Kato H, Mizuno M, Tsuji K, Harada K. “Bacterial degradation of microcystins and nodularin”. *Chemical Research in Toxicology*. 18(3): s.591–598, 2005
49. A. Campos, V. Vasconcelos *Int J Mol Sci*, 11 pp. s.268-287, 2010
50. Ho L, Sawade E, Newcombe G. “Biological treatment options for cyanobacteria metabolite removal”—a review. *Water Research*. ;46(5): s.1536–1548, 2012
51. Smith MJ, Shaw GR, Eaglesham GK, Ho L, Brookes JD. “Elucidating the factors influencing the biodegradation of cylindrospermopsin in drinking water sources.” *Environmental Toxicology*. 23(3):413–421, 2008
52. Mohamed ZA, Alamri SA. “Biodegradation of cylindrospermopsin toxin by microcystin-degrading bacteria isolated from cyanobacterial blooms”. *Toxicon*. 60:1390–1395, 2012
53. Murray SA, Mihali TK, Neilan BA. “Extraordinary conservation, gene loss, and positive selection in the evolution of an ancient neurotoxin”. *Molecular Biology and Evolution*; 28(3): s.1173–1182, 2011
54. Donovan CJ, Ku JC, Quilliam MA, Gill TA. “Bacterial degradation of paralytic shellfish toxins”. *Toxicon*. 52(1):s.91–100, 2008
55. Osswald J, Rellán S, Gago A, Vasconcelos V.” Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria, anatoxin-a”. *Environment International*. ; 33(8): s.1070–1089, 2007
56. Fujii K, Harada K-I, Suzuki M, Kondo F, Ikai Y, Oka H & Sivonen K “Novel cyclic peptides together with microcystins produced by toxic cyanobacteria”. *Harmful and Toxic Algal Blooms* (YatsumotoT, OshimaY & FukuyoY, eds, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, 1996
57. Sainis I, Fokas D, Vareli K, Tzakos AG, Kounnis V, Briasoulis E “Cyanobacterial cyclopeptides as lead compounds to novel targeted cancer drugs”. *Mar Drugs* 8: s 629–657, 2010
58. Nicholson B. C., Burch M. D.: “Evaluation of analytical methods for detection quantification of cyanotoxins in relation to Australian drinking water guidelines”. – Australia, 2001

59. Jungblut, A., Hoeger, S.J., Mountfort, D., Hitzfeld, B.C., Dietrich, D.R., Neilan, B.A.", Characterization of microcystin production in an antarctic cyanobacterial mat community", *Toxicon*, 47, s.271-278, 2006
60. Wood, S.A., Heath, M.W., Holland, P.T., Munday, R., McGregor, G.B., Ryan, K.G., "Identification of a benthic microcystin-producing filamentous cyanobacterium (Oscillatoriales) associated with a dog poisoning in New Zealand". *Toxicon* 55 (4),s. 897–903, 2010
61. Aboal, M., Puig, M. A., Asencio, A. D, "Production of microcystins in calcareous Mediterranean streams: the Alharabe River, Segura River basin in south-east Spain". *Journal of Applied Phycology* 17, 231e243, . 2005
62. Baier, W., Loleit, M., Fischer, B., Jung, G., Neumann, U., Weib, M., Weckesser, J., Koffmann, P., Bessler, W.G., Mittenbuchler, K., "Generation of antibodies directed against the low-immunogenic peptide-toxins microcystin-LR/RR and nodularin, *International Journal of Immunopharmacology* ", 22, 339-353, 2000
63. N.Gupta, S.C. Pant, R. Vijayaraghavan, P.V. Lalshmana Rao. "Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclis peptide toxin microcystin variants "(LL, RR, YR) in mice toxicology 188, 285_296, 2003
64. Meriluoto J, Codd GA "Toxic cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis". Åbo Akademi Press, Åbo, 149 pp, 2005
65. Christiansen G, Fastner J, Erhard M, Börner T, Dittmann E."Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution and manipulation". *J Bacteriol* 185:564–572, 2003
66. Moffitt, C. M., Neilan, A. B. "Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed evolution of cyanobacterial hepatoxins". *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (11), 6353-6362, 2004
67. Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., Dohren, H., Borner, T., Neilan, B.A., "Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide polyketide synthetase system", *Chemistry and Biology*, 7 (10), 753-764., 2000
68. Welker M, von Dohren H. Cyanobacterial peptides – Nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev.* 30: s.530–563, 2006

69. Akcaalan R, Mazur-Marzec H, Zalewska A, Albay M “Phenotypic and toxicological characterization of toxic *Nodularia spumigena* from a freshwater lake in Turkey”. *Harmful Algae* 8: s.273–278, 2009
70. Metcalf J. S., Bell S. G., Codd G. A.,: “Production of novel polyclonal antibodies against the cyanobacterial toxin microcystin-LR and their application for the detection and quantification of microcystins and nodularin”. – *Water Research*, 34(10): s.2761–2769, 2000
71. Fischera, W. J., Altheimera, S., Cattorib, V., Meierb, P. J., Dietricha, D. R., Hagenbuchb, B.” Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin”. *Toxicol Appl Pharmacol* 203:257–263, 2005
72. Monks, N. R., Liu, S., Xu, Y., Yu, H., Bendelow, A. S., Moscow, J. A. “Potent toxicity of the phosphatase inhibitor microcystin LR and microcystin analogues in OATPB1- and OATPB3-expressing HeLa cells”. *Mol Cancer Ther* 6: s.587–598, 2007
73. T.Gürkök, İ. Parmaksız, G. Boztepe, E.Kaymak “electronic Journal of Biotechnology “1(2) s.31-45, 2010
74. Carmichael WW, and Falconer IR. “Disease related to freshwater algal blooms”. In: Callow JA [ed.], *Advances in botanical research*, 187–210. Academic Press, London, UK, 1993
75. Carmicheal, W. W., “Health effects of toxin-producing cyanobacteria: The CyanolHABs”. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 7,1393-1407, 2001
76. Cadel-Six S, Iteman I, Peyraud-Thomas C, Mann S, Ploux O & Mejean A “Identification of a polyketide synthase coding sequence specific for anatoxin-a-producing *Oscillatoria* cyanobacteria”. *Appl Environ Microbiol* 75: 4909–4912, 2009
77. Llewellyn LE. “Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors”. *Nat Prod Rep.* 23:200-222, 2006
78. Aydın H, Uzer S. “Denizel Mikroalg Biyotoksinleri ve Etkileri.” Celal Bayar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Manisa, 2009
79. Wiese, M., P. M. D’Agostino, T. K. Mihali, M. C. Moffitt & B. A Neilan, “Neurotoxic Alkaloids: Saxitoxin and its Analogs”. *Marine Drugs*, 8:2185-2211,2010

80. Kellman, R., Neilan, B. A. Biochemical characterization of paralytic shellfish toxin biosynthesis in vitro. *J. Phycol.* 43, 497-508, 2007
81. Pearson L, Mihali T, Moffitt M, Kellmann R & Neilan B “On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin”. *Mar Drugs* 8: 1650–1680, 2010
82. de la Cruz, A., Hiskia, A., Kaloidis, T., Chernoff, N., Hill, D., Antoniou, M. G., He, X., Loftin, K., O’Shea, K., Zhao, C., Pelaez, M., Han, C., Lynch, T.J. and Dionysious, D.D A “review on cylindrospermopsin: the global occurrence, detection, toxicity and degradation of a potent cyanotoxin”. *Env. Sci. Processes impacts* 15:1979-2003, 2013
83. Falconer IR, Humpage AR.” Cyanobacterial toxins in water supplies Cylindrospermopsis”, *Environ. Toxicol*, s.299-304, 2006
84. Kinnear, S. “Cylindrospermopsin: A decade of progress on bioaccumulation research.” *Mar. Drugs*, 8, 542–564, 2010
85. Saker, M.L.; Neilan, B.A. “Varied diazotrophies, morphologies, and toxicities of genetically similar isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from northern Australia”. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1839–1845, 2001
86. Bacsi, I.; Vasas, G.; Suranyi, G.; Hamvas, M.; Mathe, C.; Toth, E.; Grigorszky, I.; Gaspar, A.; Toth, S.; Borbely, G. “Alteration of cylindrospermopsin production in sulfate- or phosphate-starved cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum*.” *FEMS Microbiol. Lett.* 259, 303–310, 2006
87. Shalev-Malul, G.; Lieman-Hurwitz, J.; Viner-Mozzini, Y.; Sukenik, A.; Gaathon, A.; Lebendiker, M.; Kaplan, A. “An AbrB-like protein might be involved in the regulation of cylindrospermopsin production by *Aphanizomenon ovalisporum*.” *Environ. Microbiol.* 10, 988–999, 2008
88. Bar-Yosef, Y.; Sukenik, A.; Hadas, O.; Viner-Mozzini, Y.; Kaplan, A. Enslavement in the water body by toxic *Aphanizomenon ovalisporum*, inducing alkaline phosphatase in phytoplanktons. *Curr. Biol.* 20, 1557–1561, 2010
89. Mihali T. K., Kellmann R., Muenchhoff J., Barrow K. D., Neilan B. A. . “Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis”. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 716–722. 10.1128/AEM.01988-07, 2008

90. Schembri MA, Neilan BA, Saint CP. "Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*". *Environ Toxicol* 16: 413-421, 2001
91. Runnegar MT, Kong SM, Zhong YZ & Lu SC "Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes". *Biochem Pharmacol* 49: 219-225, 1995b
92. Runnegar MT, Xie C, Snider BB, Wallace GA, Weinreb SM & Kuhlenkamp J " *In vitro* hepatotoxicity of the cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin and related synthetic analogues". *Toxicol Sci* 67: 81-87, 2002
93. Kiss T, Vehovszky A, Hiripi L, Kovacs A & Voros L "Membrane effects of toxins isolated from a cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*, on identified molluscan neurones". *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 131: 167-176, 2002
94. Banker R, Carmelli S, Werman M, Teltsch B, Porat R, Sukenik A. "Urasil moiety is required for toxicity of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin." *J Toxicol. Environ Health A* 62:281-288, 2001
95. Saker, M.L Thomas, A. D., Norton, J.H " Cattle mortality attributed to the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in an outback region of North Queensland". *Environ. Toxicol.*14,179-182, 1999
96. Mihali TK, Kellmann R, Muenchhoff J, Barrow KD & Neilan BA "Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis". *Appl Environ Microbiol* 74: 716-722., 2008
97. Terao K, Ohmori S, Igarishi K, Ohtani I, Watanabe MF, Harada KI, Ito E, Watanabe M. "Electron microscope studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green algae *Umezaki natan*"s. *Toxicon.*, 32 (7): 833-843, 1994
98. Metcalf JS, Barakate A, Codd GA." Inhibition of plant protein synthesis by the cyanobacterial hepatotoxin, cylindrospermopsin". *FEMS Microbiol Lett* 235: 125-9, 2004
99. Vessey JK, Pawlovski K, Bergman B. "Root based N₂ fixing symbioses: Legumes, actinorhizal plants, *Parasponia sp.* and cycads". *Plant soil* 274:51-78, 2005
100. Banack SA, Caller AT, Stommel EW. "The Cyanobacteria Derived From Toxin Beta-N-Methylamino-L-Alanine and Amyotrophic Lateral Sclerosis", 2010

101. Cox PA, Banack SA, Murch SJ. “Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 100:13380-13383, 2003
102. Murch SJ, Cox PA, Banack SA. A “Mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 101:12228-1223, 2004
103. Cox PA, Banack SA, Murch SJ, Rasmussen U, Tien G, Bidigare RR, Metcalf JS, Morrison LF, Codd GA, Bergman B.” Diverse taxa of cyanobacteria produce beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102:5074–5078, 2005
104. Wang L., Liang X.F., Liao W.Q., Lei L.M., Han B.P. “Structural and functional characterization of microcystin detoxification-related liver genes in a phytoplanktivorous fish, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)” *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol*, 2006
105. Wiegand C., Pflugmacher S. “Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites: A short review”. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203:201–218, 2005
106. Zanchett G., Oliveira-Filho E.C. “Cyanobacteria and cyanotoxins: From impacts on aquatic ecosystems and human health to anticarcinogenic effects”. *Toxins (Basel)* 5:1896–1917. 2013
107. Rapala J., Lahti K., Rasanen L.A., Esala A.L., Niemela S.I., Sivonen K. “Endotoxins associated with cyanobacteria and their removal during drinking water treatment”. *Water Res.* 36:2627–2635, 2002
108. Jakubowska N., Szlag-Wasielewska E. Toxic picoplanktonic cyanobacteria—Review. *Mar. Drugs*. 13:1497–1518, 2015
109. Smith, J. L., Boyer, G. L., and Zimba, P. V. “A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: impacts and management alternatives in aquaculture.” *Aquaculture* 280, 5–20, 2008
110. Bláhová, L., Adamovský, O., Kubala, L., Švihálková Šindlerová, L., Zounková, R., and Bláha, L. “The isolation and characterization of lipopolysaccharides from *Microcystis aeruginosa*, a prominent toxic water bloom forming cyanobacteria”. *Toxicon* 76, 187–196, 2013

111. Carmichael WW, LI R: "Cyanobacteria toxins in the Salton Sea". *Saline systems*, 2, 1-13, 2006
112. Appeldorn, M. E., H. P. Egont, G. J. A Speijers & G. J. I Bakker,"Toxins of cyanobacteria". *Molecular Nutrition & Food Research*, 51: 7-60, 2007
113. Ito E, Nagai H "Bleeding from the small intestine caused by aplysiatoxin, the causative agent of the red algae *Gracilaria coronopifolia* poisoning". *Toxicon* 38: 123-132, 2000
114. Silva-Stenico, M. E., Silva, C. S. P., Lorenzi, A. S., Shishido, T. K., Etchegaray, A., Lira, S. P., & Fiore, M. F. "Non-ribosomal peptides produced by Brazilian cyanobacterial isolates with antimicrobial activity". *Microbiological research*, 166(3), 161-175, 2011
115. Elias RJ, Kellerby SS, Decker EA. "Antioxidant activity of proteins and peptides". *Crit Rev Food J aerth Environ Sci Nutr* 48: 430-41, 2008
116. Lordan S, Ross RP, Stanton C. "Marine bioactives as biofunctional food ingredienst: potential to reduce the incidense of chronic disease." *Mar Drugs* 9: 1056-100, 2011
117. Ibanez E, Herrero M, Mendiola JA, Castro Puyana, M. "Extraction and characterization of bioactive compounds with health benefits from marine resources: macro and micro algae, cyanbacteria and invertebrates". In: Hayes M, editör. *Marine bioactive compounds: sources, characterization*. New York: Springer. P 58-62, 2005
118. Brennan L., Owende P. "Biofuels from microalgae-a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products". *Renew. Sustain. Energ. Rev.* 14, 557-577, 2010
119. A.C. Guedes, H.M. Amaro, F.X. Malcata"Microalgae as sources of high added-value compounds—a brief review of recent work" *Biotechnol. Progr.*, 27 pp. 597-613, 2011
120. Yuan J.P, Peng J., Yin K., Wang J.H "Potential health promoting effects of astaxanthin: a high value carotenoid mostly from microalgae". *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 150-165, 2011
121. Dhankhar S, Kumar S, Dhankhar S, Yadav JP." Antioxidant activity of fungal endophytes isolated from *Salvadora oleoides decne*". *Int J Pharm Pharm Sci*, 4(2): 380-385, 2012

122. Doshi N, Prabhakar Pandian B, Rea-Ramsey A, Pant K, Sundaram S, Mitragotri S. "Flow and adhesion of drug carriers in blood vessels depend on their shape: a study using model synthetic microvascular networks". *J. Control. Release.* 146:196–200, 2010
123. Spalore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. and Isambert, A. "Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101, 87–96. Photobioreactors for Improved Algal Biomass Production: Analysis and Design Considerations", 2006
124. Mata, T.M.; Martins, A.A. & Caetano, N.S. "Microalgae for biodiesel production and other applications": A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 217-232, 2010
125. Sastre RR. "Products from microalgae: An overview. In: Posten C, Walter C, editors. *Microalgal biotechnology: integration and economy*. Berlin, Germany: Walter de Gruyter. p 13–44, 2012
126. Kargın Yılmaz H., , Dikbaş M. D., Bilgüven M., "Siyanobakterilerden Elde Edilen Pigment Maddeleri ve Kullanım Alanları" s.139-155, Mersin, 2016
127. Dixit, R. B., & Suseela, M. R. Cyanobacteria:" Potential candidates for drug discovery". *Antonie Van Leeuwenhoek*, 103(5), 947-961, 2013
128. Okan O.T, Varlıbaş H, Öz M., Deniz İ., "Antioksidan Analiz Yöntemleri ve Doğu Karadeniz Bölgesinde Antioksidan Kaynağı Olarak Kullanılabilecek Odun Dışı Bazı Bitkisel Ürünler "Kastamonu Üniversitesi, Orman Fakültesi Dergisi, 13 (1): 48-59, 2013
129. Prior LR, Wu X, Schaich K. "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements". *J Agr food Chem*, 2005
130. Böhm G. A., Pfeleiderer W., Böger P., Scherer S. "Structure of a novel oligosaccharide-mycosporine-amino acid ultraviolet A/B sunscreen pigment from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*". *J. Biol. Chem.* 270, 8536–8539. 10.1074/jbc.270.15.8536 ,1995
131. Litescu SC, Sandra AV, Eremia SAV, Diaconu M, Tache A ve ark., 2011
132. Osanai T., Oikawa A., Azuma M., Tanaka K., Saito K., Hirai M. Y., et al. "Genetic engineering of group 2 sigma factor SigE widely activates expressions of sugar

- catabolic genes in *Synechocystis* species PCC 6803”. *J. Biol. Chem.* 286, 30962–30971. 10.1074/jbc.M111.231183, 2011
133. Osanai T., Oikawa A., Numata K., Kuwahara A., Iijima H., Doi Y., et al. “Pathway-level acceleration of glycogen catabolism by a response regulator in the cyanobacterium *Synechocystis* species PCC 6803”. *Plant Physiol.* 164, 1831–1841. 10.1104/pp.113.232025, 2014
134. Atsumi S., Higashide W., Liao J. C. “Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde”. *Nat. Biotechnol.* 27, 1177–1180. 10.1038/nbt.158, 2009
135. Khanna N., Lindblad P. “Cyanobacterial hydrogenases and hydrogen metabolism revisited: recent progress and future prospects”. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 10537–10561. 10.3390/ijms160510537, 2015
136. Wiltbank L. B., Kehoe D. M. “Two cyanobacterial photoreceptors regulate photosynthetic light harvesting by sensing teal, green, yellow, and red light”. *MBio* 7:e02130-15. 10.1128/mBio.02130-15, 2016
137. Osanai T., Oikawa A., Numata K., Kuwahara A., Iijima H., Doi Y., et al. “Pathway-level acceleration of glycogen catabolism by a response regulator in the cyanobacterium *Synechocystis* species PCC 6803”. *Plant Physiol.* 164, 1831–1841. 10.1104/pp.113.232025, 2014
138. Brittain, S., Mohamed, Z. A., Wang, J., Lehmann, V. K. B., Carmichael, W. W., Rinehart, K. L., “Isolation and characterization of microcystins from a River Nile strain of *Oscillatoria tenuis* Agardh ex Gomont”. *Toxicon* 38 (12), 1759–177, 2000
139. Zhou, L., Yu, H., Chen, K., “Relationship between microcystin in drinking water and colorectal cancer”. *Biomed. Environ. Sci.* 15 (2), 166–171, 2002
140. Figueiredo, D.R., Azeitero, U.M., Esteves, S.M., Gonzaler, F.J.M., Pereira, M.J.” Microcystin-producing blooms a serious global public health issue, *Ecotoxicology and Environmental Safety*”, 59, 151-163, 2004
141. Chen L. M., Li K. Z., Miwa T., Izui K. “Overexpression of a cyanobacterial phosphoenolpyruvate carboxylase with diminished sensitivity to feedback inhibition in *Arabidopsis* changes amino acid metabolism”. *Planta* 219, 440–449. 10.1007/s00425-004-1244-3, 2004
142. Codd, G. A. “Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance”. *Water Science and Technology*, 32(4), 149-156, 1995

143. Tarczynska, Romanowska-Dudaz, Jurczak T, and Zalewski M. "Toxic cyanobacterial blooms in a drinking water reservoirs – causes, consequences and management strategy". *Water Science and Technology* 1: 237–246, 2001
144. Codd, G. A. "Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and prioritisation of eutrophication control". *Ecol. Eng.*, 51-60, 2000
145. Libralato, G., "The case of *Artemia spp.* in nanoecotoxicology". *Mar. Environ. Res.* 101, 38–43, 2014
146. Ulitzur S. Lahav T. and Ulitzur N. "A Novel and Sensitive Test for Rapid Determination of Water Toxicity". *Environmental Toxicology Journal* 17:291-296, 2002
147. Gürbüz F, Metcalf JS, Karahan AG, Codd GA. "Analysis of dissolved microcystins in surface water samples from Kovada Lake, Turkey". *Sci Total Environ*, 15: 407(13): 4038-46, 2009
148. Metcalf, J.S; and G.A Codd. "Analysis of cyanobacterial toxins by immunological methods". *Chem. Res. Toxicol*; 16(2):103-112, 2003
149. Aranda-Rodriguez, R. et al. "Evaluation of three field test kits to detect microcystins from a public health perspective". *Harmful Algae*, 42:34-42, 2015
150. Humpage, A.R. et al. "Evaluation of the Abraxis Strip Test for Microcystins™ for use with wastewater effluent and reservoir water". *Water Res.*, 46: 1556–1565, 2012
151. Almeida, V. P. S., Cogo, K., Tsai, S. M. & Moon, D. H. "Colorimetric test for the monitoring of microcystins in cyanobacterial culture and environmental samples from southeast – Brazil". *Brazilian Journal of Microbiology* 37, 192-198, 2006
152. Meissner S., Fastner J., & Dittmann E. "Microcystin production revisited: conjugate formation makes a major contribution". *Environmental Microbiology*, 15(6), 1810–1820, 2013
153. Heresztyn, T., Nicholson, B.C. "Determination of cyanobacterial hepatotoxins directly in water using a protein phosphatase inhibition assay". *Water Research* 35(13), 3049–3056, 2001
154. Merel, S., M. C. Villarin, K Chung & S. Snyder. "Spatial and thematic distribution of research on cyanotoxins". *Toxicon*, 76:118-131, 2013

155. Lawton, L.A., Edwards, C. and Codd, G.A. "Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters". *Analyst*, 119, 1525-1530, 1994a
156. Harada, K.-I, Murata, H., Qiang, Z., Suzuki, M. and Kondo, F. "Mass spectrometric screening method for microcystins in cyanobacteria". *Toxicon*, 34, 701-710, 1996
157. Codd G. A., Morrison L. F., Metcalf J. S. "Cyanobacterial toxins: risk management for health protection". *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203 264–272. 10.1016/j.taap.2004.02.016, 2005
158. Sanseverino W, Hénaff E, Vives C, Pinosio S, Burgos-Paz W, Morgante M et al "Transposon insertion, structural variations and SNPs contribute to the evolution of the melon genome." *Mol Biol Evol*, 2015
159. Tsuji K, Masui H, Uemura H, Mori Y, Harada K." Analysis of microcystins in sediments using MMPB method". *Toxicon*; 39: 687-692, 2001
160. Moura, S., Ultramari Mde, A., de Paula, D. M., Yonamine, M. & Pinto, E. "1H NMR determination of beta-N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) in environmental and biological samples". *Toxicon* 53, 578-583, 2009
161. Rippka, R. Recognition and identification of cyanobacteria. "Methods Enzymol" 167, 28–67, 1988
162. Rippka, R. & Herdman, H. Pasteur "Culture Collection of Cyanobacteria: Catalogue and Taxonomic Handbook". I. Catalogue of Strains. Paris: Institut Pasteur, 1992
163. Scalzo, R.L., Organic acids influence on DPPH scavenging by ascorbic acid, *Food Chem.*, 107, 40–43, 2008.
164. Becker, E.M., Nissen, L.R., and Skibsted, L.H."Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects", Review, *European Food Research Technology*, 219, 561-57, 2004
165. Bernard, C.; Ballot, A.; Thomazeau, S.; Maloufi, S.; Furey, A.; Mankiewicz-Boczek, J.; Pawlik-Skowronska, B.; Capelli, C.; Salmaso, N. "Appendix 2: Cyanobacteria associated with the production of cyanotoxins. In Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis"; Wiley: Chichester, UK, pp. 501–525, 2017
166. Sivonen, K., Jones, J. "Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I. and Bartram, J. (eds): Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to Public Health Significance, Monitoring

- and Management. Published on the behalf of WHO by Spon/Champan & Hall”, London, in press,1998
167. Richardson, L. L., Sekar, R., Myers, J. L., Gantar, M., Voss, J. D., Kaczmarzky, L., & Zimba, P. V. “The presence of the cyanobacterial toxin microcystin in black band disease of corals”. *FEMS microbiology letters*,272(2), 182-187,2007
168. Shams, S., Cerasino, L., Salmaso, N., & Dietrich, D. “Experimental models of microcystin accumulation in *Daphnia magna* grazing on *Planktothrix rubescens*: potential for microcystin transfer through the food” web. In *SEFS8 2013: Symposium for European Freshwater Sciences* (pp. 369-R06) ,2013
169. Mohamed, Z. A. “Toxic cyanobacteria and cyanotoxins in public hot springs in Saudi Arabia”. *Toxicon*, 51(1), 17-27, 2008
170. Abdel-Rahman, R. M.; Seada, M.; El-Gendy, Z.; Islam, I. E.; Mahmoud, M. B. *Farmacology* 48(3), 407, 1993
171. Mayer A. M. S., Hamann M. T. *Marine Pharmacology in 2001–2002*. “Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis and antiviral activities, affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action”. *Comp. Biochem. Physiol.* 140, 265–286,2005
172. Cardozo KHM, Guaratini T, Barros MP, Falcão VR, Tonon AP, Lopes NP, Campos S, Torres MA, Souza AO, Colepicolo P, Pinto E “Metabolites from algae with economical impact”. *Comp Biochem Physiol* 146: 60-78, 2007
173. J.A. Mendiola, C.F. Torres, P.J. Martín
Alvarez, S. Santoyo, A. Toré, B.O. Arredondo, F.J. Señoráns, A. Cifuentes, E. Ibáñez
”Use of supercritical CO₂ to obtain extracts with antimicrobial activity from *Chaetoceros muelleri* microalga. A correlation with their lipidic content” *Eur. Food Res. Technol.*, 224 pp. 505-510, 2007
174. Herrero, M., Ibanez, E., Cifuentes, A., Reglero, G., & Santoyo, S. “*Dunaliella salina* microalga pressurized liquid extracts as potential antimicrobials”. *Journal of Food Protection*®, 69(10), 2471-2477, 2006
175. Aydaş, S. B., Ozturk, S., & Aslım, B. “Phenylalanine ammonia lyase (PAL) enzyme activity and antioxidant properties of some cyanobacteria isolates”. *Food chemistry*, 136(1), 164-169, 2013

- 176.Hsiao WW, et al. “Evidence of a large novel gene pool associated with prokaryotic genomic islands”. PLoS Genet 1(5):e62,2005
- 177.Romay, Ch., Ledón, N., González, R. J. Pharm. Pharmacol., 51, 641-642, 1999
- 178.Davis TW, Berry DL, Boyer GL, Gobler CJ “The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms”. Harmful Algae 8: 715–725, 2009



ÖZGEÇMİŞ

Neslihan EMİRAOĞLU 1987 yılında Almanya’da doğdu. İlk ve ortaokul Almanya’da liseyi Türkiye’de Avanos Lisesi’nde tamamladı. 2010 yılında İzmir Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Opsiyonundan mezun oldu. Aynı yıl Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi’nde yüksek lisansa başladı.

Evli ve 1 çocuk annesidir.

Adres: Bahçelievler Mahallesi 600. Sokak No: 7/3

Avanos/NEVŞEHİR

e-posta: nesli_koi@hotmail.com

