İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MARMARA BÖLGESİ İÇSULARINDAKİ BAZI MAVİ-YEŞİL ALG TÜRLERİNİN TOKSİN ÜRETİMİNİN GENETİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Latife KÖKER
Su Ürünleri Temel Bilimleri Anabilim Dalı
İç Sular Biyolojisi Programı

Danışman
Prof.Dr. Meriç ALBAY

Aralık, 2009

İSTANBUL

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MARMARA BÖLGESİ İÇSULARINDAKİ BAZI MAVİ-YEŞİL ALG TÜRLERİNİN TOKSİN ÜRETİMİNİN GENETİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Latife KÖKER
Su Ürünleri Temel Bilimleri Anabilim Dalı
İç Sular Biyolojisi Programı

Danışman
Prof.Dr. Meriç ALBAY

Aralık, 2009

İSTANBUL

Bu çalışma 05/01/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Su Ürünleri Temel Bilimler Anabilim Dalı İçsular Biyolojisi programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

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

Prof. Dr. Mustafa TEMEL
İstanbul Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi

Prof. Dr. Oya S. OKAY
İstanbul Teknik Üniversitesi
Gemi İnşaatı ve Deniz Bilimleri Fakültesi

Doç.Dr. Yelda AKTAN
İstanbul Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi

Doç.Dr. Ayten KİMİRAN ERDEM
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakülte

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 2846 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Tez çalışma konusunun seçiminde ve çalışmalarım sırasında desteğini benden hiç bir zaman esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Meriç ALBAY'a; çalışmalarım sırasında bana her zaman destek olan Doç. Dr. Reyhan AKÇAALAN ALBAY'a içten dileklerimle teşekkür ederim.

Moleküler analizlerimi yapmama olanak sağlayan Avustralya'daki New South Wales Üniversitesi Cyanobacteria ve Astrobiology Merkezi'nden Prof. Dr. Brett NEILAN başta olmak üzere, Alper YAŞAR, Kristen MILLER, Ralitza ALEXOVA'ya ve tüm BAN grubuna teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans çalışmam boyunca her zaman desteklerini yanımda hissettiğim annem Nazan KÖKER'e, babam Erkal KÖKER'e, babaannem Latife KÖKER'e ve tüm kardeşlerime en içten ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Aralık, 2009 **Latife KÖKER**

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ i

İÇİNDEKİLER ii

ŞEKİL LİSTESİ v

TABLO LİSTESİ vi

SEMBOL LİSTESİ vii

ÖZET viii

SUMMARY ix

1. GİRİŞ 1

2. GENEL KISIMLAR 4

2.1. CYANOPHYTA (MAVİ-YEŞİL ALGLER)'NIN GENEL ÖZELLİKLERİ 4

2.2. GÖLLERDE TOKSİK MAVİ-YEŞİL ALGLERİN AŞIRI ARTIŞI 6

2.3. MAVİ-YEŞİL ALG TOKSİNLERİ (CYANOTOKSİNLER) 7

2.4. CYANOTOKSİN ÜRETİMİNİN GENETİK TEMELİ 8

2.4.1. Microcystin ve Nodularin 9

2.4.2. Cylindrospermopsin 12

2.4.3. Saxitoksin 14

2.5. ÇEVRESEL FAKTÖRLERİN TOKSİN ÜRETİMİNE ETKİSİ 17

2.6. ÇALIŞMADA KULLANILAN YÖNTEMLER 18

2.6.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) 18

2.6.2. 16S Ribozomal RNA gen (16S rDNA) PCR 19

2.6.3. HEP PCR 19

2.6.4. Protein Fosfataz İnhibisyon Deneyi 20

2.6.5. Real-time PCR 20

2.7. ÇALIŞMADA KULLANILAN ALG TÜRLERİ 22
2.8. ÇALIŞMA ALANLARININ TANIMI 29
2.8.1. İznik Gölü 29
2.8.2. Küçükçekmece Gölü 29
2.8.3. Taşkısı Gölü 29
2.8.4. Manyas Gölü 30
2.8.5. Sapanca Gölü 30

3. MALZEME VE YÖNTEM 31

3.1. İZOLE EDİLEN FİTOPLANKTERİN KÜLTÜRE ALINMASI 31
3.2. ÖRNEKLERDEN DNA İZOLASYONU 33
3.3. DNA'NIN MİKTARININ VE SAFLIĞININ ÖLÇÜMÜ 34
3.4. AGAROZ JEL ELEKTROFOREZİ 34
3.5. 16S RİBOZOMAL RNA GEN (16S rDNA) PCR 35
3.6. DİZİLEME 37
3.7. HEP PCR 38
3.8. CYLİNDROSPERMOPSİN İÇİN PKS VE NRPS PCR 39
3.9. SXT PCR 40
3.10. AZOT VE FOSFORUN *M. aeruginosa*'nın MİCROCYSTİN ÜRETİMİNE ETKİSİ 41
3.10.1. Protein Fosfataz İnhibisyon Asseyi 42
3.10.2. RNA Ekstrasyonu 43
3.10.3. cDNA Sentezi (Ters Transkriptaz PCR) 45
3.10.4. Real-time PCR 46

4. BULGULAR 48

4.1. DNA İZOLASYONU 48
4.2. 16S RİBOZOMAL RNA GEN (16S RDNA) PCR 49
4.3. HEP PCR 51
4.4. CYLİNDROSPERMOPSİN İÇİN PKS VE NRPS PCR 54
4.5. SXT PCR 55
4.6. AZOT VE FOSFORUN *M. aeruginosa*'nın MİCROCYSTİN ÜRETİMİNE ETKİSİ 57
4.6.1. Protein Fosfataz İnhibisyon Asseyi 57
4.6.2. RNA Ekstrasyonu 58

4.6.3. cDNA Sentezi (Ters Transkriptaz PCR) 59
4.6.4. Real-time PCR 60

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 64

KAYNAKLAR 78

ÖZGEÇMİŞ 89

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 : Microcystin ve nodularinin yapısı 10
Şekil 2.2 : *M. aeruginosa* ve *N. spumigena* NSOR10 suşlarından elde edilen gen kümeleri 11
Şekil 2.3 : Cylindrospermopsinin yapısı 13
Şekil 2.4 : *C. raciborskii* AWT205 suşundan elde edilen gen kümesinin yapısı .. 14
Şekil 2.5 : Başlıca paralitik kabuklu toksinleri (PST) 16
Şekil 2.6 : *C. raciborskii* T3 suşundan elde edilen *sxt* gen kümesinin yapısal organizasyonu 17
Şekil 2.7 : *Microcystis aeruginosa* 23
Şekil 2.8 : *Microcystis flos-aquae* 23
Şekil 2.9 : *Microcystis wesenbergii* 23
Şekil 2.10 : *Nodularia spumigena* 24
Şekil 2.11 : *Planktothrix agardhii* 25
Şekil 2.12 : *Planktothrix rubescens* 25
Şekil 2.13 : *Cylindrospermopsis raciborskii* 26
Şekil 2.14 : *Aphanizomenon aphanizomenoides* 27
Şekil 2.15 : *Anabaenopsis elenkiini* 28
Şekil 4.1 : DNA ekstrasyonu sonrası DNA'nın agaroz jelde görüntüsü 48
Şekil 4.2 : Miscp1 suşuna ait DNA konsantrasyon değerleri 48
Şekil 4.3 : 16S rDNA PCR sonuçlarına ait agaroz jel elektroforezi görüntüleri .. 50
Şekil 4.4 : HEP PCR sonuçlarına ait agaroz jel elektroforezi görüntüleri..... 52
Şekil 4.5 : NRPS ve PKS PCR sonuçlarına ait agaroz jel elektroforezi görüntüleri 54
Şekil 4.6 : SXT PCR sonuçlarına ait agaroz jel elektroforezi görüntüleri..... 56
Şekil 4.7 : Kültürlerde canlı hücre sayısının zamana bağlı değişimi 57
Şekil 4.8 : Kültürlerde PP2A asseyi sonucunun örnekler arasındaki değişimi 58
Şekil 4.9 : Örnek 4'e ait RNA konsantrasyon değerleri 59
Şekil 4.10 : cDNA konsantrasyon değerleri 60
Şekil 4.11 : rpoC primerleri ile yapılan real-time PCR sonucu 61
Şekil 4.12 : *mcyA* gen anlatımı için real-time PCR 61
Şekil 4.13 : *mcyA* gen anlatımı için real-time PCR'da eşik değeri..... 62
Şekil 4.14 : *mcyA* gen anlatımının real-time PCR'da genel görünümü 62
Şekil 4.15 : *mcyA* gen anlatımının real-time PCR'da örneklere göre sonuçları 63

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 : Cyanotoksinler ve toksin üreten mavi-yeşil alg türleri **8**
Tablo 3.1 **:** Kullanılan suşlar..... **32**
Tablo 3.2 **:** BG 11 sıvı besiyeri..... **32**
Tablo 3.3 **:** XS buffer ortamı **33**
Tablo 3.4 **:** TE (TrisEDTA) tampon çözeltisi..... **33**
Tablo 3.5 : TAE solüsyonu (50X) **34**
Tablo 3.6 **:** Agaroz jel..... **35**
Tablo 3.7 **:** Yükleme tamponu (6X)..... **35**
Tablo 3.8 **:** Primerler..... **36**
Tablo 3.9 **:** 16S rDNA PCR içeriği..... **36**
Tablo 3.10 : 16S rDNA PCR koşulları **37**
Tablo 3.11 **:** HEP PCR içeriği **38**
Tablo 3.12 **:** HEP PCR koşulları **38**
Tablo 3.13 : PKS ve NRPS PCR içeriği **39**
Tablo 3.14 **:** PKS ve NRPS PCR koşulları **40**
Tablo 3.15 **:** SXT PCR içeriği **40**
Tablo 3.16 **:** SXT PCR koşulları..... **41**
Tablo 3.17 **:** Kullanılan N:P oranları **42**
Tablo 3.18 : X50 enzim diluent ortamı..... **43**
Tablo 3.19 **:** Reaksiyon içeriği **43**
Tablo 3.20 **:** Ters transkriptaz PCR içeriği..... **45**
Tablo 3.21 **:** Ters transkriptaz PCR koşulları **45**
Tablo 3.22 **:** Real-time PCR içeriği **47**
Tablo 3.23 : Real-time PCR koşulları **47**
Tablo 4.1 **:** DNA ekstrasyon sonucu elde edilen DNA konsantrasyonları **49**
Tablo 4.2 **:** 16S rDNA PCR sonrası dizileme analizlerinin NCBI'daki kayıt numaraları **51**
Tablo 4.3 **:** HEP PCR sonrası dizileme analizlerinin NCBI'daki kayıt numaraları **53**
Tablo 4.4 **:** NRPS ve PKS PCR sonrası dizileme analizlerinin NCBI'daki kayıt numaraları **55**
Tablo 4.5 **:** SXT PCR sonrası dizileme analizlerinin NCBI'daki kayıt numarası..... **56**
Tablo 4.6 **:** RNA ekstrasyon sonucu elde edilen RNA konsantrasyonları..... **59**
Tablo 5.1 **:** Marmara Bölgesi göllerinden izole edilen mavi-yeşil alg türleri ve toksin üretimleri **71**
Tablo 5.2 : Marmara Bölgesi göllerinde aşırı çoğalan mavi-yeşil alg türleri ve toksin üretimleri **72**

SEMBOL LİSTESİ

AMT : aminotransferaz
bç : baz çifti
cDNA : tamamlayıcı (komplimenter) DNA
$CuSO_4$: bakır sülfat
cyr : cylindrospermopsin sentetaz gen kümesi
DNA : deoksiribonükleik asit
dNTP : deoksinükleotid trifosfat
ELİSA : enzim bağlantılı immünosorbet asseyi
HPLC : yüksek performanslı sıvı kromotografisi
K_2HPO_4 : potasyum dihidrojen fosfat
mcy : microcystin sentetaz gen kümesi
$MgCl_2$: magnezyum klorür
MIB : 2-metil isoberneol
N:P : nitrat:fosfat
$NaNO_3$: sodyum nitrat
nda : nodularin sentetaz gen kümesi
nm : nanometre
nmol : nanomol
NRPS : non ribozomal peptid sentetaz
PCR : polimeraz zincir reaksiyonu
PKS : poliketid sentetaz
PP1, PP2A : protein fosfataz inhibisyon asseyi 1, 2A
RNA : ribonükleik asit
rRNA : ribozomal RNA
S : svedberg birimi
STX : saxitoksin
sxt : saxitoksin sentetaz gen kümesi
PSP : paralitik kabuklu zehirlenmesi
PST : paralitik kabuklu toksini
µ : mikron
µM : mikromol
U/µl : ünite/mikrolitre
UNSW : New South Wales Üniversitesi

ÖZET

MARMARA BÖLGESİ İÇSULARINDAKİ BAZI MAVİ-YEŞİL ALG TÜRLERİNİN TOKSİN ÜRETİMİNİN GENETİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Aşırı mavi yeşil alg (Cyanophyta = cyanobacteria) artışı genellikle ötrofik tatlı ve acı sularda görülen bir sorundur. Aşırı artışlar su kalitesini olumsuz yönde etkilemekte, içme suyu kaynaklarında filtrelerde tıkanıklık, tat ve koku bozuklukları gibi birçok soruna da neden olmakta, bazı türler ise toksin üretme yeteneğinin de olması nedeniyle canlı hayatını da tehdit etmektedir. Genel olarak "cyanotoksin" olarak adlandırılan ve en yaygın şekilde bilineni "microcystin" olan biyotoksinler sucul ortamlarda yüksek konsantrasyon değerlerine ulaştıklarında balıklarda ve kabuklularda hastalığa ve kitle halinde ölüm olaylarına neden olmakta, insanlarda ise çeşitli sağlık sorunları yaratmakta, hatta toplu ölümler görülebilmektedir.

Bu çalışmada Marmara Bölgesi'nde bulunan Küçükçekmece, Sapanca, İznik, Manyas ve Taşkısı göllerinden izole edilen mavi-yeşil alg suşlarından ve bu alanlarda aşırı artış gösteren türlerden cyanotoksin üretiminden sorumlu genlerin amplifiye edilmesi hedeflenmiştir. Ayrıca doğal ortamdaki izleme çalışmalarının laboratuvar ortamında yapılacak deneylerle desteklenmesi amacıyla real-time PCR ile Küçükçekmece gölünden izole edilen toksik suşun hangi çevresel koşulların etkisi altında artış yaptığı belirlenmeye çalışılmıştır. Aynı zamanda bu alanlarda aşırı artış gösteren alglerin tür tayinleri moleküler temelli yöntemler kullanılarak ortaya çıkarılmıştır. Örneklerden microcystin, nodularin, cylindrospermopsin ve saxitoksin üretiminden sorumlu genlerin çoğaltılması hedeflenmiştir.

Yapılan bu çalışmada Küçükçekmece gölünden toplam 8 suş elde edilmiş, bunlardan 3 *Microcystis aeruginosa* ve 1 *Microcystis flos-aquae* suşundan *Microcystis aeruginosa*'nın toksik olduğu ancak *M. flos-aquae*'nin ise toksik olmadığı belirlenmiştir. *Planktothrix agardhii*'ye ait 4 suştan ise, 2'sinin toksik olduğu görülmüştür. Taşkısı gölünden izole edilen MicT5C suşu *M. wesenbergii* olup *mcy*E geni varlığı tespit edilmiştir. Sapanca gölü'nden alınan 5 *P. rubescens* suşundan 4'ünde microcystin üretiminden sorumlu *mcy*E geninin varlığı tespit edilmiştir.

Kantitatif metodlar, göllerde microcystin üreten genusların araştırılmasında büyük önem taşımaktadır. Geliştirilen kantitafit metodlardan biri olan real-time PCR, toksik aşırı artışların oluşumlarının izlenmesi ve doğal ortamlardaki toksik suşların büyümelerini etkileyen faktörlerin açığa çıkarılmasını sağlamaktadır. Farklı N:P oranları eklenen kültür ortamlarında gelişimleri izlenen *M. aeruginosa* suşunda gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (real-time PCR) sonucuna göre en yüksek toksisitenin en yüksek N:P oranına sahip (16:1) ortamda gerçekleştiği görülmüştür.

SUMMARY

A GENETIC-BASED INVESTIGATION OF TOXIN PRODUCTION IN SOME BLUE-GREN ALGAE FROM FRESHWATERS OF MARMARA REGION

Blooms of blue-green algae (Cyanophyta=cyanobacteria) are commonly found in eutrophic fresh and brackish waters all over the world. These blooms affect the water quality and cause various problems such as filter occlusions in drinking water resources as well as taste and smell disorders and some of species threat livestocks because of ability of toxin producing mechanism. Biotoxins are generally called 'cyanotoxin' and most common type is 'microcystin'. Waters containing high value of microcystin represent a lethal threat to all live organisms.

Aim of this study was to amplify genes responsible for cyanotoxin biosynthesis from the cyanobacteria isolated from Lakes Küçükçekçekmece, Sapanca, İznik, Manyas and Taşkısı. The second aim of this study was to support monitoring investigations with laboratory experiments. For this reason, toxic cyanobacteria isolated from Lake Küçükçekmece was used to investigate effects of environmental factors on toxicity under culture conditions by application of real-time PCR. In the same time, identification of cyanobacterial species were examined by molecular based methods. We tried to amplify microcystin, nodularin, cylindrospermopsin and saxitoxin from culture and environmental samples.

In this study, 8 strains were obtained from Lake Küçükçekmece. *Microcystis flos-aquae* strain was non-toxic, but *Microcystis aeruginosa* was. Two of four *Planktothrix agardhii* strains were also found toxic. Target *mcy*E gene was also found in *M. wesenbergii* which named as micT5C from Lake Taşkısı, and 4 of 5 samples from Lake Sapanca.

Quantitative methods are needed in order to study the succession of the microcystin-producing genera in lakes. These methods would enable us to monitor the formation of toxic mass occurances and reveal the factors promoting the growth of toxic strains *in situ*. This study also investigated the effect of N and P concentrations in the medium on the growth and microcystin content of *M. aeruginosa*. According to real-time PCR and PP2A assay results, the highest microcystin concentration was detected at the highest N:P ratio (16:1).

1. GİRİŞ

Mavi-yeşil algler (Cyanophyta = Cyanobakteriler) prokaryot organizmalardır. Bu özelliklerinin yanı sıra hücre çeperlerinin mürein yapısı ve azot fiske etme özelliğine sahip özelleşmiş hücrelerinin (heterosist) bulunuşu onları diğer alg gruplarından ayıran ve bakterilere yaklaştıran özellikleridir. Ancak, klorofil-a içermeleri ve oksijenik fotosentez yapmaları nedeniyle de alglerle ortak özelliklere sahiptirler (Whitton ve Potts, 2000). Sucul ortamların fitoplanktonunda özel bir öneme sahip olan mavi-yeşil algler, yıl boyunca yüksek sayılarda bulunmasalar da, uygun koşullar altında aşırı çoğalmalar yaparak ortamdaki dominant organizma grubunu oluştururlar. Aşırı çoğalma yaptıkları dönemler bölgeden bölgeye ve alg türüne bağlı olarak değişiklik gösterebilir.

Spirulina sp. gibi bazı mavi-yeşil alg türlerinin biyomasındaki aşırı artış, tropik bölgelerde insanlar için bir besin kaynağı olarak kullanılmalarından dolayı zaman zaman yararlı sonuçlar doğururken, *Microcystis, Planktothrix, Anabaena, Aphanizomenon, Anabaenopsis, Nostoc, Nodularia, Cylindrospermopsis* gibi aşırı çoğalan genuslardan bazıları toksin üretme yeteneğine sahiptirler. Cyanotoksin olarak adlandırılan bu maddeler, Cyanophyta grubu tarafından üretilen sekonder metabolitlerdir (Carmicheal, 1992).

Cyanotoksinlerin en çok bilineni hepatotoksinler (microcystin)'dir (Carmicheal, 1994; Haider ve diğ., 2003). Microcystin *Microcystis, Anabaena, Oscillatoria, Nostoc, Hapalosiphon, Planktothrix ve Anabaenopsis* türleri tarafından üretilmektedir (Carmicheal, 1992; Sivonen ve Jones, 1999). Microcystin peptid sentetaz (NRPS) ve poliketid sentaz (NRPS/PKS) mekanizması tarafından ribozom dışı olarak sentezlenirler (Welker ve Dohren, 2006; Christiansen ve diğ., 2003; Dittmann ve diğ., 1997).

Sularda aşırı toksik mavi-yeşil alg artışları başta sağlık sorunları olmak üzere çevresel, sosyal ve ekonomik sorunlara neden olmaktadır. Yaygın olarak göl, baraj gölü, yavaş akan nehirler ve zaman zaman da lagünar alanlarda ortaya çıkan türler tarafından üretilen cyanotoksinler patolojik incelemelerde yaygın olarak hepatotoksin ya da nörotoksin sınıfı içerisinde incelenirler ve üretilen toksinler insan ve hayvanlarda hastalıklara hatta ölümlere neden olurlar (Bourke ve Hawes, 1983; Carmicheal, 1992; Carmicheal, 2001; Chorus ve diğ., 2000; Duy ve diğ., 2000).

Microcystin insanlarda başlıca karaciğer kanseri, baş dönmesi, sindirim ve solunum sisteminde anormallikler, deride kaşıntı gibi birçok hastalığa neden olmaktadır. Bu nedenle microcystinin bulunduğu sular bütün canlılar için ölümcül bir tehlike oluşturmaktadır (Sivonen ve Jones, 1999). Microcystin birçok hücresel faaliyet için gerekli olan PP1 ve PP2 serine protein fosfataz için engelleyicilerdir (Carmicheal, 1992, 1994; Luukkainen ve diğ., 1993; Luukkainen ve diğ., 1994). Protein fosfataz enzimleri, hücre büyümesi, tümör oluşumunu engellemesi gibi çeşitli hücresel işlemler için hayati önem taşır. Bu yüzden hepatotoksinler potansiyel kanser tetikleyicisidir (Carmicheal, 1992, 1994; Luukkainen ve diğ., 1993; Luukkainen ve diğ., 1994; MacKintosh ve diğ., 1990; Runnegar ve diğ., 1995a). Yapılan bir araştırma (MacKintosh ve diğ., 1990), microcystin-LR'nin laboratuvar hayvanlarında yüksek oranda kanser tetikleyicisi olduğunu göstermiştir. Laboratuvar çalışmalarında MC-LR'ın karaciğer tarafından bir saat gibi kısa bir sürede alındığı bildirilmiştir. Ressom ve diğ. (1993) toksik mavi-yeşil alg artışlarının olduğu içme suyu amaçlı kullanılan sularda karaciğer kanseri oranının yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

İnsanlar, kontamine olmuş içme sularını tüketme yoluyla ya da yüzme gibi suda yapılan aktiviteler sonucunda microcystine maruz kalmaktadırlar. Günümüze kadar cyanotoksinler hakkında birçok olay rapor edilmesine rağmen, 1996 yılında Brezilya'da hemodiyaliz ünitesinde cyanobakteri ile kontamine olmuş sular nedeniyle 126 hastanın zehirlenmesi ile dikkatler bu yöne çekilmiştir. Bu vakada 60 kişi ölmüştür (Pouria ve diğ., 1998).

Mavi-yeşil alglerden kaynaklı aşırı alg çoğalmaları sonucu sulardaki toksin konsantrasyonunun aşırı artışı en önemli çevre sorunlarından birini oluşturmaktadır. Ülkemizde cyanotoksinlerle ilgili araştırmalar oldukça yenidir. Bu konuda ilk araştırmalar Albay ve diğ. (2003a) tarafından Sapanca, Taşkısı ve İznik Gölleri ile Ömerli Baraj Gölü'nde yapılmıştır. Bu araştırmada cyanotoksinlerin vertikal değişimi ve çevresel faktörler ile olan ilişkileri incelenmiştir. Yine Albay ve diğ. (2003b) tarafından Ömerli Baraj Gölü (İstanbul)'nde su yüzeyinden uygulanan algisitin ($CuSO_4$) mavi-yeşil alglere ve cyanotoksin üretimine etkileri araştırılmıştır. Daha sonra yine Albay ve diğ. (2005) Küçükçekmece Gölü'nde cyanotoksin üretimini ve başta tuzluluk olmak üzere besin tuzları ile olan ilişkileri incelenmiş, Akçaalan ve diğ. (2006) ise dünyada ilk kez filamentli mavi-yeşil algden direkt toksin izole etmeyi başarmıştır. Ülkemizde cyanotoksinler üzerine ilk moleküler temelli araştırma Kaya (2008) tarafından yapılmıştır.

Cyanotoksinlerin olumsuz etkilerinden korunabilmek için yapısının, sentez mekanizmasının ve bu mekanizmayı etkileyen çevresel faktörlerin iyi bilinmesi gerekmektedir. Bu çalışmada Marmara Bölgesi göllerinden izole edilen mavi-yeşil alg suşları ve aşırı artış zamanında alınan doğal örneklerde cyanotoksin varlığı PCR temelli moleküler yöntemler kullanılarak belirlenmesi hedeflenmiştir. Ayrıca göllerde en çok bulunan microcystine besin tuzlarının etkisini belirlemek amacıyla Küçükçekmece gölünden izole edilen toksik *Microcystis* suşunda *mcy*A toksin geninin transkripsiyonuna bakılması amaçlanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. CYANOPHYTA (MAVİ YEŞİL ALGLER)'NIN GENEL ÖZELLİKLERİ

Mavi-yeşil algler (Cyanophyta= Cyanobakteriler) prokaryot olmaları nedeni ile diğer alglerden, fotosentez yapabilmeleri ile de bakterilerden ayrılırlar.

Mavi-yeşil alg hücreleri 1 ile 100 μm arasında değişen büyüklüklerde olabilirler. Nispeten daha büyük olan hücreler genellikle prokaryotik mRNA'nın kısa yarı ömrünü karşılayabilecek şekilde diskoidtir (Demoulin ve Janssen, 1981). Tek hücreliler kokoid, çubuk, diskoid, yıldız şeklinde ya da ipliksi formda olabilirler. Çok hücreli formlar genellikle küresel olup koloni halinde bulunurlar.

Mavi-yeşil alglerin hücre duvarı gram-negatif tiptedir. Peptidoglikan tabakası 10 nm ile bazı durumlarda 200 nm arası kalınlıkta olabilir (Büdel ve Rhiel, 1985). Müsilajlı kın birçok cyanobacteria türünde bulunmaktadır. Müsilaj (glikokaliks) yapısında polisakkaritler, polipeptidler ve UV radyasyonundan korumakla bağlantılı çeşitli pigmentler bulunur (Rambler ve diğ., 1977).

Bazı mavi-yeşil alglerin hücreleri 'gaz vakuolleri' denilen küçük düzensiz yapılara sahiptir. Bu yapılar algin suda yüzebilirliğini düzenlemekle görevli silindirik 'gaz kesesi' denilen deliklerde bulunur (Van Den Hoek ve diğ., 1995). Gaz keselerinin protein hücre duvarı atmosferik gazları nüfuz ederken suyun geçişine izin vermez. Gaz vakuolleri düşük ışık yoğunluğunda üretilir, yüksek ışık yoğunluğunda yok olurlar. Hücreyi sudan daha az yoğun yaparak algin yukarı doğru hareket etmesini sağlar. Bu döngü mavi-yeşil alglerin büyümeleri için en uygun olan su katmanında bulunmalarını ve kendileri için gerekli olan besin tuzlarına erişimlerini sağlamaktadır (Fay, 1983).

Mavi-yeşil alglerin üremeleri vejetatif ya da sporla üreme şeklindedir. Eşeysel üremeye rastlanmaz (Van Den Hoek, 1995).

Mavi-yeşil alglerin fotosentez kompleksi her düzeyde kloroplast yapılarının karşılaştırılması, nükleik asitlerden proteinlerine kadar çok iyi bir şekilde tanımlanmıştır (Gray ve Doolittle, 1982). Bu grubun üyelerinde klorofil-b bulunmamaktadır. Fotosistem I' de klorofil-a, fotosistem II'de de fikobilliprotein yardımcı pigmentleri olan allofikosiyanin, fikosyanin ve fikoeritrin bulunmaktadır (Van Den Hoek, 1995).

Fikosiyonin ve fikobilizomun diğer biloprotein pigmentleri Rhodophyta, Cryptophyta ve Cyanophyta'nın fotosistem II'deki en büyük ışık toplama duyargalarıdır (Dubbs ve Bryant, 1991; Glazer, 1989; Wilson, 1991). Tatlı su ortamlarında, bu organizmalar içinde Cyanophyta en çok karşılaşılan ve dominant olan gruptur (Bryant, 1982; Ernst, 1991). Fikosiyoninin sucul mikroorganizmalar arasındaki bu dağılımı, mavi-yeşil alglerin sınıflandırılmasında fikosiyonin gen dizilimindeki farklılıkların kullanılmasını sağlamıştır.

Cyanophyta üyelerinin en çarpıcı morfolojik özelliği metabolik adaptasyonlar için farklılaşmış hücrelere sahip olmalarıdır (Fay, 1983; Wolk ve Kraus, 1982). Bunların en başında havanın serbest azotunu fikse edebilen 'heterosist' olarak adlandırılan özel hücreler gelmektedir. Bunun yanı sıra, ipliksi formlarda ipliği (trikom) teşkil eden hücreler arasında vejetatif hücrelerden 'akinet' denilen spor hücrelerini geliştirme yeteneğine sahiptirler (Nichols ve diğ., 1982). Ortam şartları değiştiğinde, kapsüllenme olur, pigmentasyon değişir, metabolitler depolanır ya da kullanılır. Fotosentez durdurulabilir ve RNA düzeyi önemli oranda artar (Sutherland ve diğ., 1985). Akinetler bu gibi durumlara dayanıklıdır ve aşırı artış gösteren cyanophyta türlerinin sedimentte hayatta kalmalarından sorumlu mekanizmalarından biridir.

2.2. GÖLLERDE TOKSİK MAVİ-YEŞİL ALGLERİN AŞIRI ARTIŞI

Aşırı mavi-yeşil alg artışı genellikle ötrofik tatlı ve acı sularda görülen bir sorundur. Rekabete dayalı ortamlarda dağılım gösterdiklerinden dolayı, gereğinden fazla savunma ve adaptasyon mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bu adaptasyonların en önemlisi aşırı derecede biyoaktif, ökaryotlar ve memeliler için toksik sekonder metabolitleri (cyanotoksinler) üretmeleridir.

Aşırı mavi-yeşil alg artışı görsel kirliliğin yanında su kalitesini olumsuz yönde etkilemekte, içme suyu arıtma tesislerinde filtreleri tıkamakta, tat ve koku bozuklukları gibi birçok soruna da neden olmaktadır. Toksik alg artışlarına, antropojenik etkilerin yanında, iklim değişikliklerinin de neden olduğu belirtilmiştir (Codd, 2000). 1980'li yıllardan itibaren yapılan araştırmalarda aşırı artış gösteren mavi-yeşil alg türlerinden bir çoğunun toksin üretme yeteneğinde oldukları görülmüştür (Carmicheal, 1992; 1994; Haider ve diğ., 2003; Jones ve Sauter, 2005).

Aşırı mavi-yeşil alg artışlarından kaynaklanan cyanotoksinler vahşi ve evcil hayvanların yanında zaman zaman da insanlar üzerinde ölümcül etki yapabilmektedir. (Bourke ve Hawes, 1983a; Carmicheal, 1992, 2001; Chorus ve diğ., 2000; Duy ve diğ., 2000; Edwards ve diğ., 1992; Gugger ve diğ., 2005; Negri ve diğ., 1995; Saker ve Griffiths, 2001a; Pitois ve diğ., 2000). Algal toksinler insanlarda gastroenteritis, mide bulantısı, kusma, ateş, grip benzeri semptomlar, boğaz ağrısı, kulak ve gözde tahriş, isilik, karın ağrısı, akciğer konsolidasyonu, böbrek ve karaciğer hasarı gibi birçok rahatsızlığa neden olmaktadır. Günümüze kadar cyanotoksinler hakkında birçok olay rapor edilmesine rağmen, 1996 yılında Brezilya'da hemodiyaliz ünitesinde cyanobakteri ile kontamine olmuş sular nedeniyle 126 hastanın zehirlenmesi ile dikkatler bu yöne çekilmiştir. Bu vakada 60'ı aşkın insan ölmüştür (Pouria ve diğ., 1998).

Öte yandan her aşırı alg artışı toksik değildir. Toksin üretmedikleri halde aşırı artışları sonucu ekosistem üzerinde zararlı etkileri olan mavi-yeşil alg türleri de vardır. Yapılan moleküler temelli araştırmalarda toksik ve toksik olmayan türlerin aynı populasyonda yer aldığı tespit edilmiştir (Carmicheal, 1992; Lukac ve Aegerter, 1993; Utkilen ve Gjolme, 1992). Hatta cyanotoksin üretiminin aynı türün farklı suşları arasında bile değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Son yıllarda moleküler temelli çalışmalar büyük artış göstermiş ve cyanotoksinlerin tespiti için prob geliştirilmesi ve sahada tespiti amacı ile çeşitli araştırmalar yapılmıştır (Sutherland ve diğ., 1985; Wilmotte, 1994; Rasmussen ve diğ., 2007).

2.3. MAVİ-YEŞİL ALG TOKSİNLERİ (CYANOTOKSİNLER)

Mavi-yeşil algler alkaloidler, fosfat esterler, makrolidler, siklik penta ve heptapeptidleri içeren kimyasal olarak çok çeşitli toksinleri üretebilme potansiyelindedir. Üretilen cyanotoksinler nörotoksinler, dermatotoksinler ve hepatotoksinler olarak adlandırılmaktadır (Carmicheal 1992; 2001; 1994). Tatlısularda hepatotoksin olan microcystin ve nodularin, nörotoksik alkaloid olan anatoksin-a, homoanatoksin-a, saxitoksin ve hem hepatotoksik hemde nörotoksik alkaloid olan cylindrospermopsin baskın cyanotoksinler olarak tespit edilmişlerdir. Görülme sıklığı en az olan cyanotoksin nörotoksik doğal organofosfat anatoksin-a'dır (Carmicheal, 1994; Haider ve diğ., 2003).

Bilinen toksigenik cyanobacteria türleri (Tablo 2.1) yaklaşık 40 tanedir (Skulberg ve diğ., 1993; Carpenter ve Carmicheal, 1995; Chorus ve Bartram, 1999).

Tablo 2.1: Cyanotoksinler ve toksin üreten mavi-yeşil alg türleri (Kaebernick ve Neilan., 2001)

TOKSİN	CYANOBAKTERİYAL GENERA
HEPATOTOKSİK	
Microcystin	*Microcystis, Oscillatoria, Nostoc, Anabaena, Anabaenopsis*
Nodularin	*Nodularia*
Cylindrospermopsin	*Cylindrospermopsis, Aphanizomenon, Umezakia*
NÖROTOKSİK	
Anatoksin-a	*Anabaena, Oscillatoria, Aphanizomenon*
Anatoksin-a(s)	*Anabaena*
Saxitoksin	*Anabaena, Aphanizomenon, Lyngbya, Cylindrospermopsis, Planktothrix*
DERMATOTOKSİK	
Aplysiatoksin	*Lyngbya, Schizothrix, Oscillatoria*
Lyngbyatoksin-a	*Lyngbya*

Cyanotoksinlerin toksin etkinliği hayvan türlerinin hassasiyetine; hayvan tarafından maruz kalınan miktara; hayvanın cinsiyeti ve yaşına; ve cyanotoksine maruz kalan hayvanın midesindeki diğer besinlerin miktarına bağlı olarak değişir. Toksik cyanobacteria artışlarının toksisitesini ve formasyonunu etkileyen faktörler aşağıdaki gibi sıralanabilir (Carmicheal, 2001).

- Genetik özellikler; Toksin üreten ve üretmeyen suşlar bulunmaktadır.
- Büyüme; Optimum büyümeye öncülük eden faktörler optimum toksin üretimine de öncülük ederler.
- Tatlısularda aşırı mavi-yeşil alg artışı gösteren populasyonların toksisitesi toksin üreten populasyonun üretmeyen populasyona oranına ve yüksek biyomasa neden olan faktörlere bağlıdır.

2.4 Cyanotoksin üretiminin genetik TEMELİ

Son yıllarda araştırmacılar birçok bakteri, mantar ve bitki tarafından doğal ürünlerin sentezinde görevli işlevsel olarak benzer iki enzim kompleksi olan non-ribozomal peptid sentetaz (NRPS) ve poliketid sentazların (PKS) işlevleri ve dağılımları üzerine çalışmaktadırlar (Cane ve diğ., 1998; Moffitt ve Neilan, 2001a; Ehrenreich ve diğ.,

2005). NRPS ve PKS antibiyotikler, toksinler (Cane ve diğ., 1998), siderofor (Crosa ve Walsh, 2002) ve immünsüpresif (Cane ve diğ., 1998) gibi biyolojik olarak aktif bileşiklerin sentezinde görev alırlar. Bilindiği gibi sekonder metabolitler (cyanotoksinler gibi), organizma herhangi bir stres durumuyla karşılaştığı zaman faaliyete geçen özelleşmiş metabolik yollar tarafından üretilirler. Bu ürünlerin ara metabolizma ürünlerinden farkı, organizmanın büyümesi ve üremesi için mutlak gerekli olmamalarıdır. Buna rağmen atıkların uzaklaştırılması, detoksifikasyon, savunma ve hücreler arası haberleşme gibi organizma için birtakım önemli fonksiyonlar üstlenirler (Büber ve Açan, 2004).

Ribozom dışı sistemde, peptidler yüksek molekül ağırlıklı multienzimler (NRPS) aracılığıyla yağ asiti sentezine benzer bir mekanizma ile sentezlenirler. Ribozom dışı sentez mekanizmasında da aktivasyon, başlama, zincir uzaması ve sonlanma aşamaları bulunmasına ve gerekli enerji ATP hidrolizinden sağlanmasına rağmen, kalıp görevini mRNA yerine peptid sentetazlar üstlenir ve oluşan ürünlerde standart L-aminoasitlere ek olarak D-aminoasitler, çok çeşitli sıra dışı ve modifiye aminoasitler ve yağ asitleri bulunur (Büber ve Açan, 2004).

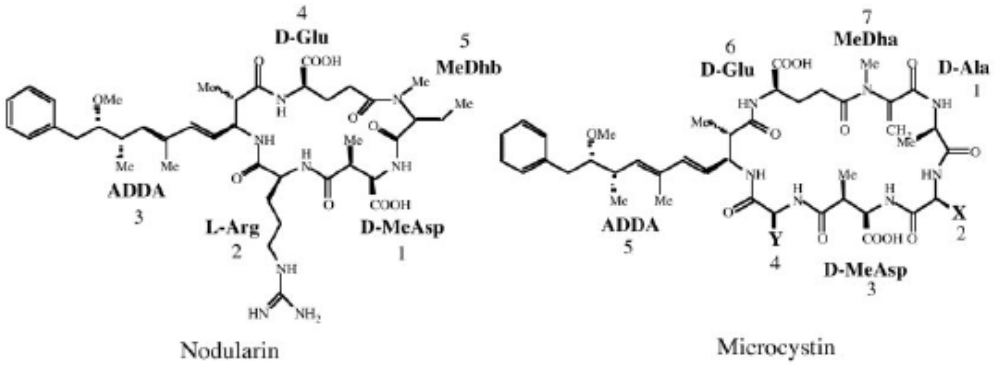
Peptid sentetazlar modül olarak adlandırılan alt birimlerden oluşurlar. Yaklaşık 1000 aminoasit içeren her modül, belirli bir aminoasit eklenmesi için özgüldür. Modüllerin sırası genellikle sentezlenen peptiddeki yapı taşlarının dizilişini belirler. Bu şekilde modüller peptid sentezinde kalıp işlevi görür. Bir modül, adenilasyon bölgesi, peptidil taşıyıcı bölgesi ve kondensasyon bölgesi olmak üzere en az üç domeyn içerir. Ayrıca oluşacak ürüne göre epimerizasyon, N-metilasyon gibi bölgeler bulundurabilir (Büber ve Açan, 2004).

2.4.1 Microcystin ve Nodularin

Yapısal olarak benzer olan hepatotoksik microcystin ve nodularin siklik hepta ve pentapeptidler olup her ikiside yapılarında ADDA amino asidini (2S,3S,8S,9S-3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyl-deca-4,6-dienoic acid) içerirler (Eriksson ve diğ., 1987). ADDA zinciri bu moleküllerin biyolojik aktivitesi için vazgeçilmezdir; ADDA zincirindeki değişimler hepatotoksinlerin toksisitesini azaltabilir (Carmicheal, 1992; Duy ve diğ., 2000; Stotts ve diğ., 1993; Mankiewicz, 2003).

Yaklaşık 70 microcystin varyantı tanımlanmışken sadece birkaç tane nodularin varyantı bulunmuştur (Chorus ve Bartram, 1999; Rinehart ve diğ., 1994; Sano ve Kaya, 1998; Brittain ve diğ., 2000; Namikoshi ve diğ., 1994). Bu varyantlar zincir üzerinde farklı aminoasitlerin yer almasıyla birbirlerinden ayrılırlar. Microcystinde özellikle zincirde bazı L aminoasitlerinin değişmesi ve bazılarının demethylasyonu ile microcystin varyantları oluşur (Chorus ve Bartram, 1999). Microcystin de iki değişken amino asit bulunmaktadır (X,Y). En yaygın bulunan varyantı microcystin-LR'de X Löisin'i, Y ise Arjinin'i göstermektedir. Nodularinde ise L-Arg homoarjininle ya da valin ile yer değiştirip nodularin varyantlarını oluştururlar (Moffitt ve Neilan, 2004) (Şekil 2.1).

Microcystin *Microcystis, Anabaena*, *Planktothrix, Nostoc*, *Anabaenopsis* ve *Hapalosiphon* gibi birçok tür tarafından üretildiği tespit edilirken (Sivonen ve Jones, 1999), filogenetik çalışmalar sonucu nodularinin sadece *Nodularia spumigena* Mertens tarafından üretildiği tespit edilmiştir (Eriksson ve diğ., 1987).



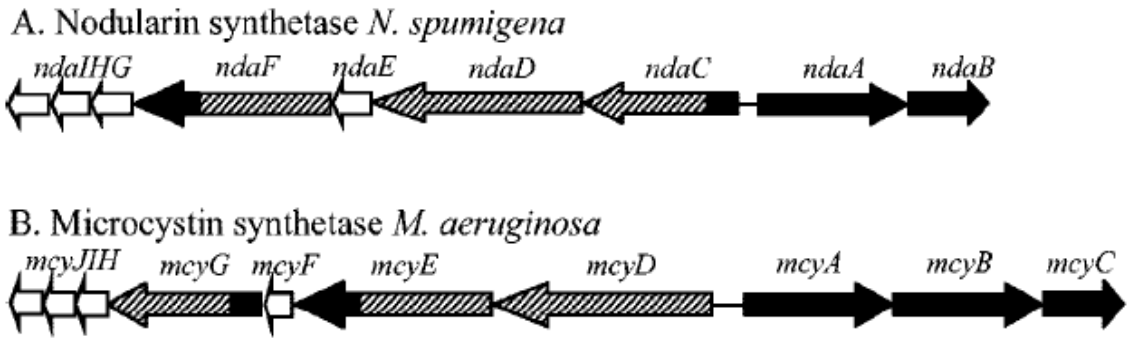
Şekil 2.1: Microcystin ve nodularinin yapısı (Moffitt ve Neilan, 2004)

Microcystin ve nodularin farklı kimyasal yapılarına rağmen benzer biyolojik aktivite göstermektedirler. İnsanlar ve hayvanlar için hepatotoksiktirler. Bu hepatotoksinler hem non-ribozomal peptid sentetaz (NRPS) hemde poliketid sentaz (PKS) domeyni içeren geniş çokişlevli enzim kompleksi tarafından sentezlenmektedir (Welker ve Dohren, 2006). Bu biyosentetik enzimler tarafından kodlanan gen kümeleri *Microcystis*, *Anabaena, Planktothrix* ve *Nodularia* gibi birçok mavi-yeşil alg genusunda sekanslanıp

tanımlanmıştır (Christiansen ve diğ., 2003; Dittmann ve diğ., 1997; Moffitt ve Neilan, 2004; Rouhiainen ve diğ., 2004; Tillett ve diğ., 2000a).

M. aeruginosa PCC7806 suşunda microcystin gen kümesi (*mcy*) 55 kb uzunluğundadır ve iki ayrı operonda 10 gen içermektedir. En geniş operon PKS modülünü (*mcy*D), iki hibrid PKS/NRPS modüllerini (*mcy*G ve *mcy*E) ve bunlara ek olarak tailoring enzimleri (*mcy*J,F,I) ile varsayılan toksin taşıyıcısını içermektedir. Daha küçük olan operon ise üç NRPS modülünden (*mcy*A-C) oluşmaktadır (Şekil 2.2). Bunlara ek olarak, *Planktothrix agardhii* (Gom) Anag&Kom'de bulunan *mcy* gen kümesi tioesteraz domeynini kodlayan *mcy*T genini içermektedir (Moffitt ve Neilan, 2004).

N.spumigena NSOR10 suşunda nodularin sentezinden sorumlu gen kümesi (*nda*) *mcy*'ye çok benzerdir ve microcystinde olduğu gibi PKS ve NRPS tarafından sentezlenmektedir. Gen kümesi 48 kb uzunluğunda olup 9 açık okuma çerçevesinden oluşmaktadır. Gen kümesindeki *nda*A-*nda*I NRPS modüllerini, PKS modüllerini ve tailoring enzimlerini kodlamaktadır (Şekil 2.2) (Moffitt ve Neilan, 2004).



Şekil 2.2: *M.aeruginosa* ve *N.spumigena* NSOR10 suşlarından elde edilen gen kümeleri (A) *N.spumigena* NSOR10, (B) *M .aeruginosa*. Taralı: poliketid sentazlar; siyah: non-ribozomal peptid sentetaz; beyaz: tailoring enzimleri (Moffitt ve Neilan, 2004)

Hepatotoksinler insanlarda başlıca karaciğer kanseri, baş dönmesi, sindirim ve solunum sisteminde anormallikler, deride kaşıntı gibi birçok hastalığa neden olmaktadır. Microcystin mide bağırsak yolunda sindirime karşı direnç göstermektedirler. Toksinler safra asidi taşıyıcı sistemi gibi aktif taşıyıcı sistem ile karaciğerde yüksek konsantrasyonlara ulaşır (Runnegar ve diğ., 1995a). Microcystin ve nodularin birçok hücresel faaliyet için gerekli olan PP1 ve PP2 serine protein fosfataz için

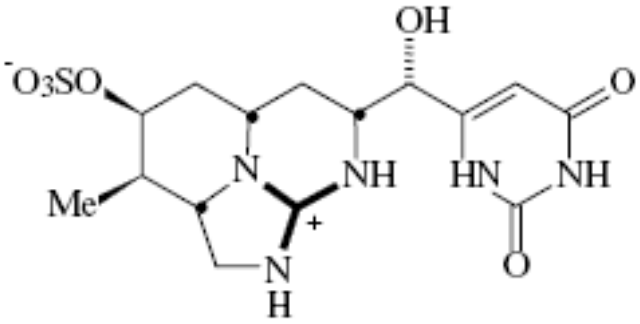
engelleyicilerdir (Carmicheal, 1992, 1994; MacKintosh ve diğ., 1990). Protein fosfataz enzimleri, hücre büyümesi, tümör oluşumunu engellemesi gibi çeşitli hücresel işlemler için hayati önem taşır. Bu yüzden hepatotoksinler potansiyel kanser tetikleyicisidir (Nishiwaki-Matsushima ve diğ., 1992; Carmicheal, 1994; Runnegar ve diğ., 1995a). MacKintosh ve diğ. (1990) microcystin-LR'nin laboratuvar hayvanlarında yüksek oranda kanser tetikleyicisi olduğunu göstermiştir. Laboratuvar çalışmalarında microcystin-LR'nin karaciğer tarafından 1 saat gibi kısa bir sürede alındığı bildirilmiştir. Ressom ve diğ. (1993) toksik mavi-yeşil alg artışlarının olduğu içme suyu amaçlı kullanılan sularda karaciğer kanseri oranının yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

2.4.2 Cylindrospermopsin

Bir cyanobacterial alkaloid toksin olan cylindrospermopsin ilk olarak 1979 Avustralya'da 148 kişinin hepatoenteritis teşhisi ile hastaneye kaldırılmasıyla tanımlanmıştır. Bu salgın daha sonra içme suyu kaynağında *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju aşırı artışı ile ilişkilendirilmiştir (Bourke ve diğ., 1983b; Byth, 1980). Cylindrospermopsinin insan sağlığı üzerindeki etkisinin yanında birçok hayvan ölümüne neden olarak büyük ekonomik kayıplar verilmesine neden olmuştur (Saker ve diğ., 1999; Mihali ve diğ., 2008). Cylindrospermopsin hepatotoksik alkaloid olarak sınıflandırılabilir ancak toksikolojik çalışmalar, toksisiteden başlıca etkilenen organ karaciğer olmasına rağmen böbrek gibi diğer organlarında etkilendiğini göstermiştir (Seawright ve diğ., 1999). Cylindrospermopsin hepatotoksik, sitotoksik (Runnegar ve diğ., 1995b; Runnegar ve diğ., 2002) ve nörotoksik (Kiss ve diğ., 2002) etkiye sahiptir. Bunu yanı sıra karsinojenik etkisi de vardır (Humpage ve diğ., 2000). Toksisitesi sitokrom P450'nin inhibisyonunun yanı sıra glutatyon ve protein sentezinin inhibisyonu ile de ortaya çıkmaktadır. Önemli bir indirgeyici ajan ve antioksidan olan glutatyon, hücrenin oksido-redüksiyon dengesini sürdürüp hücreleri endojen ve ekzojen kaynaklı oksidanların zararlı etkilerinden korumaktadır (Runnegar ve diğ., 1995b; Runnegar ve diğ., 2002).

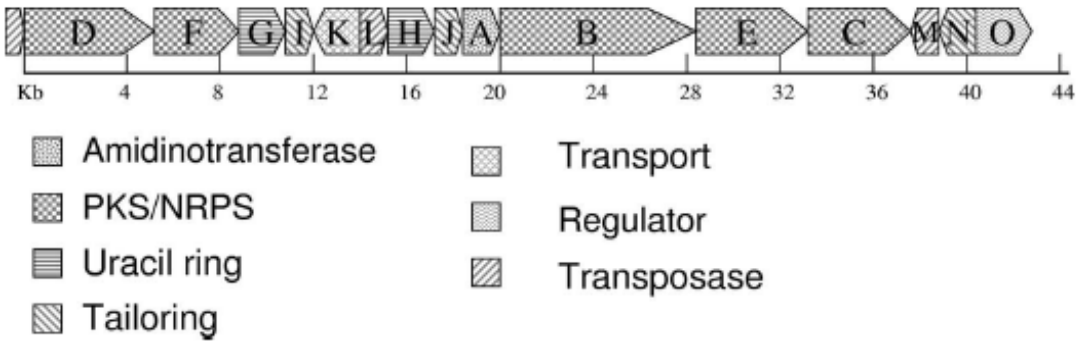
Ohtani ve diğ. (1992) cylindrospermopsinin kimyasal yapısını belirlemişlerdir. Toksin sülfatlı, hidroksimetilurasile bağlı merkezi guanidino iskelete sahip trisiklik yapıdan oluşmaktadır. Hidroksil köprüsündeki 7-epicylindrospermopsin epimerinin doğal olarak

bulunması, ve hidroksil grubunda C–7, 7-deoxycylindrospermopsin'in bulunmadığı varyantlar rapor edilmiştir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Cylindrospermopsinin yapısı (Schembri ve diğ., 2001)

Cylindrospermopsin sentezinden sorumlu gen kümesi (*cyr*) 43 kb'dir ve toksinin biyosentezi ve regülasyonu için gerekli olan genleri içeren 15 açık okuma çerçevesinden oluşmaktadır (Şekil 2.4). *aoa*A, *aoa*B ve aoaC genleri *Aphanizomenon ovalisporum*'da tespit edilmiştir. Bu genler sırasıyla amidinotransferaz, hibrid NRPS/PKS ve PKS'i kodlayan genlerdir. Ne bu genler tarafından üretilen ürünlerin biyokimyasal yapıları tam olarak tanımlanmıştır ne de ürünlerin cylindrospermopsin biyosentezine dahil oldukları kanıtlanabilmiştir. Bununla birlikte, toksik ve toksik olmayan *C. raciborskii*, toksik *Anabanena bergii* ve toksik *Umezakia natans* suşları üzerinde yapılan çalışmalarda bu genlerin yalnızca cylindrospermopsin üreten suşlarda bulundukları tespit edilmiştir. (Mihali ve diğ., 2008).



Şekil 2.4: C. *raciborskii* AWT205 suşundan elde edilen gen kümesinin yapısı (Mihali ve diğ., 2008)

Cylindrospermopsin ilk olarak *Cylindrospermopsis raciborskii*'den izole edilmiş olmakla beraber *Aphanizomenon ovalisporum, Aphanizomenon flos-aquae, Umezakia natans, Raphidiopsis curvata* ve *Anabaena bergii*'ninde bu toksini ürettikleri belirlenmiştir (Mihali ve diğ., 2008).

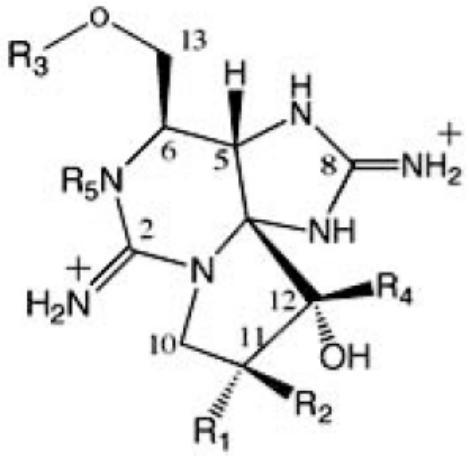
2.4.3 Saxitoksin

Saxitoksin ve analogları sinir ve kas hücre membranlarında sodyum kanallarını bloke ederek paralitik kabuklu zehirlenmesine (PSP) neden olurlar. Sodyum iyonlarının sinir hücrelerinin membranlarından geçişini engelleyerek sinirler boyunca sinyal iletimini engeller. Saxitoksin iskelet kası hücrelerinde aksiyon potansiyelini engelleyerek doğrudan bir etkiye sahiptir (Kellmann ve Neilan, 2007).

PSP, saxitoksin ve analoglarıyla kontamine olmuş deniz ürünleri ya da içme sularının tüketimi sonucu meydana gelir. Bu toksinler kalp kaslarının işlevleri için önemli olan kalsiyum ve potasyum kanallarının ve neuronal sodyum kanalları gibi sodyum kaplı iyon kanallarının işlevlerini bloke etmektedir. PSP hem tatlısu hem de denizel organizmalar tarafından üretilir. Saxitoksin üreten denizel dinoflagellatlar; *Alexandrium, Gymnodinium* ve *Pyrodinium* genuslarıdır. Bu türler dünyada insanları etkileyen yıllık yaklaşık 2000 olaya neden oldukları tahmin edilmektedir. Tatlısu ortamlarında bilinen PSP toksinleri üreticileri; *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* ve *Lyngbya'*dır (Kellmann ve Neilan, 2007).

Saxitoksin ile kontamine olmuş mollusklar tüketildikten 5 ila 30 dakika sonra ağız çevresinde hafif bir karıncalanma hissedilir, daha sonra yüze ve bazı durumlarda boyuna yayılan uyuşukluk meydana gelir. Ciddi durumlarda yutkunma güçlüğü, boğazda sıkışma hissi, konuşmada zorlanma görülür. 2 ila 12 saat içinde çok ciddi durumlarda felç görülür, solunum durmasıyla ölüm meydana gelir. 12 saat sonra ciddi bir durum yoksa hasta yavaş yavaş iyileşmeye başlar ve birkaç gün içinde semptomlar ortadan kalkar. Diğer semptomlar baş ağrısı, baş dönmesi, bulantı ve kusmadır (Llewellyn, 2006).

Saxitoksin, trisiklik perhydropurine alkaloidtir. Yaklaşık 30 tane anoloğu rapor edilmiştir. Saxitoksin analogları hidroksillenmiş, sülfatlanmış ya da karbamoillenmiş olabilir (Llewellyn, 2006) (Şekil 2.5).

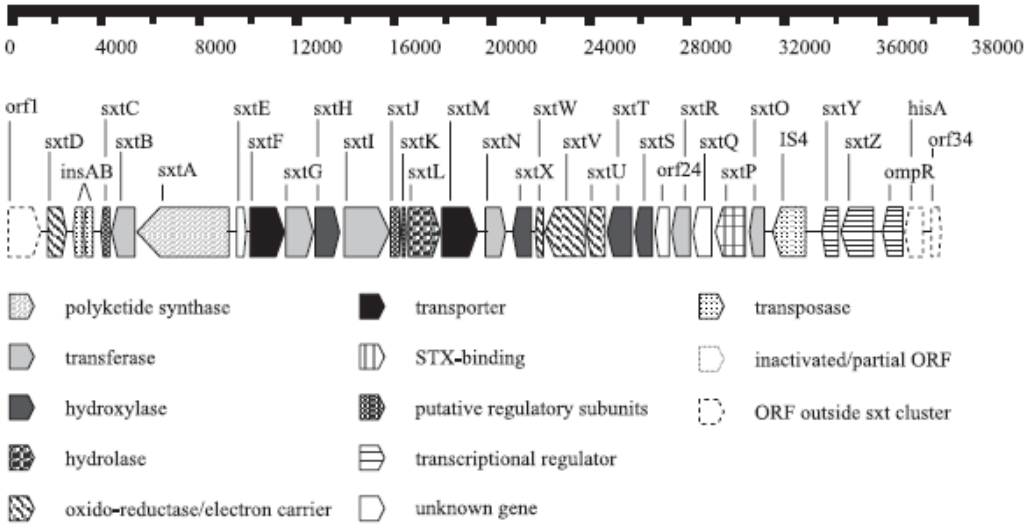


PST	R1	R2	R3	R4	R5
STX [a,b]	H	H	$CONH_2$	OH	H
NeoSTX [b]	H	H	$CONH_2$	OH	OH
GTX1	H	OSO_3^-	$CONH_2$	OH	OH
GTX2 [a]	H	OSO_3^-	$CONH_2$	OH	H
GTX3 [a]	OSO_3^-	H	$CONH_2$	OH	H
GTX4	OSO_3^-	H	$CONH_2$	OH	OH
GTX5(B1)	H	H	$CONHSO_3^-$	OH	H
GTX6(B2)	H	H	$CONHSO_3^-$	OH	OH
C1 [a]	H	OSO_3^-	$CONHSO_3^-$	OH	H
C2 [a]	OSO_3^-	H	$CONHSO_3^-$	OH	H
C3	H	OSO_3^-	$CONHSO_3^-$	OH	OH
C4	OSO_3^-	H	$CONHSO_3^-$	OH	OH
DcSTX	H	H	H	OH	H
DcneoSTX	H	H	H	OH	OH
dcGTX1	H	OSO_3^-	H	OH	OH
dcGTX2	H	OSO_3^-	H	OH	H
dcGTX3	OSO_3^-	H	H	OH	H
dcGTX4	OSO_3^-	H	H	OH	OH

Şekil 2.5: Başlıca paralitik kabuklu toksinleri (PST) (Mihali ve diğ., 2009). [a]PST'ler *Anabaena circinalis* AWQC131C suşundan, [b]PST'ler *Aphanizomenon* sp. NH-5 suşundan elde edilmiştir. STX, saxitoxin; GTX, gonyautoksin; dc, decarbamoyl

Saxitoksin biyosentezi ve modifikasyonları üzerine birçok çalışma yapılmasına rağmen biyosentezden görevli enzimler ya da genler tanımlanamamıştır. Kellmann ve diğ. (2008) yaptığı çalışmalar sonucunda putative saxitoksin biyosentetik gen kümesi (*sxt*)

C. raciborskii T3 suşunda belirlemişlerdir. Buna göre *sxt* 35 kb uzunluğunda olup 31 açık okuma çerçevesine sahiptir. Gen kümesi *0*-karbamoilltransferaz (*sxt*I), metiltranferaz (*sxt*A1), II aminotransferaz (*sxt*A4), amidinotransferaz (*sxt*G) ve dioksijenaz enzimlerini içermektedir (Şekil 2.6).



Şekil 2. 6: *C. raciborskii* T3 suşundan elde edilen s*xt* gen kümesinin yapısal organizasyonu (Kellmann ve diğ., 2008). IS4, insersiyon sekansı 4; ompR, ompR ailesinin transkripsiyonel regülatörü; hisA, iki bileşikli histidin kinaz; orf24, ORF 4

2.5 ÇEVRESEL FAKTÖRLERİN TOKSİN ÜRETİMİNE ETKİSİ

Çevresel faktörlerin cyanotoksin üretimine etkisi çok tartışmalı bir konudur. Bir su kaynağında meydana gelen aşırı artışlar seneden seneye toksik olup olmamalarına göre değişiklik gösterebilir. Mikroskobik olarak ayırt edilemeyen aynı türe ait farklı suşların, örneğin toksik ve toksik olmayan suşlar, aynı kompozisyonda bulunmaları bu duruma en uygun örnektir. Bununla birlikte, farklı laboratuvar koşullarında bazı türlerin yüksek ya da düşük toksisite gösterdikleri bilinmektedir. Işık yoğunluğu, sıcaklık, besin tuzları ve iz elementler gibi çevresel parametreler laboratuvar koşullarında sağlanarak ve cyanotoksin üretimi üzerindeki etkileri bakımından incelenmiştir (Rapala ve diğ., 1997; Sivonen, 1990; Lukac ve Aegerter, 1993; Van Der Westhuizen ve Eloff, 1985).

Işık yoğunluğu ve toksin üretimi üzerine yapılan çalışmaların sonuçları farklı suşlar ve farklı ışık yoğunluklar nedeniyle çok değişkendir. Bununla birlikte yapılan çalışmalara göre, birçok cyanotoksinin düşük ışık yoğunluğunda düşük toksin konsantrasyonuna ve yüksek ışık yoğunluğunda da yüksek toksin konsantrasyona sahip olduğu belirtilmiştir (Lehtimaeki ve diğ., 1994; Rapala ve diğ., 1993; Rapala ve diğ., 1997).

Azot ve fosfor gibi besin tuzları mavi-yeşil alglerin gelişimleri için çok önemlidir. Besin tuzu konsantrasyonlarının microcystin sentezini etkilediğini belirten birçok çalışma yapılmıştır. Watanabe ve Oishi (1985) MA besi ortamında bulunan N konsantrasyonunun 1/10 ve 1/20 azaltıldığında toksisitenin kayda değer şekilde azaldığını rapor etmiştir. Bununla birlikte, P konsantrasyonundaki aynı orandaki azaltmaların toksisiteyi çok az azalttığını göstermiştir. Diğer taraftan, düşük demir konsantrasyonunun yüksek toksin üretimiyle ilişkilendirildiği çalışmalarda bulunmaktadır (Lukac ve Aegerter, 1993).

Çevresel koşullara göre toksin üretimindeki değişimleri ve toksisiteyi belirlemek için genellikle HPLC, ELİSA ve protein fosfataz inhibisyon deneyi gibi analitik yöntemlerin yanında real-time PCR gibi moleküler yöntemlerde kullanılmaktadır. Real-time PCR ile mRNA'nın belirlenmesi ve miktarının ölçümü aracılığıyla gen anlatımının miktarı belirlenmiştir. Bu amaçla; Küçükçekmece Gölü'nde aşırı artışlara neden olan *Microcystis aeruginosa* seçilerek farklı N:P oranlarının bulunduğu BG11 ortamına ekilmiştir. Kültürlerin gelişimleri hücre sayımları ile izlenmiştir. Kültürlerin toksisiteleri PP2A deneyi ile belirlenirken, toksin üretimi real-time PCR ile ölçülmüştür.

2.6 ÇALIŞMADA KULLANILAN YÖNTEMLER

2.6.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu, hedef DNA'da ilgili bölgeye ve tamamlayıcısına özgün olan iki oligonukleotid primer kullanılarak belirli DNA dizilerinin enzimatik olarak sentezlendiği *in vitro* yöntemdir (Erlich, 1989).

PCR mekanizması yüksek sıcaklıkta aktivite kaybetmeyen bir DNA polimeraz enzimi kullanılarak, bir Isı Döngüleyici yardımıyla kalıp DNA veya RNA'nın tüp içerisinde

primerler ve uygun karışım yardımıyla sıcaklık döngüsü kullanılarak çoğaltılması esasına dayanmaktadır.

PCR işlemi için DNA, primer, buffer, $MgCl_2$, dNTP, Taq polimeraz ve distile su içeren bir karışım hazırlanıp PCR reaksiyonu ısı döngüleyici de gerçekleştirilmektedir.

2.6.2 16S Ribozomal RNA Gen (16S rDNA) PCR

Mavi-yeşil alglerde (ve diğer bakterilerde) ribozomlar her biri proteinlerle ilişkili üç çeşit yapısal RNA'dan oluşmaktadır. Bunlar, 'büyük' 23S ribozomal RNA, 'küçük' 16S ribozomal RNA ve 'daha küçük' 5S ribozomal RNA'dır (S, Svedberg birimine karşılık gelmektedir). 23S rRNA yaklaşık 2900 bç, 16S rRNA 1550 bç, 5S rRNA ise yaklaşık 120 bç uzunluğundadır (Van Den Hoek, 1995).

16S ribozomal RNA (rRNA) geni, prokaryotik organizmalarda ribozomun küçük alt biriminde (30S) bulunan 16s rRNA'yı şifreleyen gendir. 16S ribozomal RNA'lar evrensel moleküllerdir. Canlılardaki benzer yapıları aynı atadan evrimleştiklerini ve şimdiye kadar kökenlerinin çok az değiştiğini göstermektedir (Wilmotte, 1994).

16S rRNA geninin üzerinde korunmuş bölgeler bulunması ve bu genin protein sentezindeki fonksiyonları hücrenin işlevi için çok önemli olduğunu düşündürmektedir. Bunun yanı sıra, her türe göre değişen dizelere sahiptir. Değişken dizilerin PCR ile çoğaltılması sayesinde tür tayini mümkün olabilmektedir. Deneysel olarak 16S rRNA daha rahat çalışılabilir. Bilgisayarla yapılan çalışmalarda, 16S rRNA'nın belirli bölgelerinde, belirli grup organizmaya has "imza sekansı" denilen kısa oligonükleotid sekansları tespit edilmiştir (Wilmotte, 1994).

2.6.3 HEP PCR

Microcystin ve nodularin farklı kimyasal yapıları olmasına rağmen benzer biyolojik aktivite göstermektedirler. Bu toksinler NRPS ve PKS modüllerini içeren çokişlevli geniş bir enzim kompleksi tarafından ribozomsuz olarak sentezlenmektedirler. Son yıllarda, bu enzimleri kodlayan gen demetleri, *mcy* ve *nda*, *Microcystis*, *Anabaena*,

Planktothrix ve *Nodularia* gibi birkaç cyanobacterial türde belirlenerek kısmen karakterize edilmiştir (Neilan ve Pearson, 2008).

NRPS genleri *mcy*A ve *mcy*B hepatotoksik genotipler için en çok hedef olarak belirlenen gen olmakla beraber, diğer *mcy* genleri de bireysel olarak kullanılmıştır. Örneğin Rantala ve diğ. (2006) microcystin üretimini belirlemek için mixed PKS/NRPS genini (*mcy*E) hedef olarak seçmişlerdir. *mcy*E geni Adda'nın biaktif yan zincirinin sentezi için vazgeçilmez olduğundan ve microcystin molekülüne D-glutamat'ın eklenmesi ve aktivasyonunda görevli olmasından dolayı hedef olarak seçilmesi mantıklıdır (Neilan ve Pearson, 2008).

Bunun yanısıra, Jungblut ve Neilan'da (2006) *mcy*E genini ve bu genin homoloğu olan *nda*F'yi diyagnostik hedef gen olarak seçmişlerdir. Böylece bütün hepatotoksik mavi-yeşil algler aynı anda tek adım PCR ile tespit edebilmektedir.

2.6.4 Protein Fosfataz İnhibisyon Deneyi

Microcystin memelilerde, balıklarda ve omurgasızlarda akut olarak toksik etkiye sahiptir. Moleküler düzeyde geri dönüşümsüz olarak serine/threonine protein fosfataz 1 ve 2A'ya (PP1,2A) bağlanarak inhibe ederler (Wong ve diğ., 1999).

Protein fosfatazlar, protein kinazın tersine aktivitesini katalizleyen enzimlerdir. Fosfatazlar ökaryot hücrelerin çekirdeksel ve sitoplazmik bölümlerindeki serin ve treoninin defosforilasyonundan sorumludurlar. Bu enzimlerin aktivitelerinin inhibisyonu normal hücre yapısını ve fonksiyonunu bozarak sağlıklı hücrelerin tümor hücrelerine dönüşmesine neden olabilmektedir. Bu nedenle PP2A asseyi ile örneklerde bulunan microcystin miktarı belirlenebilmektedir (Wong ve diğ., 1999).

2.6.5 Real-time PCR

Real-time (gerçek zamanlı) PCR, DNA'nın çoğaltımını ve ürünlerini tek bir tüpte belirlemeyi mümkün kılan bir yöntemdir. Gen anlatım analizini değiştiren bu yöntem ile geleneksel PCR yöntemi ve gen analizi birleştirilmiştir. PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA miktarı ile doğru orantılı olarak arttığı yöntemdir. PCR ürün miktarındaki

ilk önemli artış orjinal kullanılabilir kalıp DNA'nın toplam miktarı ile korelasyon oluşturmaktadır (Günel, 2007).

Biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve mRNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme en çok kullanılan alanlarını oluşturmaktadır. Bu amaçlarla kullanımının yanı sıra tek nokta mutasyonlarını belirleme, patojen belirleme, DNA hasarı belirleme, metilasyon tespiti, SNP analizi, kromozom bozukluklarının tespiti gibi çalışmalarda da kullanım alanları mevcuttur (Günel, 2007).

Çift zincirli DNA'ya bağlanan "SYBR-Green I" floresan boya en basit yöntemdir. Bu yöntemde kullanılan floresan boya sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığından çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak real-time PCR cihazında okunan floresanın miktarı da eş zamanlı olarak artar (Günel, 2007).

Çoğaltımın başında reaksiyon karışımında çift zincirli DNA molekülü, primerler ve "SYBR Green I" boyası bulunmaktadır. Bağlı olmayan serbest DNA molekülü çok az bir floresan ışıma yapar. Primerler bağlanıp uzama başladığında boya molekülü çift zincirli DNA'nın arasına girer ve floresan yayılımı başlar. Başlangıçtaki döngü boyunca sinyal zayıftır; ürün miktarı arttıkça floresan miktarı hızla artar ve bu artış "real-time" cihazının monitöründen izlenebilir (Günel, 2007).

Real-time PCR sonuçlarını hesaplamak için kullanılan en yaygın yöntemler mutlak ve karşılaştırmalı ölçümlerdir. Mutlak ölçüm ile bilinen konsantrasyonlardaki örnekler kullanılarak bir standart eğri elde edilmektedir. Bu standart plasmid dsDNA, *in vitro* tanımlanan RNA ya da hedef genin ekspresyonunu yapabilecek herhangi bir cDNA örneği olabilir (Giulietti ve diğ., 2001).

Karşılaştırmalı ölçüm hedef gene ekspresyon düzeyi 'housekeeping gene' olarak adlandırılan internal kontrolle karşılaştırmalı olarak ölçülmektedir. Bununla beraber, karşılaştırmalı ölçüm için bilinen konsantrasyonlarla standartlar gerekmemektedir. Oranlar arasındaki karşılaştırma kullanılmaktadır (Giulietti ve diğ., 2001).

2.7 ÇALIŞMADA KULLANILAN ALG TÜRLERİ

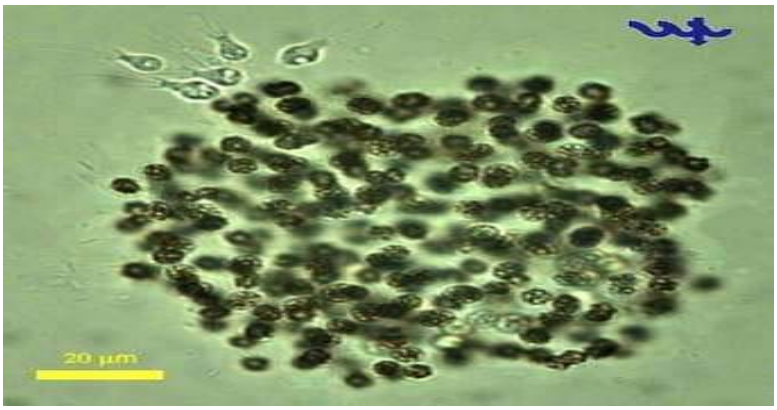
Phylum : Cyanophyta
Ordo : Chroococcales
Genus : *Microcystis*
Species : *Microcystis aeruginosa* (Kütz) Kütz
Microcystis flos-aquae (Witt) Kirchner
Microcystis wesenbergii (Komárek) Komárek in Kondrateva

Microcystis genusu mavi-yeşil alglerin önemli bir grubunu oluşturmakla beraber bu türler geniş bir alanda yayılım göstermektedirler (Watanabe ve diğ., 1996). *Microcystis* spp., heterosist ve akinet oluşturmazlar. *Microcystis* genusunun tür tayinlerinde hücrelerin boyutu, şekli ve kolonilerin hücre tipleri büyük önem taşımaktadır. Şu ana kadar *Microcystis*'in sadece tek tür toksin (microcystin) ürettiği tespit edilmiştir. Diğer toksik cyanobacteria türleri ise iki toksin birden (microcystin-anatoksin veya microcystin-citotoksin) üretebilmektedirler (Watanabe ve diğ., 1996). Aşırı alg artışlarında en çok karşılaşılan genus olan *Microcystis* genellikle toksik olup toksik olmayan türleri de mevcuttur (Chorus ve diğ., 2000). Hepatotoksin üreten türler arasında yer alan *Microcystis* dünya da en çok çalışılan tür olarak dikkat çekmektedir ve bu güne kadar tanımlanan toksik 3 türü bulunmuştur. Bunlar; *M. aeruginosa* (Şekil 2.7), *M. flos-aquae* (Şekil 2.8) ve *M. wesenbergii*'dir (Şekil 2.9).

Mevcut çalışmada kullanılan 3 *Microcystis* suşu aşırı artış olan dönemlerde Küçükçekmece ve Taşkısı göllerinden izole edilmiştir, ayrıca iki doğal örnek Küçükçekmece Gölü'nden *Microcystis* aşırı artışında toplanarak liyofilize edilip saklanmıştır.



Şekil 2.7: *Microcystis aeruginosa*



Şekil 2.8: *Microcystis flos-aquae*



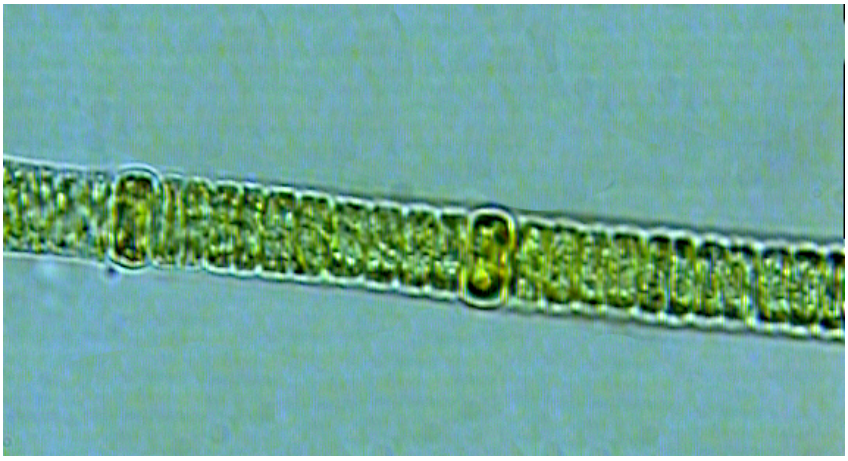
Şekil 2.9: *Microcystis wesenbergii*

Phylum : Cyanophyta

Ordo : Nostocales

Genus : Nodularia

Species : *Nodularia spumigena*



Şekil 2.10: *Nodularia spumigena*

Nodularia genusu *Nostocales* ordosuna aittir. Heterosist ve akinetleri bulunmaktadır. *Nodularia* türlerinden iki tanesi gaz vakuolleri sayesinde birbirlerinden ayrılırlar, *N. spumigena* gaz vakuollerine sahipken *N. harveyana* da gaz vakuolü bulunmamaktadır (Komarek ve diğ., 1993). *Microcystis*'ten farklı olarak filamentli yapıda olup çoğunlukla tuzlu ya da acısularda görülmektedir (Jones ve diğ., 1994). Toksik *Nodularia spumigena* Baltık Denizi'nde yaz aylarında aşırı artışlara neden olmaktadır (Edler ve diğ., 1985; Nehring ve diğ., 1993; Sivonen ve diğ., 1989). Bunun dışında Avustralya ve Yeni Zellanda da acısu göllerinde ve haliçlerde, Amerika, Uruguay ve Meksika'da tuzlu göllerde ve lagünlerde bulunmaktadır (Akçaalan ve diğ., 2009).

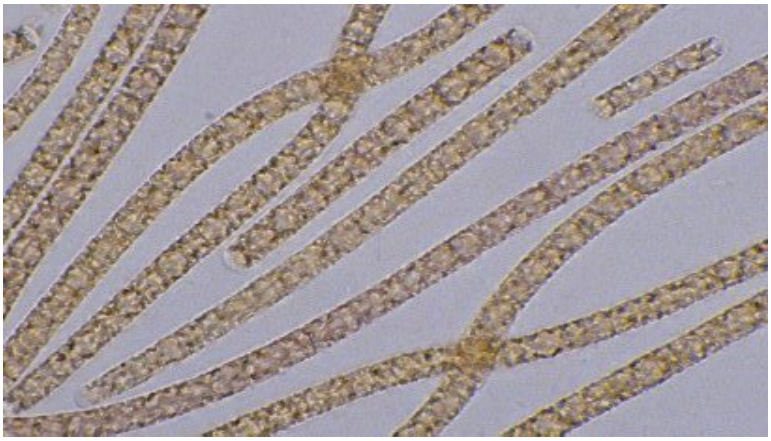
Avrupa kıtasındaki tatlısu göllerinde ilk rapor edilen toksik *N. spumigena* İznik gölünde tespit edilmiştir (Akçaalan ve diğ., 2009). Daha önceki çalışmalarda *N. spumigena* Türkiye göllerindeki floristik çalışmalarda toksisitesi ve biyoması hakkında bilgi verilmeden kaydedilmiştir (Gönülol ve Çomak, 1992; Akçaalan ve diğ., 2009).

Mevcut çalışmada kullanılan *N. spumigena* İznik gölünden izole edilmiştir. *N. spumigena* göl yüzeyini kaplayacak ölçüde yoğun bir artışa sebep olmamıştır. Ancak ortamdan izole edilerek kültüre alınmıştır.

Phylum : Cyanophyta
Ordo : Oscillatoriales
Genus : Planktothrix
Species : *Planktothrix agardhii*
: *Planktothrix rubescens* (D. C. ex Gom) Anag&Kom



Şekil 2.11: *Planktothrix agardhii*



Şekil 2.12: *Planktothrix rubescens*

Planktothrix (Oscillatoria) genusu koloni halinde bulunmaz. Hücreler disk şeklindedir. Heterosist, akinet veya yalancı dallanma oluşumu görülmez (Van Den Hoek ve diğ., 1995). Aşırı artış gösteren türleri pigment kompozisyonuna ve habitatlarına göre ayırt edilebilir. *P. agardhii* (yeşil varyete) sığ, besin tuzunca zengin, karışımın fazla olduğu habitatları tercih ederken, *P. rubescens* (kırmızı varyete)'in genellikle oligo-mezotrofik

göllerin metalimniyonunda bulunduğu rapor edilmiştir (Loizzio ve diğ., 1988; Barco ve diğ., 2004; Akçaalan ve diğ., 2006).

Planktothrix, dünyada birçok ılıman gölde aşırı artışlara neden olmuştur (Ernst ve diğ., 2001; Jacquet ve diğ., 2005; Feuillade, 1994; Kurmayer ve Juttner, 1999; Nürnberg ve Lazerte, 2003; Poulickova ve diğ., 2004). *Planktothrix rubescens* genellikle ötrofikasyonun artmasıyla doğru orantılı olarak hızlı bir gelişim göstermesine rağmen, farklı trofik seviyelerdeki göllerde de bulunabilir (Walsby ve diğ., 1998). *Planktothrix* diğer fototrof organizmalarla karşılaştırıldığında daha az sıcaklığa ve ışığa ihtiyaç duyar ve böylece metalimniyonda hayatta kalıp gelişebilir. Bu nedenle düşük ışık koşullarında ve/veya sonbahar ve kışın derin sirkülasyonda populasyonunu korur (Halstvedt ve diğ., 2007).

Mevcut çalışmada aşırı artış olan dönemlerde Küçükçekmece gölünden izole edilen 1 *P. agardhii* suşu ile birlikte aşırı artışta toplanan 4 tane doğal örnek kullanılmıştır. *P. rubescens* ise Sapanca gölünden izole edilen bir suş olup, çalışmada dört tane de doğal örnek bulunmaktadır.

Phylum : Cyanophyta
Ordo : Nostocales
Genus : Cylindrospermopsis
Species : *Cylindrospermopsis raciborskii*



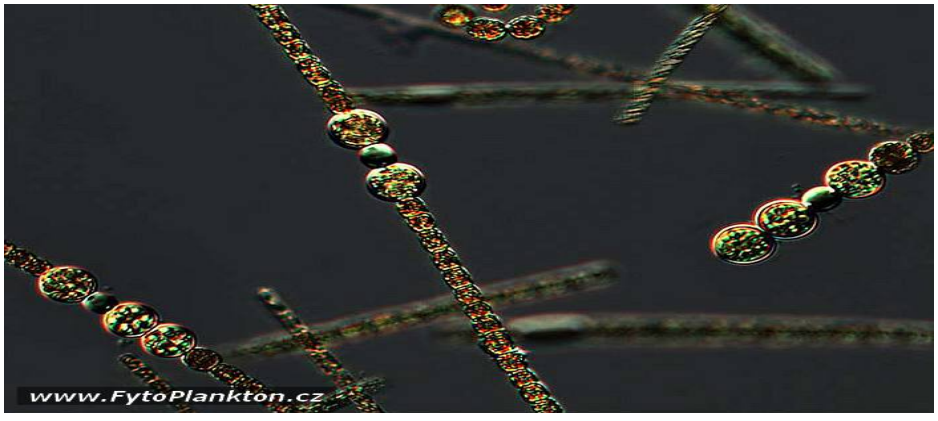
Şekil 2.13: *Cylindrospermopsis raciborskii*

Cylindrospermopsis raciborskii son yıllarda serin ve ılıman iklimlerden de izole edilmesine rağmen çoğunlukla tropikal ve subropikal bölgelerde bulunmaktadır (Komarek ve Anagnostidis, 1989; Baker ve Humpage, 1994).

C. raciborskii çok çeşitli çevresel koşullar altında gelişimi sağlayabildiği için aşırı artışlarını önceden tahmin etmek oldukça zordur. Ayrıca *C. raciborskii* diğer alglerin aşırı artışıyla ilişkilendirilen tat ve koku problemlerine neden olan geosmin ve 2-metil isoberneol (MIB) gibi uçucu organik bileşikler üretmediğinden tespiti daha zordur (Chiswell ve diğ., 1997).

Mevcut çalışmada kullanılan *C. raciborskii* suşu Manyas gölünden izole edilmiştir. *C. raciborskii* göl yüzeyini kaplayacak ölçüde yoğun bir artışa sebep olmamıştır. Ancak ortamdan izole edilerek kültüre alınmıştır.

Phylum : Cyanophyta
Ordo : Nostocales
Genus : Aphanizomenon
Species : *Aphanizomenon aphanizomenoides* (Forti) Hortobagyi&Kom



Şekil 2.14: *Aphanizomenon aphanizomenoides*

Aphanizomenon genusu *Anabaena'*ya benzer. Farkı hücrelerin uzun ve dar oluşudur. Heterosistleri ve silindirik, küresel akinetleri mevcuttur. *Aphanizomenon flos-aquae* aşırı artışlarda sık görülen türlerinden biridir.

Mevcut çalışmadaki 2 *Aphanizomenon aphanizomenoides* suşu aşırı artış olan dönemlerde İznik gölünden izole edilmiştir.

Phylum : Cyanophyta
Ordo : Nostocales
Genus : Anabaenopsis
Species : *Anabaenopsis elenkinii*



Şekil 2.15: *Anabaenopsis elenkiini*

Anabaenopsis elenkinii tropikal, subtropikal ve ılıman sularda yaygın bulunan bir türdür. Bu tür ile ilgili filogenetik çalışmalar çok azdır. Filamentli yapıda olan *Anabaenopsis elenkiini* 'de heterosist oluşumu görülmektedir (Komarek, 1992).

Mevcut çalışmada aşırı artış olan dönemlerde İznik gölünden izole edilen bir *Anabaenopsis elenkiini* suşu ile birlikte aşırı artışta toplanan bir tane doğal örnek kullanılmıştır.

2.8 ÇALIŞMA ALANLARININ TANIMI

2.8.1 İznik gölü

İznik gölü, 80 m'lik maksimum derinliği, 313 km^2'lik yüzölçümü ile Türkiye'nin 5. büyük, Marmara Bölgesi'nin en büyük gölüdür. Göle başlıca su girdisi dereler (başlıca Orhangazi Deresi, Narlıca Deresi, Kurudere) ve yeraltı sularından sağlanmaktadır. Uygun iklim ve toprak özelliklerine sahip olması nedeniyle başlıca zeytincilik, meyve ve sebzecilik gibi tarım uygulamaları yoğun olarak yapılmaktadır. Bu nedenle göl evsel ve endüstriyel atıklarla kirlenmektedir. Havzaya aşırı besin tuzu yüklemesi olduğundan, son 20 yıl içerisinde gölün trofik durumu oligo-trofik seviyeden mezotrofik düzeye dönüşüm göstermiştir (Akçaalan ve diğ., 2009).

İznik gölünde toksik mavi-yeşil alg aşırı artışları aralıklı olarak görülmektedir. Şimdiye kadar *Anabaena* sp., *Aphanizomenon aphanizomenoides*, *Anabaenopsis* sp., *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Planktothrix rubescens* ve *Nodularia spumigena*'nın yüksek sayılara ulaştığı görülmüştür (Akçaalan ve diğ., 2009).

2.8.2 Küçükçekmece gölü

Küçükçekmece gölü, İstanbul'un orta batı bölgesinde, yaklaşık 20m derinlik ve 15,22 km^2 yüzölçümüne sahip Marmara Denizi'ne dar bir kanal ile bağlandığından dolayı lagün özelliği gösteren bir göldür. Gölün su kalitesi, göle giriş yapan tatlı su kaynaklarının evsel ve endüstriyel atıklar ile yoğun bir şekilde kirletilmesi nedeniyle olumsuz yönde etkilenmektedir (Sever, 2008).

2.8.3 Taşkısı gölü

Taşkısı gölü, Marmara Bölgesi'nin doğusunda yaklaşık 4.5 m derinliğe ve 0.75 km^2 yüzey alanına sahip küçük ve sığ bir göldür. Gölün yakınlarında taş ocakları vardır. Gölün doğu kıyısındaki sebze işleme fabrikası atıklarını dinlendirme havuzunda beklettikten sonra hiçbir işleme tabii tutmaksızın göle vermektedir. Ayrıca, yakınlarda yer alan askeri birliğin atıkları da kanallarla göle ulaşmaktadır. Gölde zaman zaman cyanobacteria grubu alglerin aşırı arttığı ve aşırı çoğalma yapan türün *Microcystis aeruginosa* olduğu tespit edilmiştir (Albay ve diğ., 2003a).

2.8.4 Manyas gölü

Manyas gölü, yaklaşık 4 m maksimum derinlik ve 159 $km^{2'}$lik yüzey alanıyla Türkiye'nin batı bölgesinde bulunan büyük göllerden biridir. Manyas Gölü, ekolojik değeri nedeniyle dünyanın en önemli doğal rezervlerinden biridir. Göl göçmen su kuşlarının rotaları üzerinde bulunmaktadır. Sığ olması nedeniyle rüzgârın etkisiyle göl sürekli karışım halindedir (Albay ve Akçaalan, 2008). Bu nedenle askıda katı madde miktarı her zaman çok yüksek olduğundan göl suları daima bulanıktır. Göl A sınıfı diplomaya sahiptir. Göle gelen en büyük kirletici kaynağı milli park sınırları içinden geçerek göle ulaşan Sığırcı deresidir. Dere üzerinde yer alan çeşitli fabrikalardan ve tavuk çiftliklerinden gelen yoğun endüstriyel ve organik atıklar bu dere yoluyla göle ulaşarak gölün su kalitesinin bozulmasında önemli rol oynamaktadır. Ayrıca, göl çevresindeki küçük yerleşim yerlerinden ve tarım alanlarından da göle kirletici girişi olmaktadır. Gölde zaman zaman *Microcystis*'in aşırı çoğalma yaptığı görülmüştür (Çelik, 2006).

2.8.5 Sapanca gölü

Adapazarı ilinin içme suyu kaynağı olarak kullanılan Sapanca Gölü'nün yüzey alanı 46.8 km^2, maksimum derinliği 55 m dir. Gölün çevresinde yoğun yapılaşma mevcuttur. Ayrıca, bölgede 30'dan fazla alabalık çiftliği bulunmaktadır. Bu çiftliklerden gelen atıklar dereler yoluyla göle ulaşmaktadır. Gölde 1997 yılında ilk defa yoğun bir kırmızı renk oluşumu görülmüş ve yapılan incelemelerden sonra buna Cyanobacteria grubundan *Planktothrix rubescens'*in yol açtığı anlaşılmıştır. Daha sonraki yıllarda gölde fitoplankton kompozisyonu ve *P. rubescens'*in toksisitesi üzerinde çalışmalar yapılmıştır (Albay ve diğ., 2003).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 İzole Edilen Fitoplankterlerin Kültüre Alınması

Aşırı artış dönemlerinde İznik, Sapanca, Manyas, Taşkısı ve Küçükçekmece göllerinden plankton kepçesi yardımıyla alınan su örneklerinde fitoplankton kompozisyonunda baskın olan mavi-yeşil alg türleri tespit edilerek bu türler İ.Ü. Su Ürünleri Fakültesi İçsular Biyolojisi ABD Toksik Cyanobacteria Alg Kültürü Laboratuvarı'nda kültüre alındı.

Bu amaçla izole edilen suşlar (Tablo 3.1) için 100 ml $BG11_0$ ($NaNO_3$ bulunmayan) ve/veya BG11 (Tablo 3.2) kültür ortamı bulunan 250 ml'lik erlenler 121 ^oC de 20 dakika süre ile otoklavda steril hale getirildi (Watanabe ve diğ., 1996). Kültürlerin canlılıklarını sürdürmeleri için belirli aralıklarla yeni besiyerlerine ekimleri yapıldı. *Microcystis* ve *Planktothrix* suşları BG11 ortamına, *Cylindrospermopsis*, *Anabaenopsis*, *Aphanizomenon* ve *Nodularia* suşları ise $BG11_0$ kültür ortamına ekildi (Rippka ve diğ., 1979).

Ayrıca aşırı alg artışını olduğu dönemlerde toplanan alg yoğun su örnekleri liyofilize edilerek peletler daha sonra cyanotoksin analizleri yapılmak üzere 22 ^oC de saklandı.

Tablo 3.1: Kullanılan suşlar

	TÜR	GÖL	SUŞ
1	*Microcystis aeruginosa*	Küçükçekmece	Mic4
2	*Microcystis flos-aquae*	Küçükçekmece	Micsp1
3	*Microcystis wesenbergii*	Taşkısı	MicT5C
4	*Anabaenopsis elenkinii*	İznik	Ana01
5	*Aphanizomenon aphanizomenoides*	İznik	AphizC
6	*Aphanizomenon aphanizomenoides*	İznik	AphizE
7	*Cylindrospermopsis raciborskii*	Manyas	Cylin
8	*Nodularia spumigena*	İznik	Nodg3
9	*Nodularia spumigena*	İznik	Nodh2
10	*Planktothrix agardhii*	Sapanca	Pagard
11	*Planktothrix rubescens*	Sapanca	Prub

Tablo 3.2: BG 11 Sıvı Besiyeri

BG 11 Besi Ortamı	Miktar	*Eser Elementler	Miktar
$NaNO_3$	1500 mg	H_3BO_3	2.86 g
K_2HPO_4	40 mg	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1.81 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	75 mg	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.222 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	36 mg	$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0.39 g
Sitrik asit	6 mg	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.079 g
Ferrik amonyum sitrat	6 mg	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,049 g
EDTA	1 mg	Distile su	1000 ml
$NaCO_3$	20 mg		
Eser elementler*	1 ml		
Distile su	999 ml		

3.2 ÖRNEKLERDEN DNA İZOLASYONU

DNA ekstrasyounu XS buffer yöntemine göre yapıldı (Tillett ve Neilan, 2000b). Çalışmada kullanılan bütün solüsyonlar ve ekipmanlar steril edilerek Tablo 3.3'te verilen XS ortamı hazırlandı.

Tablo 3.3: XS Buffer Ortamı

XS BUFFER	Kullanılacak miktar
%1 Potasyum etil xanthogenate	100mg
800mM Amonyum asetat	2 mL
100 mM Tris-HCI (Ph 7.4)	1 mL
200 mM Etilen diamin tetra aset asit	1 mL
%1 Sodyum dodesil sülfat	1 mL
Distile Su	4 mL

Tablo 3.4: TE (TrisEDTA) Tampon Çözeltisi

1M Tris-HCI (Ph 8.0)	500µl
0.5M EDTA	100 µl
Distile su	49.4 mL

Ekstrasyonu için geç logaritmik fazdaki kültürlerden 2 ml alınarak 9000 devir/dk'da 15 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üstteki sıvı atılarak alg hücreleri pelet haline getirildi.

XS Buffer yöntemine göre; 1.5 ml eppendorf tüpte bulunan kültür peletlerinin üstüne 500 µl XS buffer eklendi (Tablo 3.3). Eppendorflar su banyosunda 65 ^{o}C'de 2 saat inkübe edildi. Her 30 dk'da bir örnekler vortekslenip tekrar su banyosuna kondu. Parçalanan hücreler daha sonra 10 dk buzda inkübe edildi ve proteinlerin giderimi için 4 ^{o}C'de 10 dk 12000 devir/dk santrifüj edildi. Üst kalan sıvı 1.5 ml'lik eppendorfa alındı. Bu işlem iki defa tekrarlanarak proteinler mümkün olduğunca uzaklaştırıldı. Üst sıvıdaki DNA'da kalan proteinlerin giderimi için eşit hacimde fenol/kloroform/izoamilalkol (25:24:1) eklenerek 4 ^{o}C'de 5 dk 12000 devir/dk santrifüj

edilerek organik ekstrasyon yapıldı. Üst sıvı yeni bir tüpe alınarak işlem tekrar edildi. Tüplere 1 hacim isoproponal ve 0.1 hacim 3M Sodyum Asetat eklenerek bir gece derin dondurucuda bekletildi.

Ertesi gün derin dondurucudaki örnekler 4 ^{o}C'de 30 dk 14000 devir/dk santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı ve tüpe 190 µl %70'lik etanol eklenerek 4 ^{o}C 'de 10 dk 14000 devir/dk santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı uzaklaştırıldı ve örnekler oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruyan örneklere 50 µl Tris-EDTA (TE) eklendi (Tablo 3.4).

3.3 DNA'NIN MİKTAR ve SAFLIĞININ ÖLÇÜMÜ

Elde edilen DNA'nın nanodrop spektrofotometrede 260–280 nm dalga boylarındaki absorbsiyon değerleri ölçüldü. Ölçülen değerlerin oranı (OD 260/280) ile DNA'nın saflığı değerlendirildi.

3.4 Agaroz Jel Elektroforezi

1 gr agaroz 100 ml Tris-Asetat-EDTA (TAE) (1X) solüsyonu (Tablo 3.5) içerisinde çözüldü (Tablo 3.6). Solüsyon ısıtılıp homojenize edildi. Hazırlanan jel soğutulup elektroforeze yerleştirildi. 2 µl DNA örnekleri 1 µl brom fenol mavisi içeren (6X) yükleme tamponu (Tablo 3.7) ile karıştırılarak %1 lik agaroz jele yüklendi. Elektroforez işlemi 80 V'de 20 dk olarak ayarlandı. Bu işlemin ardından jel etidyum bromürün (10 mg/ml) içine konularak 10 dk bekletildi. Daha sonra GEL-DOC Bio-RAD System with Quantity One 4.1R yazılım sistemi ile UV altında fotoğraflandı.

Tablo 3.5: TAE Solüsyonu (50X)

Tris baz	242 gr
Glasiyal asetik asit	57.1 ml
0.5M EDTA (pH 8)	100ml
Distile su	842.9 ml

Tablo 3.6: Agaroz jel

%1'lik agaroz jel	%2'lik agaroz jel	%3'lik agaroz jel
1 gr agaroz	2 gr agaroz	3 gr agaroz
100 ml 1X TAE	100 ml 1X TAE	100 ml 1X TAE

Tablo 3.7: Yükleme tamponu (6X)

Brom fenol mavisi	25gr
Gliserol	4gr
Distile su	10ml

3.5 16S RİBOZOMAL RNA GEN (16S RDNA) PCR

Cyanobacteria'ya özel 27F/809R primerleri (Tablo 3.8) kullanılarak yapılan 16S rDNA PCR ile DNA ekstrasyonu yapılan örneklerin tür tayinleri yapıldı. Ayrıca 16S rDNA PCR'da bütün örneklerin pozitif sonuç vermesi gerekmektedir. Negatif sonuçlar reaksiyonda bir inhibisyon olduğunu ya da cyanobacterial DNA'nın yetersiz olduğunu göstermektedir (Hawkins ve diğ., 2005).

Tüm PCR reaksiyonlarında diğer tüplerle aynı koşullarda hazırlanan ancak DNA içermeyen bir tüp negatif kontrol olarak hazırlandı. Bu negatif kontrol sayesinde kullanılan PCR bileşenlerinde DNA kontaminasyonu olup olmadığı belirlendi. 16S rDNA PCR'da pozitif kontrol olarak PCC 7806 *Microcystis aeruginosa* suşundan elde edilen DNA kullanıldı.

Tablo 3.8: Primerler

Primer	Primer Dizisi (5′ 3′)	Primer Boyu	Hedef lokus	Ref.
27 F	5′AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3′	20 bç	16S rRNA	Neilan ve diğ., 1997
809 R	5′GCTTCGGCACGGCTCGGGTCGATA3′	24 bç		
HEPF	5′TTTGGGGTTAACTTTTTTGGGCATAGTC3′	28 bç	*mcy*E/*nda*F aminotransferaz domeyn	Jungblut ve Neilan, 2006
HEPR	5′AATTCTTGAGGCTGTAAATCGGGTTT3′	26 bç		
DKF	5′GTGCCGGTNCC(AG)TG(GATC)G(TC)(TC)TC3′	26 bç	PKS	Moffitt ve Neilan, 2001a
DKR	5GCGATGGA(TC)CCNCA(AG)CA(AG)(CA)G3′	24 bç		
MTF2	5′GCNGG(CT)GG(CT)GC(GATC)TA(CT)GTNCC3′	26 bç	NRPS	Neilan ve diğ., 1999
MTR2	5′CC(GATC)CG(AGT)AT(TC)TTNAC(TC)TG3′	24 bç		
rpoC1F	5′CCTCAGCGAAGATCAATGGT3′	20 bç	RNA polimeraz gen	Rasmussen ve diğ., 2007
rpoC1R	5′CCGTTTTTGCCCCTTACTTT3′	20 bç		
QmetF	5′TTATTCCAAGTTGCTCCCCA3′	20 bç	*mcy*A	Saker ve diğ., 2005
QmetR	5′GGAAATACTGCACAACCGAG3′	20 bç		

Tablo 3.9: 16S rDNA PCR İçeriği

	Kullanılacak miktar
10X PCR Buffer	2 µl
$MgCl_2$ (25 mM)	1 µl
dNTP (8 mM)	2 µl
Taq DNA polimeraz (1 U)	0.2 µl
Primer 27 F (10 pM)	1 µl
Primer 809 R (10 pM)	1 µl
DNA	1 µl
Distile Su	11.8 µl
TOPLAM	20 µl

Tablo 3.10: 16S rDNA PCR Koşulları

	Sıcaklık	Süre
Ön Denatürasyon	94 ^{o}C	5 dk
Amplifikasyon (30 döngü)		
Denatürasyon	94 ^{o}C	20 sn
Primer Bağlanması	55 ^{o}C	30 sn
Sentez	72 ^{o}C	1 dk
Son Sentez	72 ^{o}C	7 dk

0.2 µl'lik PCR tüplerde 20 µl'lik karışım içinde gerçekleşen PCR reaksiyonunun sonuçlarını kontrol etmek için, 2 µl DNA marker (Gene Ruler^{TM}, 100–10000 bç, DNA ladder), amplifiye edilen PCR ürünlerinden 2 µl, pozitif kontrol ve negatif kontrol parafilm üzerinde 1 µl brom fenol mavisi içeren (6X) yükleme tamponu ile karıştırılarak %1'lik agaroz jele yüklendi. Jel 1X TAE buffer içeren elektroforeze yerleştirildi. Elektroforez cihazı 85 V'de 20 dk olarak ayarlandı. Bu işlemin ardından jel etidyum bromürün içine konularak 10 dk bekletildi ve GEL-DOC Bio-RAD System ile fotoğraflandı.

3.6 DİZİLEME

DNA dizi analizi ya da "sequencing" DNA'nın nükleotid dizisinin saptanması anlamına gelmektedir. Bu işlem bazı aşamalardan oluşmaktadır.

Jel elektroforezi ile doğru bölgenin amplifiye olduğu görüldükten sonra PCR ürünleri saflaştırıldı. Dizileme analizleri için Big Dye v3.1 (Applied Biosytems Inc., Foster City, USA) protokolü kullanıldı. Örnekler Sequencing Unit (School of Biochemistry, UNSW) tarafından 373 model sequencer (Applied Biosystems) kullanılarak bilgisayar ortamına aktarıldı.

3.7 HEP PCR

Primerler HEPF/HEPR (Tablo 3.8) nodularin ve microcystinin PKS/NRPS genlerinde bulunan aminotransferaz domeynini amplifiye etmek için dizayn edildi. HEP PCR ile test edilen bütün hepatotoksik genusların (*Microcystis, Anabaena, Planktothrix, Nostoc* ve *Nodulari*a) AMT domeyninden 472 bç uzunluğundaki PCR ürününü amplifiye etmek mümkün oldu. Böylece hem kültür örneklerinin hemde sahada toplanan örneklerin hepatotoksik olup olmadıkları tek bir PCR ile belirlendi (Jungblut ve Neilan, 2006). HEP PCR içeriği ve koşulları Tablo 3.13 ve 3.14'te gösterildi.

Tablo 3.11: HEP PCR İçeriği

	Kullanılacak miktar
10X PCR Buffer	2 µl
$MgCl_2$ (25 mM)	1 µl
dNTP (8 mM)	2 µl
Taq DNA polimeraz (1 U)	0.2 µl
Primer HEP F (25 pM)	1 µl
Primer HEP R (25 pM)	1 µl
DNA	2 µl
Distile Su	10.8 µl
TOPLAM	20 µl

Tablo 3.12: HEP PCR Koşulları

	Sıcaklık	Süre
Ön Denatürasyon	92 ^oC	2 dk
Amplifikasyon (35 döngü)		
Denatürasyon	92 ^oC	20 sn
Primer Bağlanması	52 ^oC	30 sn
Sentez	72 ^oC	1 dk
Son Sentez	72 ^oC	5 dk

HEP PCR sonuçları %2'lik agaroz jelde yürütülüp, dizileme analizleri yapılarak sonuçlar kontrol edildi.

3.8 CYLİNDROSPERMOPSİN İÇİN PKS VE NRPS PCR

Cylindrospermopsin diğer hepatotoksinler gibi NRPS ve PKS enzim kompleksleri tarafından sentezlenmektedir. Cylindrospermopsin üretiminden sorumlu genler olan *aoa*A, *aoa*B ve aoaC genleri sırasıyla amidinotransferaz, hibrid NRPS/PKS ve PKS'i kodlayan genlerdir. Ne bu genler tarafından üretilen ürünlerin biyokimyasal yapıları tam olarak tanımlanmıştır ne de ürünlerin cylindrospermopsin biyosentezine dâhil oldukları kanıtlanabilmiştir. Bununla birlikte, varsayılan non-ribozomal peptid sentetaz ve poliketid sentaz bölgelerinin amplifiye edilmesi ile toksin üretiminden sorumlu genlerin varlığı ya da yokluğu belirlenebilmektedir. Bu nedenle Neilan ve diğ. (1999) bu bölgelerin çoğaltılması için dejenere primerler dizayn etmişlerdir. Varsayılan peptid sentez bölgelerinin amplifikasyonu için MTF2/MTR2, varsayılan poliked sentez bölgelerinin amplifikasyonu için de DKF/DKR primer setleri modüler enzim kompleksinin korunmuş fonksiyonal motiflerinden dizayn edildi (Tablo 3.8). PKS ve NRPS PCR içeriği ve koşulları Tablo 3.15 ve 3.16'da gösterildi.

Tablo 3.13: PKS ve NRPS PCR İçeriği

PKS/ NRPS	Kullanılacak miktar
10X PCR Buffer	2 µl
$MgCl_2$ (25 mM)	1 µl
dNTP (8 mM)	2 µl
Taq DNA polimeraz (1 U)	0.2 µl
Primer DKF/MTF2	1 µl
Primer DKR/MTR2	1 µl
DNA	1 µl
Distile Su	10.8 µl
TOPLAM	20 µl

Tablo 3.14: PKS ve NRPS PCR Koşulları

	Sıcaklık	Süre
Ön Denatürasyon	92 °C	2 dk
Amplifikasyon (35 döngü)		
Denatürasyon	92 °C	20 sn
Primer Bağlanması	52 °C	30 sn
Sentez	72 °C	1 dk
Son Sentez	72 °C	5 dk

PKS ve NRPS PCR sonuçları %2'lik agaroz jelde yürütülüp, dizileme analizleri yapılarak sonuçlar kontrol edildi.

3.9 SXT PCR

SXT PCR için stxAF/R primerleri *sxt*A geninin amplifiye edilmesi hedeflendi. ~150 bç uzunluğundaki hedef bölgenin varlığına bakılarak örneklerin toksik olup olmadıkları belirlenmeye çalışıldı. SXT PCR içeriği ve koşulları Tablo 3.17 ve 3.18'de gösterildi.

Tablo 3.15: SXT PCR İçeriği

	Kullanılacak miktar
10X PCR Buffer	2 µl
$MgCl_2$ (25 mM)	1 µl
dNTP (8 mM)	2 µl
Taq DNA polimeraz (1 U)	0.2 µl
Primer sxtAF (10 pM)	1 µl
Primer stxAR (10 pM)	1 µl
DNA	2 µl
Distile Su	10.8 µl
TOPLAM	20 µl

Tablo 3.16: SXT PCR Koşulları

	Sıcaklık	Süre
Ön Denatürasyon	94 ^{o}C	4 dk
Amplifikasyon (40 döngü)		
Denatürasyon	95 ^{o}C	10 sn
Primer Bağlanması	60 ^{o}C	20 sn
Sentez	72 ^{o}C	25 sn
Son Sentez	72 ^{o}C	5 dk

SXT PCR sonuçları %3'lik agaroz jelde yürütülüp, dizileme analizleri yapılarak sonuçlar kontrol edildi.

3.10 AZOT VE FOSFORUN M. AERUGINOSA'NIN *MİCROCYSTİN ÜRETİMİNE ETKİSİ*

Microcystis tarafından hepatotoksin üretiminin birçok çevresel etkenden etkilendiği düşünülmektedir. Bununla birlikte yapılan çalışmaların bir standarta bağlanamaması ve verilerin aynı spesifik büyüme kontrolleri ile değerlendirilememesi nedeniyle, hepatotoksin regülasyonu hala devam eden bir konudur.

BG11 sıvı besiyerinde bulunan *Microcystis aeruginosa* suşu hücrelerinde bulunan azot ve fosfatı kullanmaları için N ve P bulunmayan BG11 ortamına ekildi (Vezie ve diğ., 2002). Bu amaçla BG11 ortamında bulunan N ve P kaynakları $NaNO_3$ ve K_2HPO_4 'ın oranlarında değişiklikler yapıldı. N ve P konsantrasyonları su kaynağının ve laboratuvar ortamının yüksek ve düşük değerleri göz önünde bulundurularak seçildi.

5 günlük starvasyon periyodu sonunda kültürlerde bir iyileşme olmadığı gözlendi. 5 günün sonunda fitoplankter kültüründen 10 mL alınarak 250 ml'lik erlenlerde farklı N:P oranları içeren 100 ml BG11 ortamına ekildi (Tablo 3.19). Deney 3 tekrarlı olarak hazırlandı.

Kültür ekiminin yapıldığı 1. günden itibaren kültürler hergün elle çalkalandı. Sıcaklık ve ışık doğal ortam şartlarına uygun olması amacıyla değiştirilmedi.

Kültürün büyümesi hücre sayımları ile kontrol edilip gelişimleri izlendi. Bu amaçla 0., 4., 7., 9., 12., 14., 17. ve 21. günler üç tekrarlı örneklerden rastgele seçilerek Neubaer sayım kamarası kullanılarak mikroskopta sayımları yapıldı.

Tablo 3.17: Kullanılan N:P Oranları

Kültür numarası	N (mg/l)	P (mg/l)	N:P oranı
1-2-3	0.8	0.2	4
4-5-6	3.2	0.2	16
7-8-9	0.8	1.6	1:2
10-11-12	3.2	1.6	2
13-14-15	Standart BG 11		

3.10.1 Protein Fosfataz İnhibisyon Asseyi

PP2A asseyinin temeli fosfataz enzim ve microcystin gibi inhibitörlerdeki fosforlaşmış proteinlerden salınan fosfatazların ölçümüne dayanmaktadır (Wong ve diğ., 1999).

Bu çalışmada fitoplankton kültürleri üç tekrarlı hazırlandığı için PP2A asseyi için tekrarlı örneklerden 1 ml alınarak aynı tüpe konularak santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı uzaklaştırılarak peletler tek tüpe konuldu. Tüplere 500 µl %70'lik metanol eklendi. Hücreleri parçalayabilmek için 0.1 mm zirkonya/silika karışımı bead'lar (Biospec) kullanıldı. Bu amaçla bead eklenen 1.5 ml'lik örnek tüpleri 30 sn vorteks, 30 sn buz uygulaması 5-6 kez tekrarlanarak hücrelerin parçalanması sağlandı. Üstte kalan sıvı başka temiz bir tüpe aktarılarak santrifügal evoparasyon (speedvac) ile kurutuldu. 500 µl %20'lik metanol ve 200 µl kloroform eklendi. Tüpler 4 ^{o}C'de 10 dk 12000 devir/dk sanrtifüj edildi. Üstte kalan sıvı alınarak başka tüpe aktarıldı ve derin dondurucuda analizler yapılıncaya kadar saklandı.

PP2A için gereken çözeltiler Tablo 3.20 ve Tablo 3.21'de verildi.

Tablo 3.18: X50 Enzim Diluent Ortamı

X50 Enzim Diluent	1.5ml için
0.1 M Tris HCL pH 7.0	0.25 ml
40 mM Dithiotheitol (DTT)	0.025 ml
10 mM MnCI2	0.1 ml
10 mg/ml Bovine Serum Albinum (BSA)	0.05
Distile su	0.75
PP2A	4 µl

Tablo 3.19: Reaksiyon İçeriği

Reaksiyon Karışımı	2.5ml için
0.4 M Tris HCL pH 8.1	0.5 ml
10 mM MnCI2	0.1 ml
0.3 M MgCI2	0.65 ml
10 mg/ml Bovine Serum Albinum (BSA)	0.05 ml
Distile su	0.75 ml
	Sonra eklenen
50 mM fosfataz substrat (P-NPP)	2 ml
40 mM Dithiotheitol (DTT)	0.5 ml

Analizler için örneklerden PP2A deneyi için 1/50 seyreltme yapılarak örnek sayısı 12'ye çıkarıldı. Örneklerin seyreltmesi için %20 methanol kullanıldı.

PP2A için levhadaki kuyucuklara sırasıyla 10 µl örnek konuldu. Örnekler iki tekrarlı olarak hazırlandı. Örneklerin üzerine 10 µl Enzim Diluent eklendi. Levha parafilm ile kapatılıp 37 ^{o}C'de 5 dk inkübe edildi. Parafilm açılarak örneklere 10 µl reaksiyon karışımı eklendi. 37 ^{o}C'de 80 dk inkübe edildi. Levha plate reader'da (BioRad 3550 model) 405 nm'de absorbsiyon değerleri ölçüldü.

3.10.2 RNA Ekstrasyonu

RNA ekstrasyonu için kullanılan bütün pipetler, pipet uçları ve tüpler RNA-free olmalıdır. Bu amaçla kullanılacak bütün malzemeler iki defa otoklavlandı. Pipetler sadece RNA ile ilgili çalışmalarda kullanıldı. Kimyasalların hazırlanmasında kullanılan saf su DEPC (invitrogen) distile su olup DNAse ve RNAse arındırıldı. RNA

ekstrasyonu alanı % 95 etanol ile temizlendi. RNA ekstrasyonu Trizol kullanılarak yapıldı.

30 ml kültür falcon tüplere konularak 10 dk santrifüj edilerek pelet elde edildi. Üst sıvı atılarak peletler RNA-free tüplere kondu. Tüpler 2 dk sıvı azotun içinde ve takiben 2 dk 37 ^{o}C'lik su banyosunda tutuldu. Bu işlem 3 defa tekrarlandı. Su banyosundan çıkarılan tüplere 1 ml Trizol (Sigma) eklenerek ~40 sn pipetaj yapıldı. Tüplere 200 µl kloroform eklenerek 5 dk oda sıcaklığında bırakıldı. Tüpler 20 dk 12000 devir/dk'da 4 ^{o}C'de santrifüj edildi. Üst tabaka yeni tüpe alınarak 500 µl soğuk isoproponal eklendi. Örnekler bütün gece –20 ^{o}C'de derin dondurucuda bırakıldı.

Derin dondurucudan çıkarılan örnekler 12000 devir/dk da 30 dk 4 ^{o}C'de santrifüj edildi. Üst sıvı atılarak tüplere 1 ml %70'lik etanol eklendi. 12000 devir/dk da 15 dk 4 ^{o}C'de santrifüj edilen örneklerin üstte kalan sıvı uzaklaştırıldı. Örnekler 10 dk santrifüj edildikten sonra oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruyan örneklere 50 µl DEPC eklenerek çözdürüldü. RNA'nın çözülmesi zor olduğu için örnekler 5 dk etüvde tutuldu. Örnekler yaklaşık 2 sa. buzlukta bekletildi ve nanodropta ölçüm yapıldı.

Örneklere 3 µl DNAse (Turbo, 2U/µl) ve 10 µl 10x buffer eklendi. DEPC ile 100 µl 'ye tamamlandı. 37 ^{o}C'de bütün gece su banyosunda bekletildi.

Ertesi gün örneklere 130 µl Trizol eklendi ve 5 dk oda sıcaklığında bırakıldı. Daha sonra 40 µl kloroform eklenerek hızlıca çalkalandı ve 15 dk oda sıcaklığında bırakıldı. 12000 devir/dk da 15 dk 4 ^{o}C'de santrifüj edilen örneklerin üst sıvısı alınarak yeni tüplere aktarıldı ve 105 µl isoproponal eklendi. – 20 ^{o}C'de 5 saat buzlukta bekletildi.

Örnekler 105 µl % 75'lik etanol ile 2 defa yıkandı. 12000 devir/dk da 10 dk 4 ^{o}C'de santrifüj edilen örneklerin üst sıvıları atıldı ve pelet speed-vac ile kurutuldu. 40 µl DEPC ile çözdürülen peletten 10 µl alınarak nanodrop ve 16S rDNA PCR için ayrı tüpe kondu. Böylece kontaminasyon engellenmeye çalışıldı.

Örneklerdeki RNA miktarı nanodrop ile ölçüldü. Herhangi bir DNA kontaminasyonunun varlığı 16 rDNA PCR ile kontrol edildi.

3.10.3 cDNA Sentezi (Ters Transkriptaz PCR)

cDNA, bir mRNA molekülünü bütünleyen ve ondan zıt transkriptaz etkisi ile sentezlenen tek halatlı DNA molekülüdür (Murray ve diğ., 2004). PCR'da kalıp olarak DNA kullanıldığı için, RNA önce cDNA'ya çevrilir. Bu amaçla özgün primerler ve 'revers transkriptaz' enzimi kullanılarak total RNA'dan cDNA elde edilir (Savlı ve Hatırnaz, 2004).

cDNA sentezi için toplamda 16 örnek hazırlandı. 15 örnek hazırlanan düzenekteki örnekler olmakla beraber son örnek normal BG11 ortamında hiçbir değişiklik ya da starvasyon dönemine maruz kalmamış örnek olarak seçildi. Örnekler 3 tekrarlı olarak hazırlandığı için örneklerden 10 µl alınarak aynı tüpün içinde karıştırıldı.

30 µl bulunan her örneğin nanodropta RNA miktarlarına bakıldı. cDNA sentezi için PCR tüplerinde eşit miktarda (100 ng/µl) kalıp bulunması ihtiyacı nedeni ile tüplere eşit miktarda RNA eklendi (Tablo 3.22 ve 3.23).

Tablo 3.20: Ters Transkriptaz PCR İçeriği

	Kullanılacak miktar
Master mix (Marligen)	4 µl
Reverse transkriptaz enzim	1 µl
DNA	100 ng
TOPLAM	20 µl

Tablo 3.21: Ters Transkriptaz PCR Koşulları

22 ^{o}C	42 ^{o}C	85 ^{o}C	20 ^{o}C
5 dk	45 dk	5 dk	∞
1 döngü	2 döngü	1 döngü	

Real-time PCR için kullanılacak cDNA'nın bütün tüplerde aynı miktarda bulunması gerekmektedir (1 μg). Bu nedenle ters transkriptaz PCR ürünlerinin miktarları real-time PCR'dan önce nanodropta ölçüldü.

3.10.4 Real-time PCR

Real-time PCR'da kalıp cDNA, SYBR Green qPCR SuperMix (İnvitrogen), primerler ve ROX Reference Dye (İnvitrogen) kullanıldı.

Rox Reference Dye floresan reporter sinyalini normalize etmek için kullanıldı.

Bu çalışmada real-time PCR reaksiyonu için örnekler 3 tekrarlı olarak hazırlandı.

Karşılaştırmalı ölçüm için rpoC geni (DNA-dependent RNA polimeraz) 'housekeeping gene' olarak kullanıldı. rpoC geni fikobiliproteinler arasındaki ilişkiye bağlı olarak filogenetik çalışmalarda kullanılmıştır. rpoC 16S rDNA gibi korunmuş bölgelerden oluşmaktadır, bu nedenle 'housekeeping gene' uygun bir seçimdir. rpoC gen anlatımı için rpoC1F/ rpoC1R primerleri kullanıldı (Tablo 3.8).

Microcystin gen anlatımını belirlemek için *mcy*A genini hedef alan QmetF/QmetR primerleri kullanıldı (Tablo 3.8).

Standartlar için pozitif kontrol olarak kullanılan *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 suşundan elde edilen DNA'ya real-time PCR'da kullanılan primerlerle aynı koşullarla normal PCR uygulaması yapıldı. PCR ürünleri %3'lük agaroz jelde yürütüldükten sonra ürünler 1.5 ml'lik eppendorf tüplere aktarıldı. Tüplere 2 hacim buz gibi % 100'lük ethanol eklendi ve –20 ^{o}C'de bütün gece bırakıldı. Ertesi gün iki defa %100'lük ethanol ile yıkanan örnekler 4 ^{o}C'de santrifüj edildi. Üst sıvı atıldıktan sonra pelet kurutuldu ve DEPC ile orijinal hacminde çözdürüldü. Nanodropta DNA miktarına bakıldı ve 1:10-1:10^{-7} olarak bir seri seyreltme yapılarak standartlar hazırlandı. Seri standartlardan 3 tekrarlı olarak real-time PCR yapıldı.

Tablo 3.22: Real-time PCR İçeriği

	Kullanılacak miktar
SYBR Green	12.5 µl
reference dye	0.5 µl
Primer rpoC1F (10 pM)	2 µl
Primer rpoC1R (10 pM)	0.2 µl
cDNA	1 µg
DEPC	
TOPLAM	25 µl

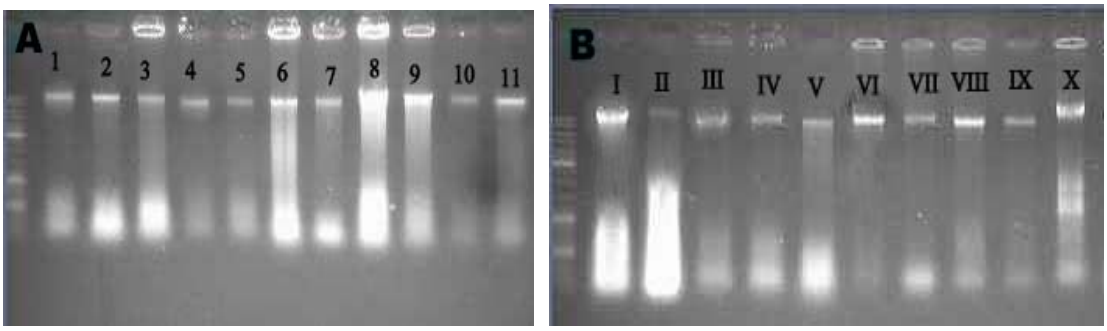
Tablo 3.23: Real-time PCR Koşulları

60 °C	95 °C	95 °C	61 °C	72 °C	20 °C
5 dk	10 dk	15 sn	30 sn	7 dk	Hold
		40 döngü			

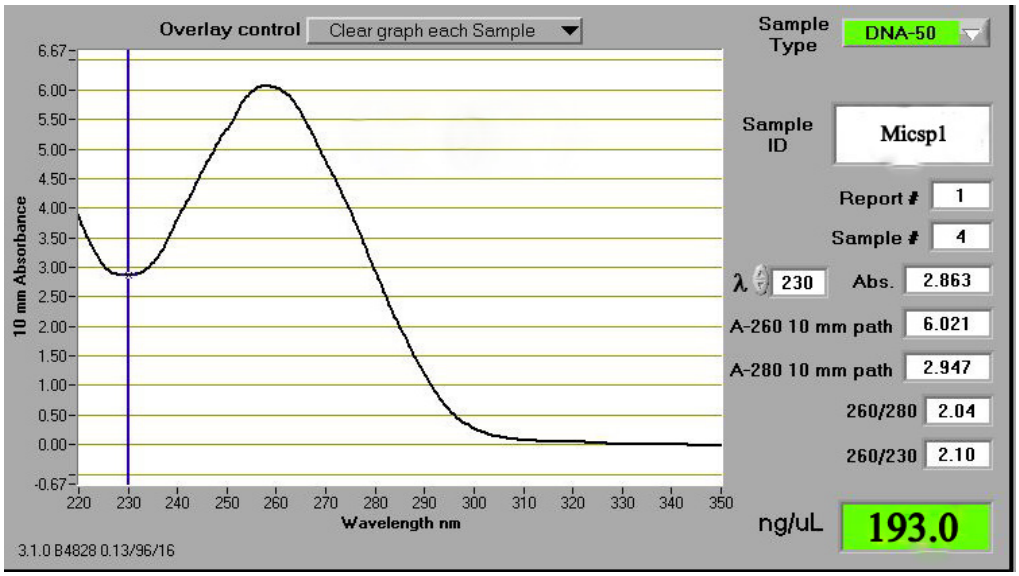
4. BULGULAR

4.1 DNA İZOLASYONU

Kültüre alınan suşlardan ve doğal örneklerden XS buffer yöntemine göre DNA izolasyonu yapıldı. DNA'nın saflığını ve yeterliliğini ölçmek için örnekler agoraz jelde yürütüldü (Şekil 4.1) ve nanodropta DNA miktarları incelendi. (Şekil 4.2 ve Tablo 4.1).



Şekil 4.1: DNA ekstrasyonu sonrası DNA'nın agaroz jelde görüntüsü. A kültür örneklerinden elde edilen DNA'lar, B doğal örneklerden elde edilen DNA'lar



Şekil 4.2: Micsp1 suşuna ait DNA konsantrasyon değerleri

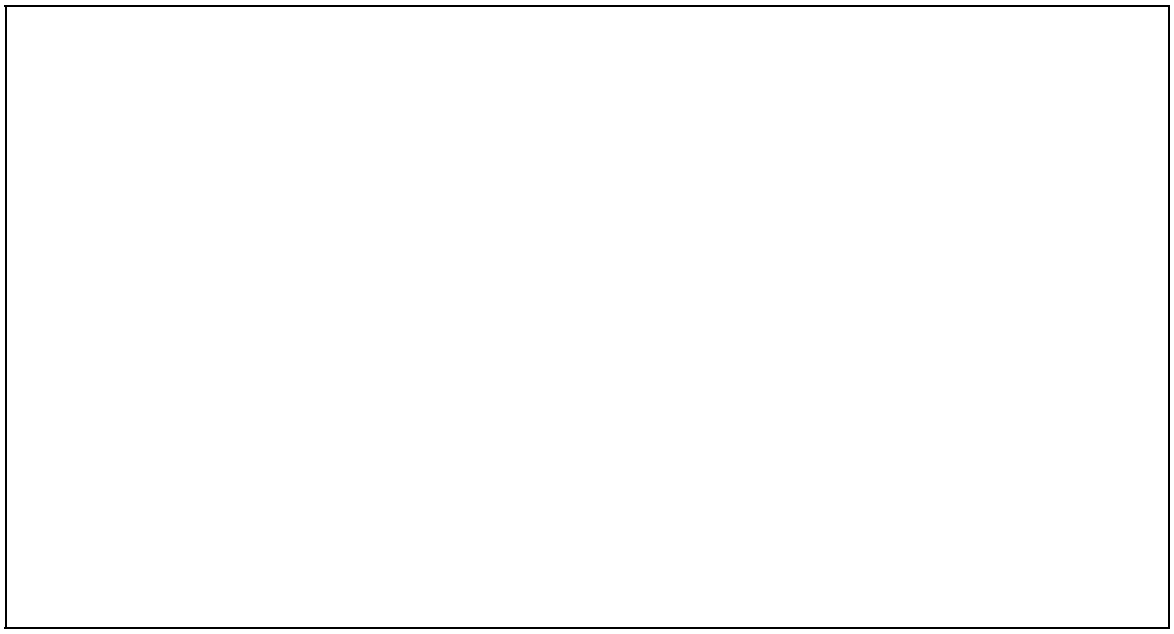
Tablo 4.1: DNA ekstrasyon sonucu elde edilen DNA konsantrasyonları

Örnek	Suş	ng/ul	Örnek	Tür	ng/ul
1	Mic4	74.46	I	*Planktothrix agardhii*	106.89
2	Micsp1	193.0	II	*Planktothrix agardhii*	362.75
3	MicT5C	197.67	III	*Planktothrix agardhii*	106.89
4	Ana01	46.56	IV	*Microcystis aeruginosa*	175.41
5	AphizC	49.68	V	*Planktothrix rubescens*	104.58
6	AphizE	83.53	VI	*Planktothrix rubescens*	374.35
7	Cylin	61.58	VII	*Microcystis aeruginosa*	320.87
8	Nodg3	73.91	VIII	*Planktothrix rubescens*	150.71
9	Nodh2	67.43	IX	*Anabaenopsis elenkinii*	172.92
10	Pagard	70.23	X	*Planktothrix rubescens*	395.52
11	Prub	59.88			

XS buffer yöntemi ile DNA ekstrasyonu yapılan örneklerden liyofilize edilerek saklanmış olan doğal örneklerden kültür örneklerine göre daha temiz ve miktar olarak daha fazla DNA elde edildiği görüldü. 1:10 TE tamponu içinde çözülen DNA'nın örneklerin birçoğunda 260 nm dalga boyunda pik verdiği görüldü. Ayrıca örneklerdeki OD 260/280 oranları 1.7- 2.4 arasında olduğu için herhangi bir protein kontaminasyonu olmadığı düşünüldü.

4.2 16S RİBOZOMAL RNA GEN (16S rDNA) PCR

DNA ekstrasyonunda elde edilen DNA'lar ile ilk olarak 16S rDNA PCR yapıldı. Cyanobacteria specific 27F/809R primerlerle yapılan PCR ile örnekler tür seviyesinde tayin edildi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: 16S rDNA PCR sonuçlarına ait agaroz jel elektroforezi görüntüleri, A kültür örnekleri, B doğal örnekler (+) Pozitif kontrol *M. aeruginosa*, (-) negatif kontrol

16S rDNA PCR'da pozitif kontrol olarak *M. aeuriginosa* PCC7806 kullanılırken negatif kontrolde DNA yerine su eklendi. Sonuçlara göre PCR'da bir inhibisyon olmadığı ve bütün DNA örneklerinin düzgün çalıştığı görüldü. ~782 bç olan hedef lokus bütün örneklerde elde edildi. PCR ürünleri daha sonra dizileme analizi yapılmak üzere hazırlanıp Sequencing Unit (School of Biochemistry, UNSW) tarafından 373 model sequencer (Applied Biosystems) kullanılarak bilgisayar ortamına aktarıldı.

Cyanobacteria spesifik 27F/809R primerleri ile yapılan 16S DNA PCR ile örneklerin tür tayinleri yapıldı.

Örneklerin tür tayinleri National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) sitesinde nükleotid dizileri aratılarak yapıldı (Tablo 4.2). Arama yapılan dizilerde benzerlik oranı %97–100 arasındadır.

16S rDNA PCR sonucunda doğal örneklerde 4 *P. rubescens,* 3 *P. agardhii,* 2 *M. aeruginosa* ve 1 *A. elenkinii* olduğu tespit edildi.

Kültür örneklerinde ise 1 *M. aeruginosa*, 1 *M. flos-aquae*, 1 *A. elenkinii*, 2 *A. aphanizomenoides*, 1 *C. raciborskii*, 2 *N. spumigena*, 1 *P. agardhii* ve 1 *P. rubescens* olduğu belirlendi.

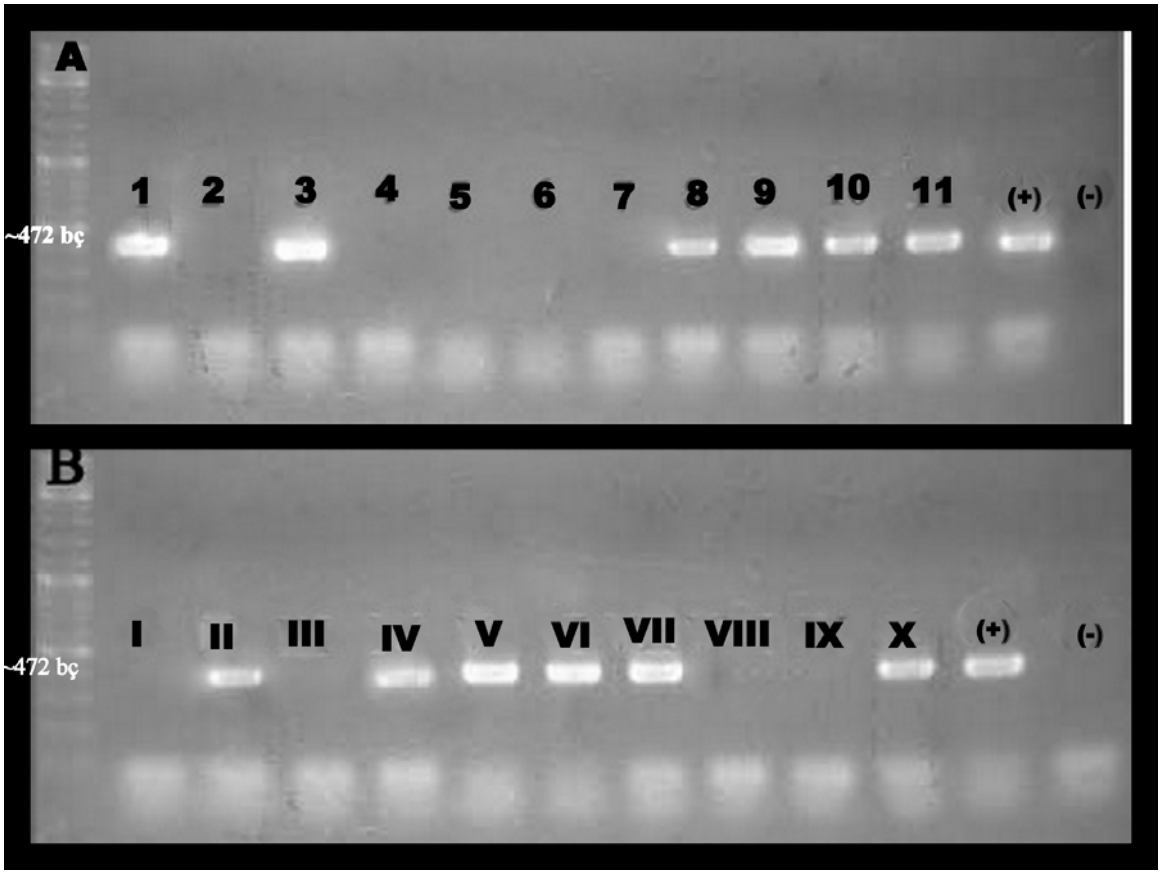
Tür tayini için yapılan mikroskobik çalışmayla 16S rDNA PCR sonuçlarının aynı olduğu görüldü.

Tablo 4.2: 16S rDNA PCR sonrası dizileme analizlerinin NCBI'daki kayıt numaraları

Örnek	Suş		Accession number		Örnek	Tür	Accession number
1	Mic4	*M. aeruginosa*	AF139318.1		I	*P. agardhii*	AB045941.1
2	Micsp1	*M. flos aquae*	AF139327.1		II	*P. agardhii*	GQ351571.1
3	MicT5C	*M. wesenbergii*	AB012334.1		III	*P. agardhii*	AB045941.1
4	Ana01	*A. elenkinii*	AM773309.1		IV	*M. aeruginosa*	AM778951.1
5	AphizC	*A. aphanizomenoides*	FM161350.1		V	*P. rubescens*	AB045947.1
6	AphizE	*A. aphanizomenoides*	FM161350.1		VI	*P. rubescens*	AB045916.1
7	Cylin	*C .raciborskii*	AB115466.1		VII	*M. aeruginosa*	AF139315.1
8	Nodg3	*N. spumigena*	AF268004.1		VIII	*P. rubescens*	AB045944.1
9	Nodh2	*N. spumigena*	AF268004.1		IX	*A. elenkinii*	AM773308.1
10	Pagard	*P. agardhii*	GQ351571.1		X	*P. rubescens*	GQ351565.1
11	Prub	*P. rubescens*	AB045944.1				

4.3 HEP PCR

Microcystin ve nodularin sentezindeki fonksiyonu nedeniyle hedef dizi olarak seçilen aminotransferaz (AMT) domeyni mcy*E* ve *ndaF* modüllerinde bulunmaktadır. HEPF/R primerleri kullanılarak yapılan HEP PCR ile test edilen kültür ve doğal örneklerdeki hepatotoksik türlerde ~472 bç AMT domeyninin amplifiye edilmesi hedeflendi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: HEP PCR sonuçlarına ait agaroz jel elektroforezi görüntüleri. A kültür örnekleri, B doğal örnekler (+) Pozitif kontrol *M. aeruginosa*, (-) negatif kontrol

HEP PCR'da pozitif kontrol olarak *M. aeuriginosa* PCC7806 kullanılırken negatif kontrolde DNA yerine su eklendi. Sonuçlara göre PCR'da bir inhibisyon olmadığı ve bütün DNA örneklerinin düzgün çalıştığı görüldü. Hedef bölge 21 örnekten 12'sinde elde edildi.

Yaklaşık 472 bç olan hedef bölge Micsp1, Ana01, AphizC, AphizE, Cylin suşlarından ve 2 *P. agardhii,* 1 *P. rubescens* ve *A. elenkiini* doğal örneklerinden elde edilemedi. PCR'da bir inhibisyon olmadığı görüldüğü için amplifiye olmayan örneklerin microcystin yada nodularin üretmediği varsayıldı.

Hedef bölge Mic4, MicT5C, P.agard, Prub, Nodh2, Nodg3 suşlarından ve 2 *M. aeruginosa,* 1 *P. agardhii* ve 3 *P.rubescens* örneklerinden elde edildi.

PCR ürünleri daha sonra dizileme analizi yapılmak üzere hazırlanıp Sequencing Unit (School of Biochemistry, UNSW) tarafından 373 model sequencer (Applied Biosystems) kullanılarak bilgisayar ortamına aktarıldı.

Dizi analizi sonuçları National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) sitesinde nükleotid dizileri aratılarak yapıldı (Tablo 4.3). Arama yapılan dizilerde benzerlik oranı %97–100 arasındadır.

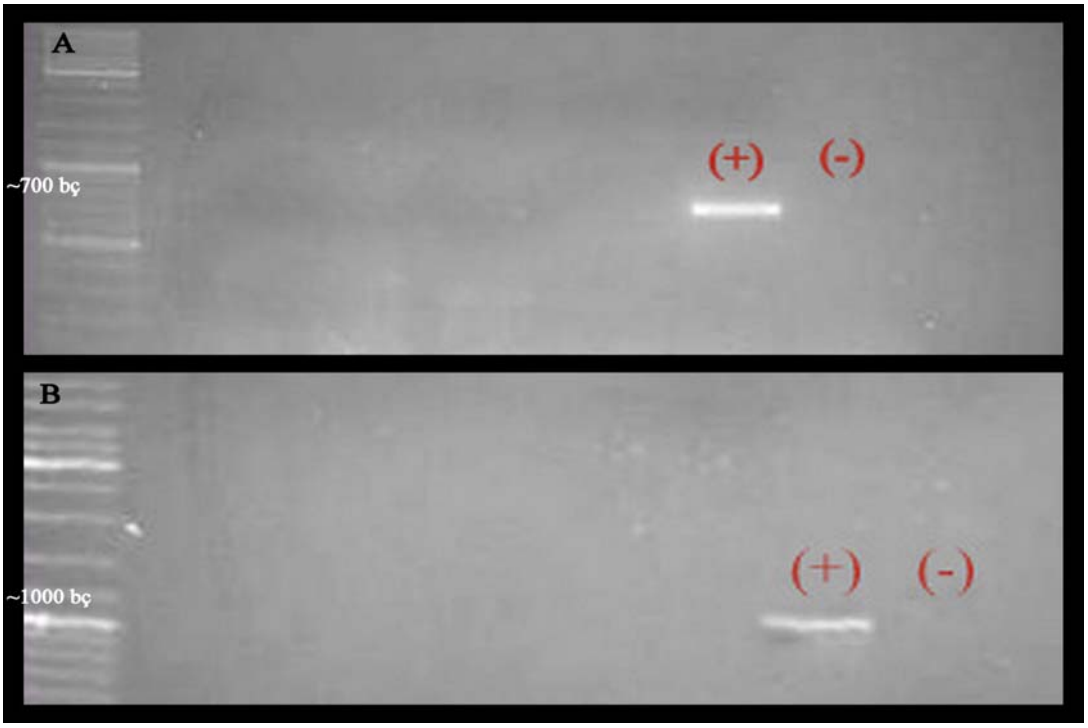
Arama yapılan dizilerde çoğaltılan hedef bölgenin Nodg3 ve Nodh2 suşlarında *nda*F genini , diğer örneklerde ise *mcy*E genini temsil ettiği görüldü.

Tablo 4.3: HEP PCR sonrası dizileme analizlerinin NCBI'daki kayıt numaraları

Örnek	Suş	Accession number		Örnek	Tür	Accession number
1	Mic4	ref|YP_001658875.1|		I	*P. agardhii*	—
2	Micsp1	—		II	*P. agardhii*	emb|CAD29794.1|
3	MicT5C	gb|ACJ71240.1|		III	*P. agardhii*	—
4	Ana01	—		IV	*M. aeruginosa*	gb|ACJ71241.1|
5	AphizC	—		V	*P. rubescens*	emb|CAQ48242.1|
6	AphizE	—		VI	*P. rubescens*	emb|CAQ48242.1|
7	Cylin	—		VII	*M. aeruginosa*	emb|CAO90229.1|
8	Nodg3	gb|AAO64407.1|		VIII	*P.rubescens*	—
9	Nodh2	gb|AAO64407.1|		IX	*A. elenkinii*	—
10	Pagard	Emb|CAQ48242.1|		X	*P.rubescens*	emb|CAQ48242.1|
11	Prub	Emb|CAO90229.1|		(+)	*M. aeruginosa* PCC7806	gb|ACJ71241.1|
(+)		gb|ACJ71241.1|				

4.4 CYLİNDROSPERMOPSİN İÇİN PKS VE NRPS PCR

Cylindrospermopsin diğer hepatotoksinler gibi NRPS ve PKS enzim kompleksleri tarafından sentezlenmektedir. Varsayılan non-ribozomal peptid sentetaz ve poliketid sentaz bölgelerinin amplifiye edilmesi ile toksin üretiminden sorumlu genlerin varlığı ya da yokluğu belirlenebilmektedir. Bu amaçla ~1000 bç olan hedef varsayılan peptid sentez bölgesinin amplifikasyonu için MTF2/MTR2, ~700 bç olan hedef varsayılan poliked sentez bölgesinin amplifikasyonu için de DKF/DKR primer setleri modüler enzim kompleksinin korunmuş fonksiyonal motiflerinden dizayn edilerek PCR gerçekleştirildi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: NRPS ve PKS PCR sonuçlarına ait agaroz jel elektroforezi görüntüleri. A PKS PCR, B NRPS. (+) Pozitif kontrol *M. aeruginosa*, (-) negatif kontrol

NRPS ve PKS PCR'da pozitif kontrol olarak *M. aeuruginosa* PCC7806 kullanılırken negatif kontrolde DNA yerine su eklendi. Sonuçlara göre PCR'da bir inhibisyon olmadığı görüldüğü için amplifiye olmayan örneklerin toksik olmadığı varsayıldı.

PCR ürünleri daha sonra dizileme analizi yapılmak üzere hazırlanıp Sequencing Unit (School of Biochemistry, UNSW) tarafından 373 model sequencer (Applied Biosystems) kullanılarak bilgisayar ortamına aktarıldı.

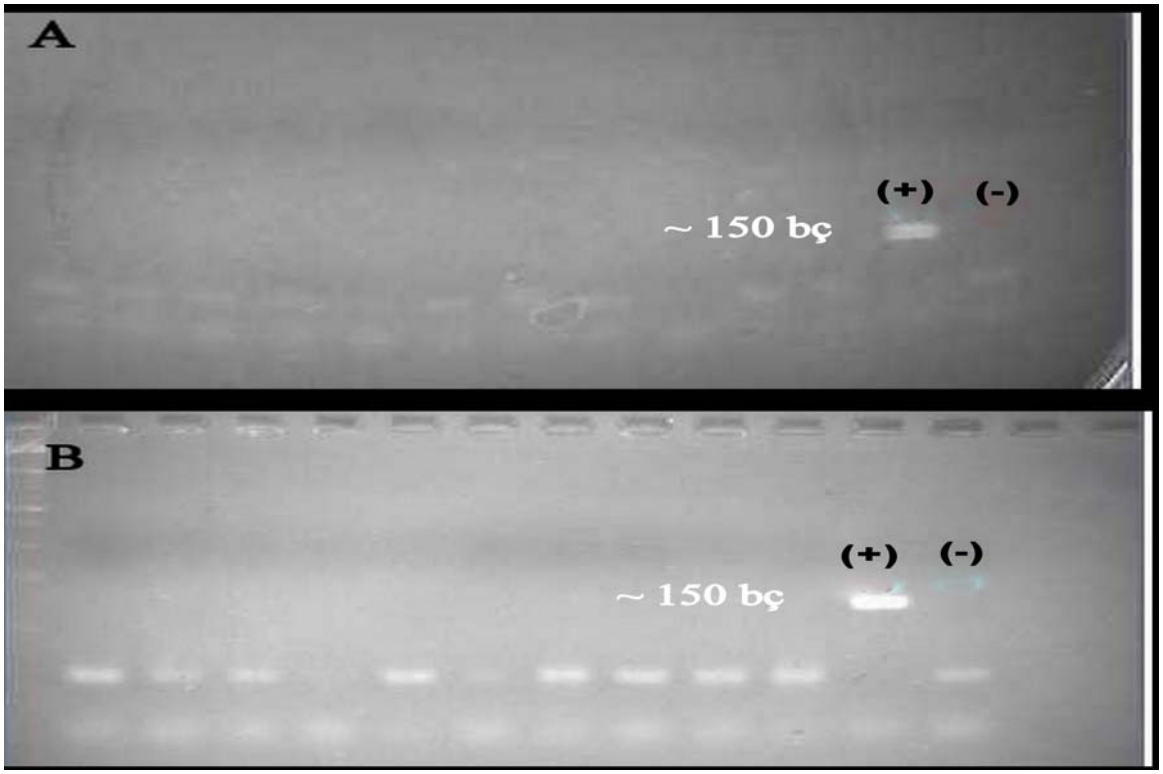
Dizi analizi sonuçları National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) sitesinde nükleotid dizileri aratılarak yapıldı (Tablo 4.4).

Tablo 4.4: NRPS ve PKS PCR sonrası dizileme analizlerinin NCBI'daki kayıt numaraları

Örnek	Tür	Kayıt Numarası
Pozitif kontrol	*M.aeruginosa* PCC7806	dbj|BAB12210.1|
Pozitif kontrol	*M.aeruginosa* PCC7806	dbj|BAA83992

4.5 SXT PCR

Saxitoksin *sxt* gen demeti tarafından sentezlenmektedir. PCR için *sxt*A genini amplifiye etmek için sxtAF/R real-time PCR primerleri kullanıldı. ~ 150 bç uzunluğundaki hedef gen %3'lük agaroz jelde yürütüldü. Pozitif kontrol olarak saxitoksin üreticisi olan *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 suşu kullanıldı (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: STX PCR sonuçlarına ait agaroz jel elektroforezi görüntüleri. A kültür örnekleri, B doğal örnekler. (+) Pozitif kontrol *C. raciborskii* T3, (-) negatif kontrol

Bütün örneklere uygulanan SXT PCR sonucunda hepsinin negatif çıktığı görüldü. Pozitif kontrol olarak kullanılan *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 suşunun amplifiye olduğu görüldü. PCR ürünü dizileme analizi yapılmak üzere hazırlanıp Sequencing Unit (School of Biochemistry, UNSW) tarafından 373 model sequencer (Applied Biosystems) kullanılarak bilgisayar ortamına aktarıldı.

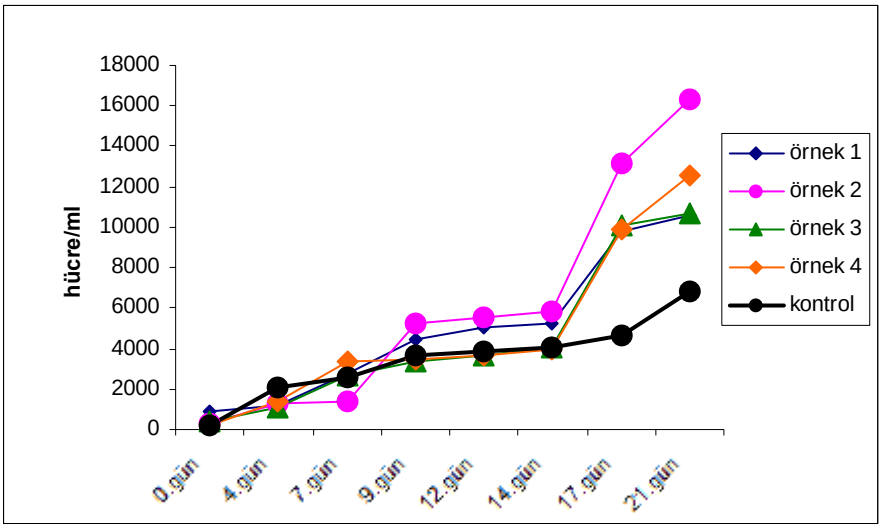
Dizi analizi sonuçları National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) sitesinde nükleotid dizileri aratılarak yapıldı (Tablo 4.5). Arama yapılan dizide benzerlik oranı %99'dur.

Tablo 4.5: SXT PCR sonrası dizileme analizlerinin NCBI'daki kayıt numarası

Örnek	Tür	Kayıt Numarası
Pozitif kontrol	*Cylindrospermopsis raciborskii* T3	gb|ACG63826.1|

4.6 AZOT VE FOSFORUN M. AERUGINOSA*'NIN MİCROCYSTİN ÜRETİMİNE ETKİSİ*

Kontrol grubu ve farklı N:P konsantrasyonları eklenmiş üç tekrarlı kültürlerden 0., 4., 7., 9., 12., 14., 17. ve 21. günler rastgele seçilerek Neubaer sayım kamarası kullanılarak mikroskopta sayımları yapıldı (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: Kültürlerde canlı hücre sayısının zamana bağlı değişimi

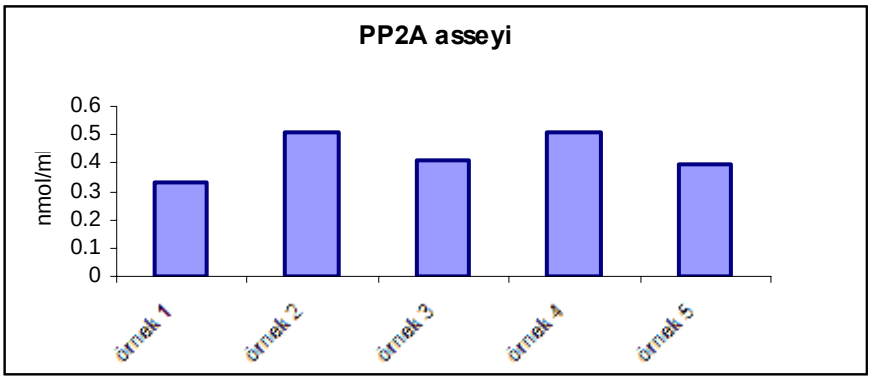
Zamana bağlı hücre sayılarının değişimi incelendiğinde en yüksek artışın N:P oranı 16 olan 2 numaralı örnekte meydana geldiği tespit edildi. N:P oranı 4 olan 1 numaralı örnek hariç diğer örneklerde en fazla artışların 17. ve 21. gün arasında olduğu görüldü. 1 numaralı örneğin 14.-17. günler arasında hızlı büyüme fazına geçtiği, PP2A asseyi ve real-time PCR için ekstrasyonların yapıldığı 21. günde durağan faza geçişte oldukları görüldü. Kontrol grubunun hücre sayısı diğer örneklere göre düzenli olarak arttığı tespit edildi.

N:P oranı 2 ve 1:2 olan 4 ve 3 numaralı örneklerin büyüme oranlarının birbirine çok yakın olduğu görüldü.

4.6.1 Protein Fosfataz 2A İnhibisyon Asseyi

Protein Fosfataz 2A inhibisyon asseyinde seyreltilmemiş örnekler çok konsantre oldukları için inhibisyona ve yanlış sonuçlara neden olabileceği düşüncesiyle

örneklerden 1:50 seyreltilmiş tekrarlar yapıldı. Analiz sonucunda bazı örneklerde toksisitenin daha yüksek olduğu belirlendi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: Kültürlerde PP2A asseyi sonucunun örnekler arasındaki değişimi

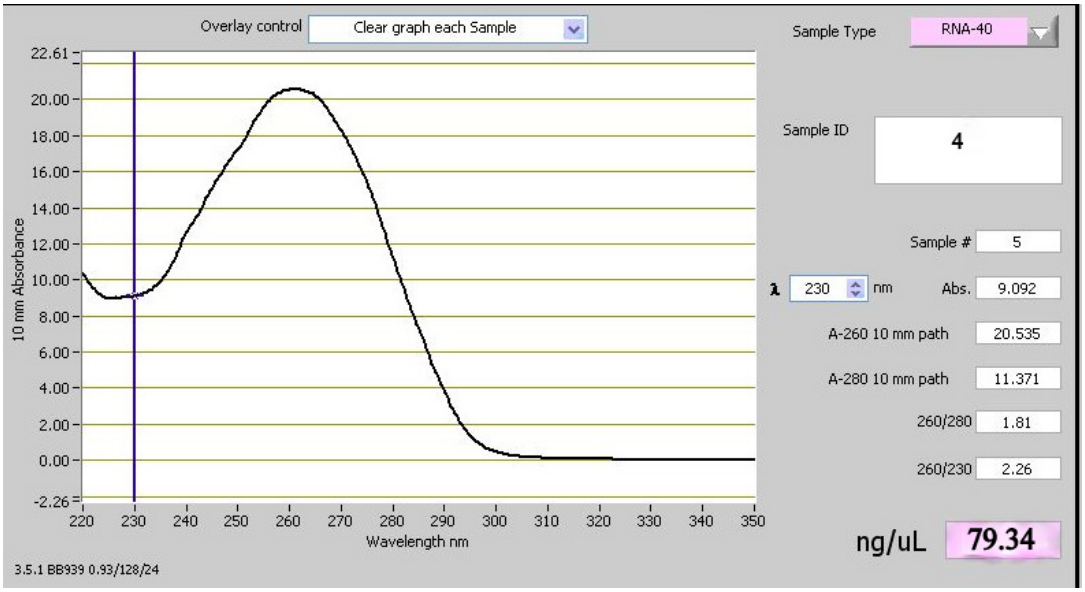
PP2A asseyinde en yüksek toksin miktarının 0.509821 nmol/ml ile N:P oranı 16 ve 2 olan 2 ve 4 numaralı örneklerde olduğu görüldü. En düşük toksin miktarının ise 0.330091 nmol/ml ile N:P oranı 4 olan 1 numaralı örnekte olduğu görüldü. N:P oranı 1:2 olan 3 numaralı örneğin 0.412859 nmol/ml ile 1 numaralı örnekten daha yüksek toksin miktarına sahip olduğu görüldü.

4.6.2 RNA Ekstrasyonu

RNA ekstrasyonu için Trizol yöntemi kullanıldı. RNA'nın saflığını, yeterliliğini ölçmek için örnekler nanodropta bakıldı (Tablo 4.6, Şekil 4.9). Ayrıca DNA kontaminasyonunu belirleyebilmek için örneklere 16S rDNA PCR yapılarak agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

Tablo 4.6: RNA ekstrasyon sonucu elde edilen RNA konsantrasyonları

Örnek	ng/µl
1	70.11
2	48.18
3	56.66
4	79.34
5	40.71
6	8.95



Şekil 4.9: Örnek 4'e ait RNA konsantrasyon değerleri

4.6.3 cDNA Sentezi (Ters Transkriptaz PCR)

cDNA sentezi için toplam 16 örnek hazırlanmış, bunlardan 15 örnek hazırlanan düzenekteki örnekler olmakla beraber son bir örnek ise normal BG11 ortamında hiçbir değişiklik ya da starvasyon dönemine maruz kalmamış örnekten seçildi. Örnekler 3 tekrarlı olarak hazırlandı ve 10 µl alınarak aynı tüpün içinde karıştırıldı. Böylece 6 örnek hazırlanmış oldu.

cDNA sentezi sonrası PCR ürünlerine nanodropta bakıldı (Şekil 4.10). Real-time PCR'da gen anlatımını doğru bir şekilde belirleyebilmek için her tüpte eşit miktarda cDNA bulunmasına önem verildi.

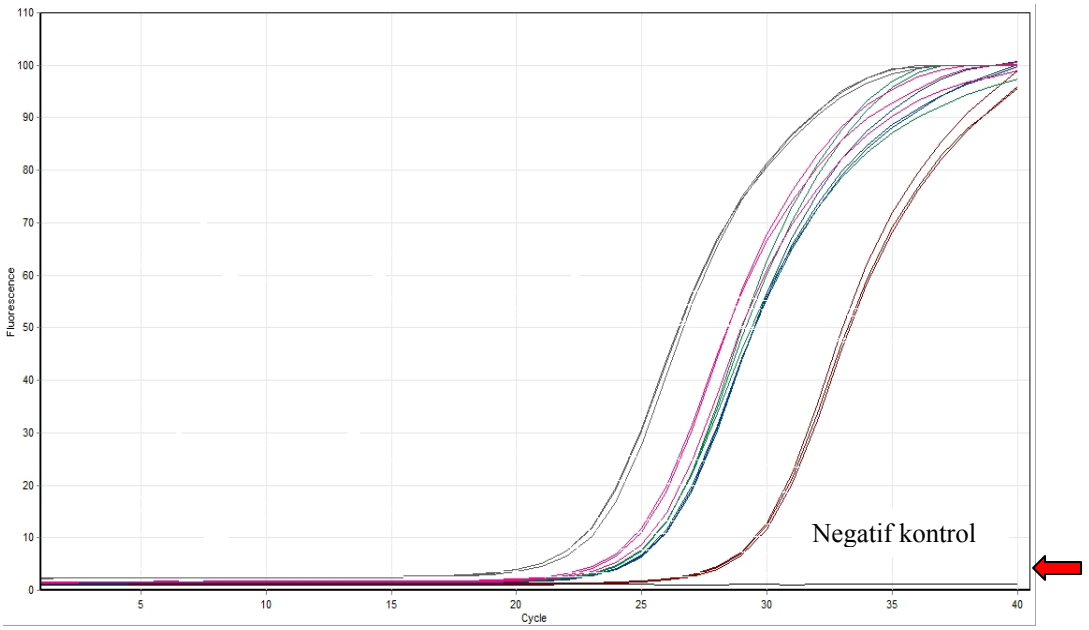
Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
1	Default	7/05/2009	5:25 PM	763.25	19.081	10.646	1.79	2.18
2	Default	7/05/2009	5:26 PM	873.98	21.850	12.167	1.80	2.17
3	Default	7/05/2009	5:27 PM	757.59	18.940	10.580	1.79	2.20
4	Default	7/05/2009	5:28 PM	787.23	19.681	10.941	1.80	2.14
5	Default	7/05/2009	5:29 PM	821.42	20.535	11.371	1.81	2.26
6	Default	7/05/2009	5:30 PM	675.27	16.882	9.333	1.81	2.12

Şekil 4.10: cDNA konsantrasyon değerleri

4.6.4 Real-time PCR

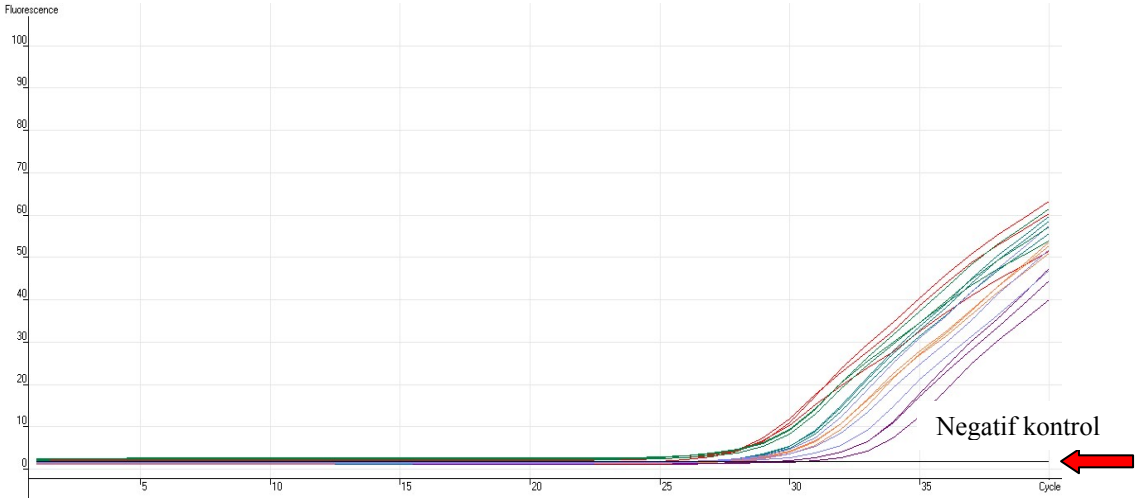
Real-time PCR sonuçları karşılaştırmalı ölçüme dayalı olarak yapıldı. Karşılaştırmalı ölçüm için rpoC geni (DNA-dependent RNA polimeraz) 'housekeeping gene' olarak kullanıldı. 3 tekrarlı olarak hazırlanan örneklerde rpoC gen anlatımı için rpoC1F/ rpoC1R primerleri kullanıldı.

Real-time PCR'ın düzgün çalıştığını ve herhangi bir kontaminasyon olup olmadığını belirleyebilmek için negatif kontrol kullanıldı. Negatif kontrole cDNA hariç bütün real-time PCR bileşenleri eklendi. PCR sonucunda negatif kontrolün hiçbir amplifikasyon göstermemesi beklendi (Şekil 4.11)

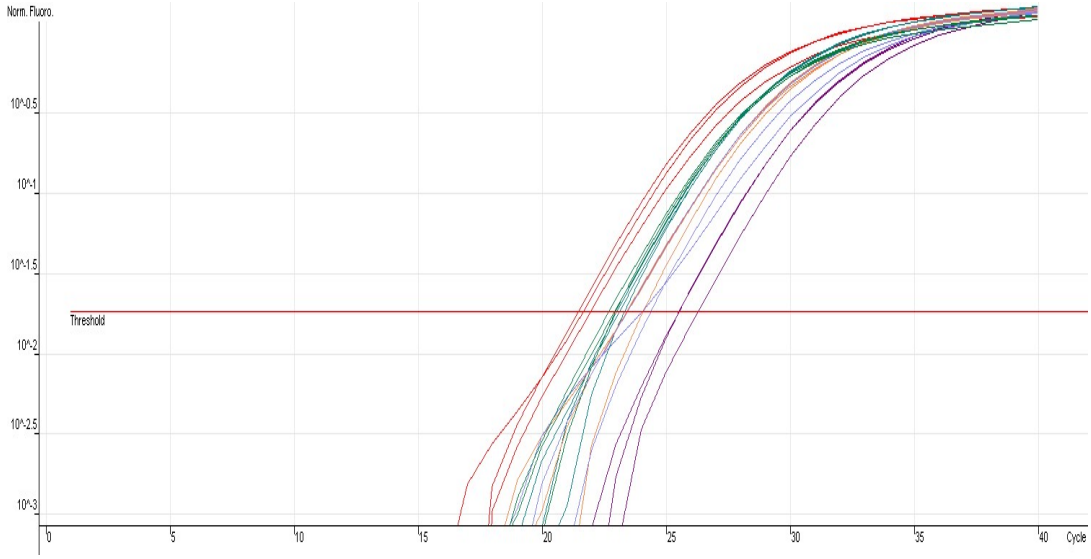


Şekil 4.11: rpoC primerleri ile yapılan real-time PCR sonucu

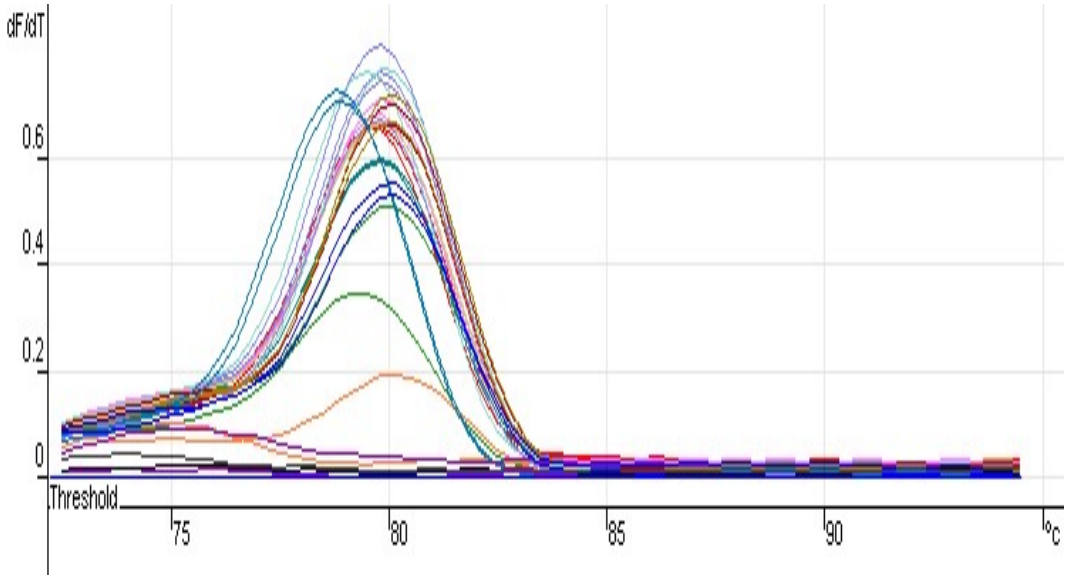
Microcystin gen anlatımını belirlemek için *mcy*A genini hedef alan QmetF/QmetR primerleri kullanıldı. Real time PCR sonucunda kontaminasyon olmadığı görüldü. (Şekil 4.12). Kontaminasyon olmadığına karar verilen PCR'da örneklerin en fazla artışa geçtikleri ortak alanlara bakılarak eşik değerleri tespit edildi (Şekil 4.13, 4.14).



Şekil 4.12: *mcy*A gen anlatımı için real-time PCR.

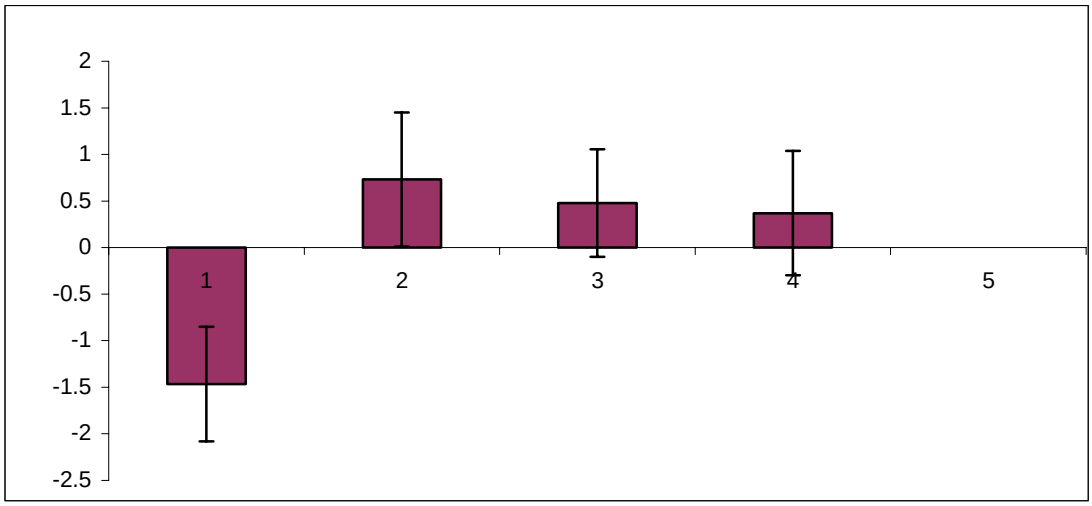


Şekil 4.13: *mcy*A gen anlatımı için real-time PCR'da eşik değeri



Şekil 4.14: *mcy*A gen anlatımının real-time PCR'da genel görünümü

Real-time PCR sonucunda elde edilen sayısal değerler hesaplanarak gen ekspresyon düzeyleri tespit edildi (Şekil 4.15) (Pfaffl, 2001).



Şekil 4.15: *mcy*A gen anlatımının real-time PCR'da örneklere göre sonuçları

Karşılaştırmalı olarak hesaplanan real-time PCR sonuçlarına göre; N:P oranı 4 olan 1 numaralı örnek kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha az *mcy*A transkripsiyonu yaptığı (downregulated) görülmüştür. Diğer örneklere bakıldığında ise *mcy*A gen transkripsiyonunun sırasıyla 2, 3 ve 4. örneklerde kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu (upregulated) görüldü.

Real-time PCR sonuçları, PP2A asseyi ve hücre sayımları ile karşılaştırıldı. En yüksek m*cy*A gen transkripsiyonu yaptığı görülen N:P oranı 16 olan 2 numaralı örneğin 0.73 kat ile en fazla gen transkripsiyonu yapan örnek olduğu görüldü. N:P oranı 4 olan 1 numaralı örneğin 0.68 kat daha az transkripsiyon yaptığı ve bu sonucun PP2A asseyi ile paralel olduğu görüldü. N:P oranı 1:2 olan 3 numaralı örneğin 0.47 kat, N:P oranı 2 olan 4 numaralı örneğin ise 0.36 kat daha fazla gen transkripsiyonuna sahip olduğu belirlendi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Mavi-yeşil algler (Cyanophyta= Cyanobacteria) tatlı ve acı sularda, denizlerde, sıcak su kaynaklarında hatta karasal ortamlarda (ağaç ve kayaların üzerinde, mağaralarda gibi) bulunurlar. Bu grubun üyelerinin varlığı çok uzun zamandan beri bilinmesine rağmen son 30 – 40 yıldan beri daha çok insan kaynaklı kirleticilerin etkisi ile aşırı artış göstermekte ve çeşitli ekolojik, estetik ve sağlık sorunları ortaya çıkarmaktadır (Carmicheal, 1992; Chorus ve diğ., 2000; Chiswell ve diğ., 1997). Mavi-yeşil alglerin aşırı artışı sonucunda istenmeyen tat ve koku sorunları ortaya çıkmakta, toksin üretme yetenekleri nedeniyle de insan ve çevre sağlığını olumsuz yönde etkileyebilmektedirler. Ancak toksik mavi-yeşil algler kolonileşme, istila ve insan ya da hayvan konakçılarında gelişip hastalık meydana getirmedikleri için birincil mikrobiyal patojenlerden olan *Salmonella* ve *Shigella* gibi ya da fırsatçı patojenlerden *Aeromonas* ve *Enterobacter* gibi suyla taşınan patojenler olarak sınıflandırılmamaktadır. Aksine, mavi-yeşil alg hücreleri ve toksinleri su kaynağında gelişim göstererek sağlığı tehdit etmektedirler. Kanıtlar mavi-yeşil alg hücrelerine ve toksinlerine maruz kalmaya bağlı olarak insan ve hayvanlarda ölümcül etkilere kadar birçok ters etki yaptığı kanıtlanmıştır (Codd ve diğ., 2005). Cyanotoksinler diğer biyolojik toksinlerle karşılaştırıldıklarında daha yüksek toksisiteye sahip oldukları görülmüştür. Bu özellikleri nedeni ile saxitoksin uluslararası Kimyasal Silahlar Sözleşmesine göre kimyasal silah olarak kabul edilmiştir (Egmond, 2004).

Ülkemizde 1970'li yıllarda fitoplankton ile ilgili detaylı çalışmaların başlaması ile göl ve baraj sularının fitoplankton toplulukları kalitatif ve kantitatif olarak ortaya konulmaya başlanmıştır. İlk mavi-yeşil alg aşırı artışı 1981 yılında, Kurtboğazı baraj gölünde *Aphanizomenon* sp. 'nin yüksek sayılara ulaşarak içme suyu işleme tesisinin filtrelerini tıkamasıyla görülmüştür (Albay ve diğ., 2003a). Fitoplankton kompozisyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda mavi-yeşil alglerin baskın olduğu çalışmalara yer verilmesine rağmen cyanotoksinlerle ilgili ilk çalışma Albay ve diğ. tarafından (2003a) Sapanca, İznik ve Taşkısı göllerinde cyanotoksinlerin dikey dağılımı ve çevresel

faktörler ile olan ilişkilerinin inceleyen çalışmadır. Albay ve diğ. (2003b) İstanbul'un en büyük içme suyu rezervuarı olan Ömerli Rezervuarı'nda kullanılan Bakırsülfat'ın cyanotoksin üretimine etkisini araştırmışlardır. Daha sonra Albay ve diğ. (2005) Küçükçekmece Gölü'ndeki mevcut cyanotoksin üretimi ile çevresel faktörler karşılaştırmalı olarak incelemişlerdir (Albay ve diğ., 2005). Akçaalan ve diğ. (2006) Sapanca Gölü'nden izole ettiği *P. rubescens* filamentinden direkt microcystin ölçümü yapmıştır. Ayrıca Avrupa kıtasındaki tatlısu göllerinde ilk kez rapor edilen toksik *N. spumigena* İznik gölünde Akçaalan ve diğ. (2009) tarafından rapor edilmiştir.

Sulardaki mavi–yeşil algler tarafından üretilen cyanotoksinlerin ölçümünde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Kullanılan yöntemler arasında enzim bağlantılı immünosorbent asseyi (ELİSA) gibi immünolojik yöntemler ve enzim aktivitesine dayalı (protein fosfataz inhibisyon asseyi) biyokimyasal izleme teknikleri ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) gibi kantitatif kromatografik teknikler de vardır. Bu yöntemler cyanotoksinlerin su kaynağında varlığını ya da yokluğunu belirlemek için kullanılmaktadır. Bu tekniklerin yanında moleküler tabanlı tekniklerde kullanılarak su kaynağındaki olası toksik mavi-yeşil alg türlerinin tanımlamaları yapılmakta, toksin üreten gen tespit edilebilmektedir.

Şimdiye kadar ülkemizde cyanotoksinlerle ilgili yapılan çalışmalarda daha çok analitik yöntemler kullanılmıştır (Akçaalan ve diğ., 2006; Albay ve diğ., 2003a, 2003b; 2005). Cyanotoksinlerin yapısı ve sentez mekanizmaları ile ilgili yapılmış genetik düzeyde ilk çalışma Kaya (2008) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada Küçükçekmece Gölü'nden izole edilen *Microcystis* sp. suşlarından *mcy*B geninin çoğaltılması ve bu gen fragmanlarının arasındaki olası farklılığın tespiti yapılmıştır. Mevcut araştırmada daha çok sayıda içsu alanından örnekleme yapılarak moleküler temelli çalışma yapılmış; böylece son yıllarda yoğun şekilde araştırma yapılan bu alanda ülkemizinde dünya bilimine katkı yapması amaçlanmıştır.

Bilindiği gibi cyanotoksin üretimi tek bir genustaki türler arasında ya da tek bir türden izole edilen laboratuvar kültürleri arasında bile farklılık gösterebilmektedir. Toksik ve toksik olmayan suşların birbirinden ayırt edilebilmesi yalnızca moleküler yöntemlerle mümkün olmaktadır (Kurmayer ve diğ., 2002).

Mevcut çalışmada İznik Gölü, Küçükçekmece Gölü, Taşkısı Gölü ve Sapanca Gölü'nden plankton kepçesi yardımıyla alınan aşırı artış gösteren ya da fitoplankton kompozisyonunda baskın olan türler izole edilmiştir. Ayrıca aşırı alg artışlarının olduğu dönemlerde toplanan alg yoğun su örnekleri liyofilize edilerek saklanmıştır.

DNA izolasyonu XS buffer yöntemine göre yapılmıştır (Tillett ve Neilan, 2000b). Yapılan izolasyon sonucunda canlı örnekler yerine liyofilize edilen örneklerden elde edilen DNA miktar ve saflığının daha kaliteli olduğu görülmüştür. Canlı örneklerden santrifüj yoluyla pelet eldesi sırasında çeşitli kontaminasyonlar ya da kültür ortamının peletten tam anlamıyla uzaklaştırılması kolay olmadığı için liyofilize örneklerdeki DNA'nın daha kaliteli olduğu sonucuna varılmıştır. Aşırı artış gösteren örnekler için geleneksel olarak morfolojilerine bakılarak tür tayinleri yapılmasına rağmen moleküler yöntem kullanılarak tür tayinleri yapılmıştır.

Tillett ve Neilan (2000b) geliştirdikleri XS buffer yöntemi yüksek kalitede DNA eldesine imkan sağlamaktadır. Yoshida ve diğ. (2003) karşılaştırdıkları 4 DNA ekstrasyon yöntemi sonucunda XS buffer yöntemiyle en yüksek miktar ve kalitede DNA elde ettiklerini ve elde edilen DNA ile yapılan PCR ürünlerinin daha yoğun olduklarını belirtmişlerdir (Yoshida ve diğ., 2003).

Günümüzde makro moleküllerden olan ribozomal RNA'ların özellikle 16S rRNA'nın kullanımı evrensel dağılımları, korunaklı yapıları ve yüksek bilgi içerikleri nedeniyle filogenetik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Otsuka ve diğ., 1999; Lane ve diğ., 1985). rRNA dizilerinin birçok organizmada bulunması, organizmalar arasındaki evrimsel ilişkilerin kurulmasına olanak sağlamaktadır. Woese ve diğ. (1987) rRNA genindeki nükleotid mutasyon oranının çok yavaş ve moleküler zamanlayıcı olarak kullanılabilecek kadar değişmez olduğunu savunmuşlardır ve laboratuvar kültürleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada, karşılaştırmalı 16S rRNA alt birim dizileme analizine dayanarak bazı mavi-yeşil alglerden kısmi (RNase T1- generated oligonükleotid katologlar) ve tam 16S rRNA dizilerini tanımlamışlardır. Daha sonraki çalışmalarda doğal örneklerden DNA izole edilmesi, 16S rRNA geninin korunmuş bölgelerini hedefleyen 'evrensel primerler' ile istenen bölgenin amplifiye edilmesi rutinleşmiştir.

Mevcut çalışmada aşırı artış gösteren örneklerin ve kültür örneklerinin tür tayinleri için 16S rDNA geninden yararlanılmıştır. Saker ve diğ. (2005) gıda takviyesi olarak kullanılan toz, kapsül ve tabletlerdeki mavi-yeşil alg kontaminasyonu belirlemek için evrensel ve cyanobacteria özel 27F/809R primerlerini kullanmışlardır. Ayrıca Burns ve diğ. (2004) cyanobakteriyal 16S rRNA'nın varlığı için yapılan PCR ile verilen örneklerin başarılı bir şekilde çalışıp çalışmadıklarını belirlemek için kontrol olarak kullanılmışlardır. Negatif sonuçlar mavi-yeşil alg hücrelerinin elverişsiz olduğunu ya da reaksiyonda inhibisyon olduğunu gösterdiği belirtilmiştir.

16S rDNA PCR ürünleri dizileme analizleri yapılmıştır. Bütün örnekler için 27 ve 809 pozisyonları arasında bulunan 782 bp kısmi dizi amplifiye edilmiş (Tablo 5.1 ve 5.2) ve elde edilen diziler NCBI'da BLAST programında aratılarak, dizilerin kaynağının cyanobakteriyal oldukları doğrulanmıştır.

16S rDNA sadece mavi-yeşil alglere özgü olarak dizayn edildiği gibi genusa özgü olarak da dizayn edilebilir. Moffitt ve diğ. (2001b) *Nodularia* specific primerler dizayn ederek *Nodularia* genusuna ait bütün üyelerin tespiti üzerine çalışmışlar ve PCR sonucunda örneklerden sadece *Nodularia* genusuna ait olan örneklerin amplifiye olduğu ve diğer mavi-yeşil alg genuslarının amplifiye olmadığı belirtilmiştir. Ayrıca toksik *N. spumigena* özel primerler ile *Nodularia* suşları arasında toksik olan örneklerin amplifiye olması sağlanmıştır.

Kullanılan morfolojik tabanlı sınıflandırmalar subjektif yorumlara olanak verir. Toksik ve toksik olmayan türlerin birbirinden ayırt edilmesinde kullanılamaz. Bu nedenle moleküler problarla toksik türlerin belirlenmesi sağlanmaktadır. PCR yöntemleri *Microcystis* (Neilan ve diğ., 1997), *Anabaena* (Beltran ve Neilan, 2000), *Nodularia* (Moffitt ve diğ., 2001b), *Cylindrospermopsis* (Saker ve Neilan, 2001b) gibi yaygın aşırı artış gösteren genusların suşlarının birbirlerinden ayırt edilmesini sağlamaktadır. Beltran ve diğ. (2000) toksik *Anabaena circinalis* suşlarının toksik olmayanlardan ayırt edilmesini sağlamak için moleküler problar dizayn etmişlerdir.

Artan çalışmalar ile cyanotoksinlerin sentez mekanizmaları açığa çıkmaya başlamıştır. Microcystin gen demetinin sekanslanmasından önceki çalışmalarda toksik mavi-yeşil alglerin filogenetik analizleri ve tanımlanmaları için DNA tabanlı yöntemler araştırılmaktaydı (Neilan, 1995; Neilan, 1996; Rudi ve diğ., 1998; Neilan ve diğ., 1999). Tillett ve diğ. (2000a) *M. aeruginosa* PCC7806 suşunda microcystinin biyosentez mekanizmasını tam olarak tanımlamayı başarmışlardır. Moffitt ve Neilan (2004) *N. spumigena* NSOR10 suşunda *nda* gen demetinin tüm sekansını elde etmişlerdir. Bu diziler sayesinde bütün dünyada PCR tabanlı gen tespiti için primerleri dizayn edilmeye başlanmıştır (Tillett ve diğ., 2001; Kurmayer ve diğ., 2002; Schatz ve diğ., 2000; Baker ve diğ., 2001).

Nodularin ve microcystin biyolojik işlevleri ve yapıları olarak benzerlik göstermelerine rağmen, nodularin sadece *N. spumigena* ve *N. harveyana* suşları tarafından tarafından sentezlenir. Ancak microcystin *Microcystis, Anabaena*, *Planktothrix, Nostoc*, *Anabaenopsis* ve *Hapalosiphon* gibi çeşitli genuslara ait bir çok mavi-yeşil alg türü tarafından sentezlenmektedir (Carmicheal, 1992; Sivonen ve Jones, 1999). Rantala ve diğ. (2004)'a göre, nodularin gen demeti microcystin gen demetinin mutasyon ve delesyonları sonucunda meydana geldiğini ileri sürmüşlerdir.

Bununla birlikte, microcystin ve nodularin sentez mekanizmalarının birbirine bu kadar benzemesine rağmen, birçok PCR tabanlı yöntem iki toksinden sadece birini hedef alacak şekilde yapılmıştır (Moffitt ve Neilan, 2001a; Neilan, 1996; Pan ve diğ., 2001; Kurmayer ve diğ., 2004). Ancak, Jungblut ve diğ. (2006) bilinen bütün microcystin ve nodularin üreten suşları tek bir PCR ile belirleyecek bir moleküler yöntem geliştirerek microcystin ve nodularin gen demetindeki *mcy*E ve *nda*F modüllerindeki PKS ve NRPS domeynleri arasındaki bulunan AMT domeyni hedef bölge olarak seçmişlerdir. AMT *mcy*B2 ve *mcy*C1 peptid sentez modülleri gibi sadece microcystin enzim kompleksinde bulunmasının aksine, hem microcystin hem de nodularin biyosentezinde bulunması nedeniyle seçilmiştir. AMT bilinen bütün microcystin ve nodularinin biyosentezinde ADDA kısmına amino grubunun (NH_2) transferinde ya da glutamat semialdehitin glutamine çevrilmesinde önemli rol oynamaktadır (Jungblut ve Neilan, 2006).

Mevcut çalışmada HEPF/R primerleri kullanılarak yapılan HEP PCR ile test edilen kültür ve doğal örneklerdeki hepatotoksik türlerde ~472 bç AMT domeyninin amplifiye edilmesi hedeflenmiştir. HEP PCR ürünlerinin dizileme analizleri sonucunda; kullanılan beş *Microcystis sp*. örneğinden dört tanesinin, dokuz *Planktothrix sp*. örneğinden altı tanesinin ve iki *N. spumigena* suşunun toksik olduğu görülmüştür (Tablo 5.1 ve 5.2). Ancak *Cylindrospermopsis* sp., *Anabaenopsis* sp., *Aphanizomenon* sp. örneklerinden hedef bölge amplifiye edilememiştir. *Microcystis sp.* ve *Planktothrix sp*. örnekleri için yapılan BLASTX taraması sonucunda amplifiye edilen bölgenin mcyE genini , *N. spumigena* için yapılan taramada ise bu bölgenin *nda*F genine ait olduğu görülmüştür. Aratılan dizilerdeki benzerlik oranları %97-100 arasındadır.

Mavi-yeşil algler tarafından üretilen birçok sekonder metabolit olduğu için, çalışmada microcystin ya da nodularin üretimi için negatif çıkan örneklere 'toksin üretmiyor' denilmesi yanlıştır. Bu nedenle negatif sonuç veren örneklerde diğer toksinlerin üretimi araştırılmıştır.

Neilan ve diğ. (1999) özel PKS primerleri (MTF2/MTR2) ile yaptıkları çalışmada, microcystin sentezinden sorumlu gen ortologlarının sadece toksik *Microcystis* suşunda olmadığını, bunun yanısıra *Anabaena, Oscillatoria, Nostoc* ve nodularin üreten *Nodularia* genusunda da bulunduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca *Cylindrospermopsis, Lynbya, Nodularia, Oscillatoria, Plectonema* ve *Pseudanabaena* 'da ise bilinmeyen fonksiyonda benzer peptid sentez kompleksine sahip olduklarını göstermişlerdir. Yaptıkları çalışmada *C. raciborskii* PKS PCR'da negatif sonuç vermesine rağmen, NRPS PCR'da pozitif sonuç vermiştir. Bunun hepatotoksik alkaloid olan cylindrospermopsin üretiminden kaynakladığı düşünülmüştür.

Mevcut çalışmada cylindrospermopsin üretiminin varlığını belirlemek için PKS ve NRPS özel primerleri ile PCR yapılmıştır. *C. raciborskii, A. aphanizomenoides, A. elenkiinii* üzerinde yapılan PCR'da istenen bölgeler amplifiye edilememiştir (Tablo 5.1). Yapılan dizileme analizi sonucunda pozitif kontrolün düzgün çalıştığı belirlenmiş ve türlerin toksin üretmedikleri varsayılmıştır.

C. raciborskii cylindrospermopsin üretebildiği gibi bazı suşları da saxitoksin üretme yeteneğine sahiptir. Saxitoksin ve analogları bütün dünyada kıyısal kabuklu ekonomisini ve insan sağlığını etkileyen paralitik kabuklu zehirlenmesine (PSP) neden olmaktadır. Küresel olarak, her yıl PSP'den kaynaklanan 2000'den fazla olay olduğu ve bu olaylardaki ölüm oranının %15 olduğu tahmin edilmektedir. Saxitoksin hem *Alexandrium, Gymnodinium* ve *Pyrodinium* gibi denizel genuslar tarafından, hem de *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* ve *Lyngbya* gibi tatlı su genusları tarafından üretilmektedir (Kellmann ve Neilan, 2007).

Kellmann ve diğ. (2008) yaptığı çalışmalar sonucunda putative saxitoksin biyosentetik gen kümesini (*sxt*) *C. raciborskii* T3 suşunda belirlemişlerdir. Mevcut çalışmada saxitoksin üretimini belirlemek için *sxt*A genini amplifiye etmede kullanılan sxtAF/R real-time PCR primerleri kullanılmıştır. ~150 bç uzunluğundaki hedef gen sadece pozitif kontrol olarak kullanılan *C. raciborskii* T3 suşundan amplifiye edilmiştir (Tablo 5.1 ve 5.2). BLASTX taramasında aratılan dizinin benzerlik oranı %99'dur.

Albay ve diğ. (2005) Küçükçekmece gölünde toksik mavi-yeşil algler üzerine yaptıkları çalışmada *M. aeruginosa* türünün baskın olduğunu ve çalışma sırasında *M. aeruginosa*'dan kaynaklanan aşırı artışların meydana geldiğini belirtmişlerdir. Aşırı artışların yüksek besin tuzu içeriği ve ışık yoğunluğundan, durgun hava koşullarından ve optimal yüzey sıcaklığından kaynaklandığı kanıtlanmıştır. Mevcut çalışmada Küçükçekmece gölünden toplam sekiz örnek bulunmaktadır. Yapılan moleküler temelli çalışma sonucunda gölden alınan üç *M. aeruginosa* ve bir *M. flos-aquae* örneğinden *M. aeruginosa*'ların toksik olduğu ancak *M. flos-aquae*'nin toksik olmadığı görülmüştür. Diğer dört örnek ise *P.agardhii'*ye ait olup, bu dört örnekten ikisinin toksik olduğu tespit edilmiştir (Tablo 5.1 ve 5.2).

Küçükçekmece gölünden izole edilen suşlar olan Mic4 (*M. aeruginosa*) ve Micsp1 (*M. flos-aquae*) aynı aşırı artıştan izole edilen suşlardır. Mic4 suşunda toksin üretiminden sorumlu *mcy*E geninin varlığı tespit edilmiş olup, Micsp1 suşundan bu gen amplifiye edilememiştir. Bu nedenle Micsp1 suşunun microcystin sentezlemediği sonucuna varılmıştır. Yapılan çalışmalarda toksik ve toksik olmayan türlerin aynı populasyonda yer alabileceği belirtilmiştir (Carmicheal, 2001).

Albay ve diğ. (2003a) Sapanca gölünde yaptıkları çalışmada baskın türün *P. rubescens* olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan analitik analizler sonucu 67 örnekten 43'nün toksik olduğu belirtilmiştir. Microcystinin vertikal dağılımına bakıldığında en fazla toksin varlığının 15 ve 20 m derinlikler arasında bulunduğu görülmektedir. Aynı çalışmada, Taşkısı gölünde ise 15 örnekten 9'da microcystinin pozitif çıktığı ve baskın türün *M. aeruginosa* olduğu belirtilmiştir. Mevcut çalışmada, Taşkısı gölünden izole edilen MicT5C suşu *M. wesenbergii* olup *mcy*E geni varlığı tespit edilmiştir. Sapanca gölü'nden alınan beş *P. rubescens* örneğinden dördünde microcystin üretiminden sorumlu *mcy*E geninin varlığı tespit edilmiştir.

Tablo 5.1: Marmara Bölgesi göllerinden izole edilen mavi-yeşil alg türleri ve toksin üretimleri

	Örnek Suşlar	**16S rRNA**	**Microcystin**	**Nodularin**	**Saxitoxin**	**Cylindrospermopsin**	**Göl**
1	Mic4	+	+	-	-	-	Küçükçekmece
2	Micsp1	+	-	-	-	-	Küçükçekmece
3	MicT5C	+	+	-	-	-	Taşkısı
4	Ana01	+	-	-	-	-	İznik
5	AphizC	+	-	-	-	-	İznik
6	AphizE	+	-	-	-	-	İznik
7	Cylin	+	-	-	-	-	Manyas
8	Nodg3	+	-	+	-	-	İznik
9	Nodh2	+	-	+	-	-	İznik
10	Pagard	+	+	-	-	-	Küçükçekmece
11	Prub	+	+	-	-	-	Sapanca

Tablo 5.2: Marmara Bölgesi göllerinde aşırı çoğalan mavi-yeşil alg türleri ve toksin üretimleri

	AŞIRI ARTIŞ ÖRNEKLERİ	**16S rRNA**	**Microcystin**	**Nodularin**	**Saxitoxin**	**Cylindrospermopsin**	**Göl**
I	*Planktothrix agardhii*	+	-	-	-	-	Küçükçekmece
II	*Planktothrix agardhii*	+	+	-	-	-	Küçükçekmece
III	*Planktothrix agardhii*	+	-	-	-	-	Küçükçekmece
IV	*Microcystis aeruginosa*	+	+	-	-	-	Küçükçekmece
V	*Planktothrix rubescens*	+	+	-	-	-	Sapanca
VI	*Planktothrix rubescens*	+	+	-	-	-	Sapanca
VII	*Microcystis aeruginosa*	+	+	-	-	-	Küçükçekmece
VIII	*Planktothrix rubescens*	+	-	-	-	-	Sapanca
IX	*Anabaenopsis elenkinii*	+	-	-	-	-	İznik
X	*Planktothrix rubescens*	+	+	-	-	-	Sapanca

Mevcut çalışmada elde edilen veriler daha çok cyanotoksinin göl ve göletlerdeki dağılımı üzerinedir. Çalışılan göller ve cyanotoksin dağılımı göz önüne alındığında, toksin üretimini etkileyen fiziksel ve kimyasal faktörlerin ortaya çıkarılması aşırı artışların ve cyanotoksin üretiminin önüne geçilmesi için büyük bir öneme sahiptir. Genel olarak, göl ve rezervuarlarda ötrifikasyon nitrat ve fosfat gibi inorganik azot ve fosforun artışına bağlı olarak meydana gelmektedir. Ötrifikasyon, mavi-yeşil alglerin aşırı artışı ile sonuçlanmaktadır. Toksik mavi-yeşil alg hücrelerinden kaynaklanan microcystin kompozisyonu ve miktarı ötrofik göllerde yıl boyunca sürekli değişim göstermektedir (Fastner ve diğ., 1999; Kotak ve diğ., 2000).

Microcystin üretimini ve üretimi etkileyen faktörlerin belirlenmesi göl yönetimi ve hepatotoksinlerden kaynaklanan sağlık risklerini en aza indirmek için büyük önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalar microcystin üretimini etkileyen fiziko-kimyasal özelliklerin çok çeşitli olduğunu ve hiç birinin belirli bir standarta oturtulamadığını göstermektedir. Mavi-yeşil alg artışları genellikle toksik ve toksik olmayan suşlardan oluşur, ve laboratuvar çalışmalarına göre microcystin üretimini etkileyen faktörler

suşlara göre farklılık göstermektedir (Graham ve diğ., 2004). Sivonen (1990), *Oscillatoria* suşları arasında yaptıkları çalışmada en yüksek toksin üretiminin yüksek azot konsantrasyonu bulunan besi ortamında ve düşük ışık yoğunluğunda meydana geldiğini belirtmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada düşük ya da yüksek fosfor konsantrasyonlarına bağlı toksin üretimine bakıldığında toksin üretimine ilave bir etkisi olmadığı görülmüştür.

Mevcut çalışmada toksik suşlardan olan mic4 suşu microcystin üretimini etkileyen fiziko-kimyasal faktörlerin belirlenmesi için seçilmiştir. Albay ve diğ (2005) Küçükçekmece gölünde mavi-yeşil alglerin aşırı artışı üzerine yaptıkları çalışmada microcystin üretimini etkileyen faktörleri incelemişlerdir. Mic4 suşu Küçükçekmece gölünden izole edildiği için, verilerin karşılaştırılması açısından önem taşımaktadır.

Microcystin sentez mekanizması ortaya çıkarıldığından beri, potansiyel toksik *Microcystis* aşırı artışlarının erken teşhisinde doğal örneklerden *mcy*A, B ve C genlerinin PCR amplifikasyonu yapılmaktadır. Bununla birlikte, bu yöntemler PCR ya da MALDI-TOF MS gibi kantitatif olmayan metodlardır.

Kantitatif metodlar, göllerde microcystin üreten genusların çalışılmasında büyük önem taşımaktadır. Geliştirilen kantitafit metodlardan biri olan real-time PCR, toksik aşırı artışların oluşumlarının izlenmesi ve doğal ortamlardaki toksik suşların büyümelerini etkileyen faktörlerin açığa çıkarılmasını sağlamaktadır (Vaitomaa ve diğ., 2003).

Albay ve diğ (2005) Küçükçekmece gölünde *M. aeruginosa* aşırı artışlarının ve microcystin üretiminin yüksek besin tuzu girdisi, yüksek ışık yoğunluğu, su kolonunun durgunluğu ve optimal yüzey sıcaklığında ($\rangle$24 ^{0}C) gelişim gösterdiğini belirtmişlerdir. Küçükçekmece gölüne aşırı besin tuzu girdisi düşünüldüğünde gölün ıslahı ve mavi-yeşil alglerin aşırı artışlarının engellenmesi için gölde ilk olarak besin tuzu girdilerinin önlenmesi gerektiği rapor edilmiştir.

Toksik mavi-yeşil alg suşları toksik olmayanlara göre yüksek N ve P konsantrasyonlarına ihtiyaç duymaktadır. Vezie ve diğ (2002) toksik ve toksik olmayan Microcystis suşları üzerine yaptıkları çalışmada toksik olan suşların büyüme için toksik

olmayanlara göre daha fazla besin tuzlarına ihtiyacı olduklarını kanıtlamıştır. Bunun nedeninin ise toksin sentezi için ekstra enerji ve materyal ihtiyacından kaynaklandığı düşünülmektedir. *M. aeruginosa*, *P. agardhii* gibi azot fikse edemeyen türlerde yüksek toksisitenin yüksek N konsantrasyonu ile ilişkili olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, azot yokluğunda da toksisitenin artabildiği rapor edilmiştir (Zurawell ve diğ., 2005). Anabaena gibi azot fikse edebilen mavi-yeşil alglerde en yüksek toksisitenin azot eklenmemiş ortamda bulunan suşta olduğu rapor edilmiştir.

Kameyama ve diğ (2002) yaptıkları çalışmada 0.2 mg/l- 0.8 mg/l arasında değişen yüksek nitrat konsantrasyonlarında hem spesifik büyüme oranının hem de microcystin üretiminin arttığını belirtmişlerdir. Aynı çalışmada fosfat konsantrasyonunun artmasıyla büyüme oranı devamlı olmasına rağmen microcystin üretiminin ve hücre içi microcystin miktarının önemli bir biçimde azaldığı görülmüştür.

Mevcut çalışmada kantitatif moleküler metodların başında gelen real-time PCR öncesi, sonuçların doğruluğunu kontrol etmek amacıyla toksin miktarını ölçmede kullanılan analitik yöntemlerden biri olan PP2A asseyi yapılmıştır.

Albay ve diğ (2005), Küçükçekmece gölünde yaptıkları çalışmada toplam microcystin konsantrasyonunun *Microcystis* biyomasıyla pozitif korrelasyon gösterdiğini ve en yüksek microcystin üretiminin TN:TP oranının 7'den büyük olduğu zamanlarda gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Mevcut çalışmada N:P oranı 4, 16, 1:2 ve 2 olan BG11 ortamlarına ekilen mic4 suşunda nitrat ve fosfatın toksin üretimine etkisi araştırılmıştır.

Hücre sayımlarına bakıldığında en yüksek aşırı artışın N:P oranı 16 olan örnekte olduğu görülmektedir. PP2A asseyine bakıldığında en yüksek microcystin konsantrasyonunun 0.509821 nmol/ml ile N:P oranları 16 ve 2 olan örneklerde olduğu belirlenmiştir.

Mevcut çalışmada real-time PCR QmetF/R primerleri kullanılarak yapılmıştır. Saker ve diğ (2005) gıda takviyesi olarak kullanılan ürünlerde yaptıkları çalışmada *mcy*A ve *mcy*E genini hedef bölge olarak seçmişlerdir. Yapılan PCR sonucunda Qmet primerler kullanarak ~200 bç olan *M.aeruginosa*'nın microcystin sentezindeki hedef *mcy*A modülünü amplifiye etmişlerdir.

Karşılaştırmalı olarak hesaplanan real-time PCR sonuçlarına göre; N:P oranı 4 olan 1 numaralı örnek kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha az *mcy*A transkripsiyonu yaptığı (downregulated) görülmüştür. Microcystin sentez mekanizmasında *mcy*A, toksin peptid zincirinin ilk halkası olduğu için, 1 numaralı örnekte daha az toksin üretimi olması beklenmektedir. Diğer örneklere bakıldığında ise *mcy*A gen transkripsiyonunun sırasıyla 2, 3 ve 4. örneklerde kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu (upregulated) görülmektedir. *Mcy*A gen transkripsiyonu daha fazla olan örneklerin sonuçta daha fazla toksin üretmesi ve buna bağlı olarakta hücrelerin içinde bulundukları ortamın onları daha toksik hala getirdiği varsayılmaktadır.

Birçok araştırma, aşırı artış gösteren mavi-yeşil alg örneklerinde toksisitedeki değişimlerin örnekleme bölgesi, mevsim, hafta hatta örnekleme günü ile ilgili olduğunu belirtmişlerdir (Codd ve Bell, 1985). PP2A asseyi sonuçları ile real-time PCR sonuçları karşılaştırıldığında N:P oranı 4 olan 1 numaralı örneğin 0.68 kat daha az *mcy*A transkripsiyonu yaptığı görülmektedir. PP2A asseyi ile örnek 1'in kontrol grubundan daha az toksin ürettiği görülmektedir. Buna göre PP2A ve real-time PCR sonuçları birbiri ile pozitif korrelasyon göstermektedir.

Kotak ve diğ. (2000) TN:TP oranının microcystin konsantrasyonundaki ($\mu g\ L^{-1}$) değişimlerin çoğunu açıkladığını belirtmişlerdir. Lee ve diğ. (2000) kültür ortamındaki TN konsantrasyonu ile *M. aeruginosa*'nın hücresel microcystin içeriğinin yüksek korrelasyona sahip olduğunu kanıtlamıştır. Yaptıkları çalışmada en yüksek toksin üretiminin N:P oranı 16 olan ortamda meydana geldiğini belirtmişlerdir. Mevcut çalışmada da N:P oranı 16 olan 2 numaralı örnek en yüksek *mcy*A transkripsiyonuna (0.73 kat) ve PP2A asseyi sonucuna göre de en yüksek toksin üretimine (0.509821 nmol/ml) sahip olduğu görülmektedir.

Watanabe ve Oishi (1985) *M. aeruginosa* M228 suşunun toksisitesinin kültür ortamındaki azot konsantrasyonu azaltıldığında büyük ölçüde azaldığını, ancak fosfor konsantrasyonu azaltıldığında çok az bir değişim olduğunu rapor etmişlerdir. Mevcut çalışmada da N:P oranı 1:2 olan 3 numaralı örnek real-time PCR sonucunda (0.47 kat) *mcy*A transkripsiyonuna 4. örneğe göre daha fazla gen anlatımı olmasına rağmen PP2A

sonucundaki toksin üretimine bakıldığında (0.412859 nmol/ml) kontrol grubuna göre toksin üretiminin çok farklı olmadığı görülmektedir.

Mevcut çalışmada N:P oranı 2 olan 4 numaralı örneğin düşük *mcy*A transkripsiyonuna (0.36 kat) sahip olduğu ancak, yüksek (0.509821 nmol/ml) toksin konsantrasyonuna sahip olduğu görülmektedir. Tillett ve diğ. (2001) microcystin sentezindeki genetik markırların varlığının her zaman o suşun microcystin üretimine yetenekli olmayabileceğini belirtmişlerdir. Bu amaçla, Oberholster ve Botha (2007) yaptıkları çalışma da ELISA asseyini kullanarak real-time PCR sonuçlarını karşılaştırmışlardır. Real-time PCR'dan sonra seçtikleri *mcy*A-D genlerinin düşük ekspresyonu yaptığını buna rağmen, toksisitenin değişken olduğunu belirtmişlerdir.

Van der Westhuizen ve Eloff (1985) kültür çalışmalarında *M. aeruginosa*'nın toksisitesini etkileyen faktörler arasında en çok bahsedilenin sıcaklık olduğunu belirlemiştir. Yaptıkları çalışmada 20^0C'den yüksek sıcaklıklarda toksin üretimindeki azalmanın stres seviyesinin azalması ile ilişkilendirmişlerdir.

Mevcut çalışmada N:P oranı 16 olan örneğin en yüksek *mcyA* gen anlatımına ve toksin üretimine sahip olması besin tuzlarının toksin üretimi üzerine etkisini açıkça göstermektedir. Bununla birlikte, N:P oranı 4 olan örneğin daha düşük besin tuzu içeriği bulunduran örneklere göre en az *mcyA* gen anlatımına ve toksin üretimine sahip olması şaşırtıcıdır. Microcystin sentez oranını büyüme oranıyla pozitif ilişkilidir. Hücreler durağan faza geçtiklerinde toksin üretimi düşer. Örneklerin PP2A asseyi ve real-time PCR uygulaması yapıldığında durağan fazda olması nedeniyle sonuçları etkilediği düşünülmektedir.

Vezie ve diğ. (2002), çalışmalarında toksin üretiminin düşük büyüme koşullarında da yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Yaptıkları çalışmada besin tuzu sınırlaması arttıkça, microcystin/protein oranının toksin sızıntısına bağlı olarak azalabileceğini yada hücresel protein içeriğine göre artabileceğini belirtmişlerdir. Mevcut çalışmada N:P oranı daha düşük (N:P 1 ve 1:2) ancak *mcy*A gen anlatımı ve toksin üretimi daha yüksek olan örnekler bulunmaktadır. Bu durumda hücrelerin microcytin üretimi ile N:P oranındaki

değişimlerle başa çıkmaya çalıştıkları ya da hücresel protein içeriğindeki artışlardan kaynaklanan toksisite artışı olabileceği sonucuna varıldı.

Bu çalışma, Marmara Bölgesi'nde bulunan göl ve rezervuarların toksik mavi-yeşil algler açısından durumunu ortaya koymaktadır. Son yıllarda yapılan moleküler temelli araştırmalarda toksik ve toksik olmayan cyanobacteria türlerinin aynı populasyonda yer alabildiği, aynı türün farklı suşlarının bir kısmının toksin üretme yeteneği varken, bir kısmının ise toksin üretmediği anlaşılmıştır (Carmicheal, 1992). Bu araştırmalar içsularda (göl, gölet, içme suyu rezervuarı ve yavaş akan akarsular) aşırı artış gösteren mavi-yeşil alglerden kaynaklanacak çeşitli sorunların (sağlık riski dahil) önceden tahmin edilmesinde ve içsuların sürdürülebilir yönetiminde büyük yarar sağlayacaktır. Moleküler uygulamalar ve DNA amplifikasyon yöntemleri, su kalitesi düzenlemelerinde büyük bir avantaj sağlamaktadır. Spesifik nükleik asit dizilemesine dayanarak büyük kompleks doğal populasyonlardan çok küçük mikrobiyal bileşini tanımlayabilmek toksik türlerinde tanımlanmasını sağlamaktadır. Marmara Bölgesi'nin başlıca göllerinden olan Küçükçekmece, Sapanca, Manyas, İznik ve Taşkısı göllerinin toksik mavi-yeşil alglar açısından durumuna bakıldığında hemen hemen hepsinde toksin üreten türlerin varlığı tespit edilmiştir. Aşırı artış göstermemesine rağmen mavi-yeşil alglerin suda bulunuşu bize su kaynağının tehdit altında olduğunu ve sürekli izlenmesinin gerekliliğini göstermektedir. Çünkü tespit edilerek izole edilen tür toksin üretme yeteneğinde olabilmektedir. Doğal ortamdaki izleme çalışmalarının laboratuvar ortamında yapılacak deneylerle desteklenmesi gerekmektedir. Real-time PCR ile Küçükçekmece gölünden elde edilen suşun hangi çevresel koşulların etkisi altında artış yaptığı belirlenmeye çalışmıştır. Bu çalışmanın gelecek yıllarda ülkemizde yapılacak moleküler temelli cyanotoksin araştırmalarına temel oluşturacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

AKCAALAN, R., YOUNG, F.M, METCALF, J.S., MORRISON, L.F., ALBAY, M., CODD, G.A., 2006, Microcystin analysis in single filaments of *Planktothrix* spp. in laboratory cultures and environmental blooms, *Water Research,* 40: 1583–1590.

AKCAALAN, R., MAZUR-MARZEC, H., ZALEWSKA, A., ALBAY, M., 2009, Phenotypic and toxicological characterization of toxic *Nodularia spumigena* from a freshwater lake in Turkey, *Elsevier,* 8, 273-278.

ALBAY, M., AKCAALAN, R., TUFEKCI, H., METCALF, J.S., BEATTIE, K.A., CODD, G.A., 2003a, Depth profiles of cyanobacterial hepatotoxins (microcystins) in three Turkish freshwater lakes, *Hydrobiologia*, 505: 89-95.

ALBAY, M., AKCAALAN, R., AYKULU, G., TUFEKCI, H., BEATTIE, K.A., CODD, G.A., 2003b, Occurence of toxic cyanobacteria before and after cupper sulphate treatment in a water reservoir, Istanbul, Turkey, *Archiv für Hydrobiologie Suppl. Algological Studies*, 109, 67-78.

ALBAY, M., MATTHIENSEN, A., CODD, G.A., 2005, Occurence of toxic Blue-Green Algae in Kucukcekmece Lagoon, Istanbul, Turkey, *Environmental Toxicology,* 20, 277-284.

ALBAY, M., AKCAALAN, R., 2008, Effects of water quality and hydrologic drivers on periphyton colonization on *Sparganium erectum* in two Turkish lakes with different mixing regimes, *Environ Monit Assess,* 146, 171-181.

BAKER, P.D., HUMPAGE, A. R., 1994, Toxicity associated with commonly occurring cyanobacteria in surface waters of the Murray-Darling Basin, Australia, *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 45(5), 773-786.

BAKER, J. A., NEILAN, B. A., ENTSCH, B., MCKAY, D. B., 2001, Identification of cyanobacteria and their toxigenicity in environmental samples by rapid molecular analysis, *Environ Toxicol,* 16, 472–82.

BARCO,, M., FLORES, C., RIVERA, J., CAIXACH, J., 2004, Determination of microcystin variants and related peptides present in a water bloom of *Planktothrix (Oscillatoria) rubescen*s in a Spanish drinking water reservoir by LC/ESI-MS., *Toxicon* 44, 881–886.

BELTRAN, E. C., NEILAN,B. A. 2000, Geographical segregation of the neurotoxin-producing cyanobacterium *Anabaena circinalis*. *Appl. Environ. Microbiol*, 66, 4468–4474.

BOURKE, A.T.C., HAWES, R.B., 1983a, Freshwater cyanobacteria (blue-green algae) and human health, *Med J Aust*., 11:491-2.

BOURKE, A. T. C., HAWES, R. B., NEILSON, A., STALLMAN, N.D., 1983b, An outbreak of hepato-enteritis (the Palm Island mystery disease) possibly caused by algal intoxication, *Toxicon,* 21, 45–48.

BRITTAIN, S., MOHAMED, Z.A., WANG, J., LEHMANN, V.K., CARMICHEAL, W.W., RINEHART, K.L, 2000, Isolation and characterization of microcystins from a river Nile strain of *Oscillatoria tenuis* Agardh ex Gomont, *Toxicon*, 38: 1759-71.

BRYANT, D.A., 1982, Phycoerythrocyanin and phycoerythrin: properties and occurrence in cyanobacteria, *Journal of General Microbiology*, 128(4), 835-844.

BUBER, E., ACAN, N.L., 2004, Ribozom dışı yolla sentezlenen biyoaktif peptidler, *Hacettepe Tıp Dergisi,* 35: 43-48.

BUDEL,B., RHIEL, E.,1985, A new cell wall structure in a symbiotic and a free-living strain of the blue-green alga genus *Chroococcidiopsis* (Pleurocapsales), *Archives of Microbiology*, 143 (2), 117-121.

BURGOYNE, D. L., HEMSCHEIDT, T. K., MOORE, R. E., RUNNEGAR, M. T. C., 2000, Biosynthesis of cylindrospermopsin, *J. Org. Chem*., 65,152–156.

BURNS, B.P., SAKER, M.L., MOFFITT, M., NEILAN, B.A., 2004, Molecular detection of the genes responsible for cyanobacterial toxin production in the genera *Microcystis, Nodularia and Cylindrospermopsis*, *Methods Mol Biol.,* 268, 213-222.

BYTH, S., 1980, Palm Island mystery disease, *Med. J. Aust*., **2,**40-42.

CANE, D., WALSH, E.,C.T, KHOSLA, C., 1998, Harnessing the biosynethic code; combination, permutations, and mutations, *Science,* 282: 63-68.

CARMICHEAL, W.W., 1992, Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins, *Journal of Applied Bacteriology*, 72,445–459.

CARMICHEAL, W.W., 1994, The toxins of cyanobacteria, *Scientific American*, 270, 78–86.

CARMICHEAL, W.W., 2001, Healt effects of toxin-producing cyanobacteria: 'The CyanoHABs', *Human and Ecological Assessment*, 7(5), 1292-1407.

CARPENTER, E.J., CARMICHEAL, W.W., 1995, Taxonomy of cyanobacteria. In: HALLEGRAEFF, G.M., ANDERSON, D.M., CEMBELLA A.D., (eds), Manual on harmful marine microalgae, *IOC Manuals and Guides*, UNESCO, USA, 33:373-80.

CELİK, K., 2006, Spatial and seasonal variations in chlorophyll nutrient relationships in the shallow hypertrophic Lake Manyas, Turkey, *Environmental Monitoring and Assessment*, 117(1–3), 261–269.

CHISWELL, R., SMITH, M., NORRIS, R., EAGLESHAM, G., SHAW, G., SEAWRIGHT, A., MOORE, M., 1997, The cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii,* and its related toxin, cylindrospermopsin, *Australian Journal of Ecotoxicology,* 3, 7-23.

CHORUS I, BARTRAM, J., 1999, Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, Monitoring and Management. *E. & FN. Spon*, London, 416 pp.

CHORUS, I., FALCONER, I.R., SALAS, H.J., BARTRAM, J., 2000, Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters, *Journal of Toxicology and Environmental Health,* 3: 323-347.

CHRISTIANSEN, G., FASTNER, J., ERHARD, M., BORNER, T., DITTMANN, E., 2003, Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution, and manipulation, *J. Bacteriol.,* 185, 564-572.

CODD, G.A., BELL, S.G., 1985, Eutrophication and toxic cyanobacteria in freshwaters, *J Water. Pollut. Cont*., 34, 225-232.

CODD, G.A., 2000, Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control, *Ecological Engineering,* 16: 51-60.

CODD, G.A., MORRISON, L.F., METCALF, J.S., 2005, Cyanobacterial toxins: risk management for health protection, *Toxicol Appl Pharmacol,* 203, 264-272.

CROSA, J. H., WALSH, C. T., 2002, Genetics and assembly line enzymology of siderphore biosynthesis in bacteria, *Microbiol. Mol. Biol. Rev*., 66, 223-249.

DEMOULİN,V., JANSSEN, M.P., 1981, Relationship between diameter of the filament and cell shape in blue-green algae, *European Journal of Phycology*, 16, 55-58.

DITTMANN, E., NEILAN, B.A., ERHARD, M., VON DOHREN, H., BORNER, T., 1997, Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, *Molecular Microbiology*, 26, 779-787.

DUBBS, J.M., BRYANT, D.A., 1991, Molecular cloning and transcriptional analysis of the *cpeBA* operon of the cyanobacterium *Pseudanabaena* species PCC 7409, *Molecular Microbiology*, 5(12), 3073-3085.

DUY, T.N., LAM, P.K.S., SHAW, G.R., CONNELL, D.W., 2000, Toxicology and risk assessment of fresh water cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water, *Rev. Environ. Contam. Toxicol*. 163:113-186.

EDLER, L., FERNO, S., LIND, M.G., LUNDBERG, R., NILSSON, P.O., 1985, Mortality of dogs associated with a bloom of the cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea, *Ophelia,* 24(2), 103-109.

EDWARDS, C., BEATTIE, K.A., SCRIMGEOUR, C.M., CODD, G.A., 1992, Identification of anatoxin-A in benthic cyanobacteria (blue-green algae) and in associated dog poisonings at Loch Insh, Scotland, *Toxicon,* 30(10), 1165-1175.

EGMOND, H. P., 2004, Natural toxins: risks, regulations and the analytical situation in Europe, *Anal Bioanal Chem,* 378, 1152–1160.

EHRENREICH, I. M., WATERBURY, J. B., WEBB, E. A., 2005, Distribution and diversity of natural product genes in marine and freshwater cyanobacterial cultures and genomes, *Appl Environ Microbiol,* 71(11), 7401-7413.

ERLICH, H.A, 1989, *PCR TECHNOLOGY*, Stockton Press, Kanada, 0-333-48984-9.

ERIKSSON, J.E., HAGERSTRAND, H., ISOMAA, B., 1987, Cell selective cytotoxicity of a peptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, *Biochim Biophys Acta*, 930(2), 304-310.

ERNST, A., 1991, Cyanobacterial picoplankton from Lake Constance. I. Isolation by fluorescence characteristics, *J. Plankton Res.,* 13: 1307-1312.

ERNST, B., HITZFELD, B., DIETRICH, D., 2001, Presence of Planktothrix sp. and cyanobacterial toxins in Lake Ammersee, Germany, and their impact on whitefish (Coregonus lavaretus L.), *Environ. Toxicol*., 16, 483–488.

FASTNER, J., ERHARD, M., CARMICHEAL, W. W., SUN, F., RINEHART, K. L., RONICKE, H., CHORUS, I., 1999, Characterization and diversity of microcystins in natural blooms and strains of the genera *Microcystis* and *Planktothrix* from German freshwaters, *Arch.Hydrobiol*., 145, 147–163.

FAY, P., 1983, The blue greens: (cyanophyta-cyanobacteria), London, *Institue of Bilogoy's studies in biology*, 071312878.

FEUILLADE, J., 1994, The cyanobacterium (blue-green alga) *Oscillatoria rubescens*, D. C. Arch. Hydrobiol. Beih., 41, 77–93.

GIULIETTI, A., OVERBERGH, L., VALCKX, D., DECALLONNE, B., BOUILLON, R., MATHIEU, C., 2001, An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression, *Methods,* 25, 386-401.

GLAZER, A. N., 1989, Light guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. *J. Biol. Chem*. 264:1-4.

GONULOL, A., COMAK O., 1992, Bafra Balık Gölleri (Balık Gölü, Uzun Göl) Fitoplanktonu üzerinde floristik Araştırmalar I. Cyanophyta, *Doğa Tr J of Botany,* 16, 223-245.

GRAHAM, J.L., JONES, J.R., JONES S.B., DOWNING, J.A., CLEVENGER, T.E., 2004, Environmental factors influencing microcystin distribution and concentration in the Midwestern United States, *Water Res,* 38:4395–4404.

GRAY, M.W., DOOLITTLE, W.F., 1982, Has the endosymbiont hypothesis been proven?, *Microbiol Rev.*, 46, 1–42.

GUGGER, M., MOLICA, R., LE BERRE, B., DUFOUR, P., BERNARD, C.,HUMBERT, J.F:, 2005, Genetic diversity of *Cylindrospermopsis* strains (Cyanobacteria) isolated from four continents, *Appl. Environ. Microbiol*., 71:1097–1100.

GUNEL, T., 2007, Gen anlatımının kantitatif analizi "Real-Time PCR", *Türkiye Klinikleri J Med Sci.,* 27, 763-767.

HAIDER, S., NAITHANI, V., VISWANATHAM, P.N., KAKKAR, P., 2003, Cyanobacterial toxins: a growing environmental concern, *Chemosphere*, 52:1-21.

HALSTVEDT, C.B., ROHRLACK, T., ANDERSEN, T., SKULBERG, O., EDVARDSEN, B., 2007, Seasonal dynamics and depth distribution of *Planktothrix* spp. in Lake Steinsfjorden (Norway) related to environmental factors, *Journal of Plankton Research,* 29(5), 471-482.

HAWKINS, P.R., NOVIC, S., COX, P., NEILAN, B.A., BURNS, B.P., SHAW, G., WICKRAMASINGHE, W., PEERAPOMPISAL, Y., RUANGYUTTIKRN, W., ITAYAMA, T., SAITOU, T., MIZUOCHI, M., INAMORI, Y., 2005, A review of analytical methods for assessing the public health risk from microcystin in the aquatic environment, *Journal of Water Supply: Research and Technology—AQUA,* 54(8), 509-518.

HUMPAGE, A. R., FENECH, M., THOMAS, P., FALCONER, I. R., 2000, Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin, *Mutat. Res.,* 472,155–161.

JACQUET, S., BRIAND, J. F., LEBOULANGER, C., AVOIS JACQUET, C., OBERHAUS, L., TASSIN, B., VINCON LEITE, B., PAOLINI, G., DRUART, J.C., ANNEVILLE, O., HUMBERT, J.F., 2005, The proliferation of the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* following restoration of the largest natural French lake (Lac du Bourget). *Harmful Algae*, 4(4), 651–672.

JONES, G.J., BLACKBURN,S.I., PARKER, N.S., 1994, A toxic bloom of *Nodularia spumigena* Mertens in Orielton Lagoon, Tasmania, *Australian Journal of Marine and Freshwater Research,* 45(5), 787 – 800.

JONES, W. W., SAUTER, S., 2005, Distribution and Abundance of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Indiana Lakes and Reservoirs [online], Indiana University, [Ziyaret Tarihi: 2 Ekim 2009].

JUNGBLUT, A.D., NEILAN, B.A:, 2006, Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria, *Arch Microbiol,* 185, 107-114.

KAEBERNICK, M., NEILAN, B.A., BOERNER, T., DITTMANN, E., 2000, Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthetic gene cluster, *Appl. Environ. Microbiol.,* 66: 3387- 3392.

KAEBERNICK, M., NEILAN, B.A, 2001, Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production, *FEMS Microbiology Ecology,* 35, 1-9.

KAMEYAMA, K., SUGIURA, N., ISODA, H., MAEKAWA, T., 2002, Effect of nitrate and phosphate concentration on production of microcystins by *Microcystis viridis* NIES-102., *Aquat Eco Health Manage,* 5, 443– 449.

KELLMANN, R., NEILAN, B. A., 2007, Biochemical characterization of paralytic shellfish toxin biosynthesis in vitro. *J. Phycol*., 43,497–508.

KELLMANN, R., MIHALI, T.K., JEON, Y.J., PICKFORD, R., POMATI, F., NEILAN, B.A., 2008, Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a saxitoxin gene cluster in cyanobacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 74(13), 4044–4053.

KISS, T., VEHOVSZKY, A., HIRIPI, L., KOVACS, A., VOROS, L., 2002, Membrane effects of toxins isolated from a cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*, on identified molluscan neurones, *Comp. Biochem. Physiol. Part C,* 131,167–176.

KOMÁREK, J., ANAGNOSTIDIS, K., 1989, Modern approach to the classification system of cyanophytes. 4. Nostocales. *Arch. Hydrobiol*., Suppl., 82, *Algol. Studies,* 56, 247–345.

KOMÁREK, J., 1992, Diversity and modern classification of Cyanobacteria (Cyanoprokaryota). İnaugural dissertation, http://www.cyanodb.cz/Anabaenopsis, [Ziyaret Tarihi: 4 Ekim 2009].

KOMAREK, J., HUBEL, M., HUBEL, H., SMARDA, J., 1993, The *Nodularia* studies. 2. Taxonomy. *Arch Hydrobiol Algol Stud,* 68, 1-25.

KOTAK, B. G., LAM, A.K.Y., PREPAS, E.E., HRUDEY, S. E., 2000, Role of chemical and physical variables in regulating microcystin-LR concentration in phytoplankton of eutrophic lakes, *Can. J. Fish. Aquat. Sci*., 57, 1584–1593.

KURMAYER, R., JUTTNER, F., 1999, Strategies for the co-existence of zooplankton with the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in Lake Zurich, *J. Plankton Res.,* 21, 659–683.

KURMAYER, R., DITTMANN, E., FASTNER, J., CHORUS, I., 2002, Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. in Lake Wannsee (Berlin, Germany), *Microbial Ecol*, 43, 107–118.

KURMAYER, R., CHRISTIANSEN, G., FASTNER, J., BORNER, T., 2004, Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp., *Environ Microbiol,* 6(8):831–841.

LANE, D. J., PACE, B.,OLSEN, G. J., STAHL, D. A.,SOGIN, M. L., PACE, N. R., 1985, Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis, *Proc. Natl. Acad. Sci*,82, 6955-6959.

LEE, S. J., JANG, M. H., KIM, H. S., YOON, B. D., OH, H. M., 2000, Variation of microcystin content of *Microcystis aeruginosa* relative to medium N:P ratio and growth stage. *J. Appl. Microbiol*. 89, 323–329.

LEHTIMAEKI, K., SIVONEN, R., LUUKKAINEN, S., NIEMELAE, S. I., 1994, The effects of incubation time, temperature, light, salinity, and phosphorus on growth and heptotoxin production by *Nodularia* strains, *Arch. Hydrobiol*., 130, 269–282.

LLEWELLYN, L.E, 2006, Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors, *Natural Product Reports,* 23, 200-222.

LOIZZIO, A., SECHI, N., VOLTERRA, L., CONTU, A., 1988. Some features of a bloom of *Oscillatoria rubescens* D.C. registered in two Italian reservoirs. *Water Air Soil Pollut*. 38, 263–271.

LUKAC, M., AEGERTER, R., 1993, Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*, *Toxicon,* 31:293–305.

LUUKKAINEN, R., SIVONEN, K., NAMIKOSHI, M., FARDIG, M., RINEHART, K.L., NIEMELA, S.I., 1993, Isolation and identification of eight microcystins from thirteen *Oscillatoria agardhii* strains and structure of a new microcystin. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 2204-9.

LUUKKAINEN, R., NAMIKOSHI, M., SIVONEN, K., RINEHART, K.L., NIEMELA, S.I., 1994, Isolation and identification of 12 microcystins from four strains and two bloom samples of *Microcystis* spp.: structure of a new hepatotoxin, *Toxicon* 32,133–139.

MACKINTOSH, C., BEATTIE, K. A., KLUMPP, S., COHEN, P., CODD, G. A., 1990, Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants, *FEBS Lett.,* 264**,** 187–192.

MANKIEWICZ, J., TARCZYNSKA, M., WALTER, Z., ZALEWSKI, M., 2003, Natural toxins from cyanobacteria, *Acta Biologica Cracoviensia,* 45(2), 9-20.

MIHALI, T.K., KELLMANN, R., MUENCHHOFF, J., BARROW, K.D., NEILAN, B.A., 2008, Characterization of the Gene Cluster Responsible for Cylindrospermopsin Biosynthesis, *Applied and Environmental Microbiology,* 74(3), 716-722.

MIHALI, T.K., KELLMANN, R., NEILAN, B.A., 2009, Characterisation of the paralytic shellfish toxin biosynthesis gene clusters in *Anabaena circinalis* AWQC131C and *Aphanizomenon sp*. NH-5 [online], *BMC Biochemistry,* http://www.biomedcentral.com/1471-1091/10/8 [Ziyaret Tarihi: 2 Ekim 2009].

MOFFITT, M. C., NEILAN, B. A., 2001a, On the presence of peptide synthetase and polyketide synthase genes in the cyanobacterial genus *Nodularia*, *FEMS Microbiol Lett.,* 196, 207-214.

MOFFITT, M. C., BLACKBURN, S. I., NEILAN, B. A., 2001b, rRNA sequences reflect the ecophysiology and define the toxic cyanobacteria of the genus *Nodularia, Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 51, 505–512.

MOFFITT, M.C., NEILAN, B.A., 2004, Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins, *Appl Environ Microbiol*, 70, 6353–6362.

MURRAY, R.K., GRANNER, D. K., MAYES, P. A., RODWELL, V. W., 2004, *Harper Biyokimya*, Nobel Tıp Kitapevi, 975-420-389.

NAMIKOSHI, M, CHOI, B.W., SAKAI, R., SUN, F., RINEHART, K.L., CARMICHEAL, W.W., EVANS, W.R., Cruz, P., Munro, M.H.G., Blunt, J.W., 1994, New nodularins: a general method for structure assignment. *Journal of Organic Chemistry*, 59, 2349-2357.

NEGRI, A.P., JONES, G.J., HINDMARSH, M., 1995, Sheep mortality associated with paralytic shellfish poisons from the cyanobacterium *Anabaena circinalis, Toxicon,* 33:1321-1329.

NEHRING, S., 1993, Mortality of dogs associated with a mass development of *Nodularia spumigena* (Cyanophyceae) in a brackish lake at the German North Sea coast, *J. Plankton Res.,* 15, 867-872.

NEILAN, B.A., 1995, Identification and phylogenetic analysis of toxigenic cyanobacteria by multiplex randomly amplified polymorphic DNA PCR. *Appl. Environ. Microbiol.,* 61, 2286–2291.

NEILAN, B. A., 1996, Detection and identification of cyanobacteria associated with toxic blooms: DNA amplification protocols, *Phycologia,* 35, 147–55.

NEILAN, B. A., JACOBS, D.,DEL DOT, T.,BLACKALL, L. L., HAWKINS P. R., COX, P. T., GOODMAN, A. E., 1997, rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis, Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 693–697.

NEILAN, B.A., DITTMANN, E., ROUHIAINEN, L., BASS, R.A., SCHAUB, V., SIVONEN, K., BORNER, T., 1999, Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria, *Journal of Bacteriology,* 181: 4089–4097.

NEILAN, B.A., PEARSON, L.A., 2008, The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk, *Elsevier,* 19, 281-288.

NICHOLS, J.M., ADAMS, D.J., CARR, N.G., WHITTON, B.A., 1982, Akinetes, The Biology of Cyanobacteria, *Blackwell Scientific Publications,* Oxford, 378-412.

NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R., OHTA, T., NISHIWAKI, S., SUGANUMA, M., KOHYAMA, K., ISHIKAWA, T., CARMICHEAL, W.W., FUJIKI, H., 1992, Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology,* 118, 420-424.

NURNBERG, G. K., LAZERTE,, B. D., 2003, An artificially induced *Planktothrix rubescens* surface bloom in a small kettle lake in southern Ontario compared to blooms world-wide, *Lake Reserv. Manage*., 19, 307–322.

OBERHOLSTER, P. J., BOTHA, A. M.,2007, Use of PCR based technologies for risk assessment of a winter cyanobacterial bloom, *African Journal of Biotechnology,* 6(15), 1794-1805.

OHTANI, I., MOORE, R. E., RUNNEGAR, M. T. C., 1992, Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*, *J. Am. Chem. Soc*., 114, 7941–7942.

OTSUKA, S., SUDA, S.,Lİ, R., WATANABE M., OYAIZU, H., MATSUMOTO, S., WATANABE, M. M., 1999, Phylogenetic relationships between toxic and nontoxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence, *FEMS Microbiol. Lett.*, 172, 15–21.

PAN, H, SONG, L., LIU, Y., BORNER, T., 2002, Detection of hepatotoxic *Microcystis* strains by PCR with intact cells from both culture and environmental samples, *Arch Microbiol,* 178, 421–427.

PFAFFL, M. W., 2001, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR, *Nucleic Acids Research,* 29(9), 2004-2007.

PITOIS, S., JACKSON, M. H., WOOD, B.J.B., 2000, Problems associated with the presence of cyanobacteria in recreational and drinking waters, *International Journal of Environmental Health Research*, 10:3, 203 – 218.

POULICKOVA, A., HASLER, P., KITNER, M., 2004, Annual cycle of *Planktothrix agardhii* (GOM.) ANAGN, & KOM. natural population, *Int. Rev. Hydrobiol*., 89, 278–288.

POURIA, S.A., BARBOSA, J., CAVALCANTI, R.L., BARRETO, V.T.S., WARD, C.J., PREISER, W., POON, G.K., NEILD, G.H., CODD, G.A., 1998, Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil, *Lancet*, 352: 21-25.

RAMBLER, M., MARGULIS, L., BARGHOORN, E.S., 1977, Natural mechanism of protection of a blue-green alga against ultraviolet light, Chemical evolution of the early Precambrian, Ponnamperuma, (ed.) *Academic Pres*:, New York, 133-141.

RANTALA, A., FEWER, D., HISBURGUES, M., ROUHIAINEN, L., VAITOMAA, J., BORNER, T., SIVONEN, K., 2004, Phylogenetic evidence for the early evolution of the microcystin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 101, 568–573.

RAPALA, J., SIVONEN, K., LUUKKAINEN, R., NIEMELAE, S. I., 1993, Anatoxin-a concentration in *Anabaena* and *Aphanizomenon* under different environmental conditions and comparison of growth by toxic and non-toxic *Anabaena*-strains - a laboratory study, *J Appl Phycol,* 5, 581-591.

RAPALA, J., SIVONEN, K., LYRA, C., NIEMELA, S. I., 1997, Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as function of growth stimuli, *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2206–2212.

RASMUSSEN, J.P., GIGLIO, S., MONIS, P.T., CAMPBELL, R. J., SAINT, C. P., 2007, Development and field testing of a real-time PCR assay for cylindrospermopsin-producing cyanobacteria, *J Appl Microbiol,*. 104(5), 1503-1515.

RESSOM, R., SOONG, F.S., FITZGERALD, J., 1993, *Health Effects of Toxin Cyanobacteria (Blue-Green Algae),* Adelaide: Univerdity of Adelaide, 28-45.

RINEHART, K. L., NAMIKOSHI, M., CHOI, B.W., 1994, Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria), *J. Appl. Phycol*, 6:159–176.

RIPPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J. B., HERDMAN, M., STAINER, R. Y., 1979, Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria, *Journal of General MicrobioZogy,* 111, 1-61.

ROUHIAINEN, L., VAKKILAINEN, T., SIEMER, B. L., BUIKEMA, W., HASELKORN, R., SIVONEN, K., 2004, Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. *Appl Environ Microbiol,* 70,686–692.

RUDI K, LARSEN F, JAKOBSEN KS, 1998, Detection of toxin-producing cyanobacteria by use of paramagnetic beads for cell concentration and DNA purification, *Appl Environ Microbiol,* 64, 34–37.

RUNNEGAR, M., BERNDT, N.; KAPLOWITZ, N., 1995a, Microcystin uptake and inhibition of protein phosphatases: effects of chemoprotectants and self-inhibition in relation to known hepatic transporters, *Toxicol. App. Pharmacol., 134,* 264-72.

RUNNEGAR, M. T., KONG, S. M., ZHONG, Y. Z., LU, S.C., 1995b, Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes, *Biochem. Pharmacol*., 49,219–225.

RUNNEGAR, M. T., XIE, C., SNIDER, B. B., WALLACE, G. A., WEINREB, S. M., KUHLENKAMP, J., 2002, In vitro hepatotoxicity of the cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin and related synthetic analogues. *Toxicol. Sci.,* 67,81–87.

SAKER, M.L., THOMAS, A.D., NORTON, J.H., 1999, Cattle mortality attributed to the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Environ. Toxicol.,* 14**,** 179–182.

SAKER, M.L., GRIFFITHS, D.J., 2001a, Occurrence of blooms of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya and Subba Raju in a north Queensland domestic water supply, *Mar. Freshwater Res.,* 52, 907–915.

SAKER, M. L., NEILAN, B. A., 2001b, Varied diazotrophies, morphologies, and toxicities of genetically similar isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (*Nostocales*, *Cyanophyceae*) from northern Australia, *Appl. Environ. Microbiol*. 67, 1839–1845.

SAKER, M.L., JUNGBLUT, A.D., NEILAN, B.A., RAWN, D.F.K., VASCONCELOS, V.M., 2005, Detection of microcystin synthetase genes in health food supplements containing the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*, *Toxicon,* 46, 555–562.

SANO, T., KAYA, K., 1998, Two new (E)-2-amino-2-butenoic acid (Dhb)- containing microcystins isolated from *Oscillatoria agardhii*, *Tetrahedron,* 54, 463–470.

SAVLI, H., HATIRNAZ, O., 2004, Sayımsal Gerçek Zamanlı-Polimer Zincir Reaksiyonu ve Hematolojik Gen Anlatım Analizleri, *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 24, 653-660.

SCHATZ, D., ESHKOL, R., KAPLAN, A., 2000, Molecular monitoring of toxic cyanobacteria, *Adv Limnol,* 55, 45–54.

SCHEMBRI, M. A., NEILAN, B. A., SAINT, C. P., 2001, Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*., *Environ. Toxicol*., 16, 413–421.

SEAWRIGHT, A.A., NOLAN, C.C., SHAW, G.R., CHISWELL, R.K., NORRIS, R.L., MOORE, M.R., SMITH, M.J., 1999, The oral toxicity for mice of the tropical cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska), *Environ. Toxicol.,* 14, 135–142.

SEVER, D.K., 2008, *Microsytis spp. de microcystin üretiminden sorumlu genlerin tespiti,* Yüksek Lisans, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

SIVONEN, K., KONONEN, K., CARMICHEAL, W.W., DAHLEM, A.M., RINEHART, K.L., KIVIRANTA, J., NIEMELA, S.I., 1989, Occurence of the hepatotoxic cyanobacterium Nodularia spumigena in the Baltic Sea and structure of the toxin. *Appl. Environ. Microb*. 55 (8), 1990–1995.

SIVONEN, K., 1990, Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Appl Environ Microbiol,* 56: 2658–2666.

SIVONEN, K., JONES, G., 1999. Cyanobacterial Toxins, In: CHORUS I, BARTRAM, J, Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, Monitoring and Management. *E. & FN. Spon*, London 41–112.

SKULBERG, O.M., CARMICHEAL, W.W., CODD, G.A., SKULBERG, R., 1993, Taxonomy of toxic Cyanophyceae (Cyanobacteria), *Norwegian Institute for Water Research*, 0-12-247990-4, 145-163.

STOTTS, R.R., NAMIKOSHI, M., HASCHEK, W.M., RINEHART, K.L., CARMICHEAL, W.W., DAHLEM, A.M., BEASLEY, V.R, 1993; Structural modifications imparting reduced toxicity in microcystin from *Microcystis* spp., *Toxicon,* 31(6), 783-789.

SUTHERLAND, J.M., REASTON, J., STEWART, W.D.P., HERDMAN, M., 1985, Akinetes of the Cyanobacterium Nostoc PCC 7524: morphological changes during synchronous germination, *Journal of General Microbiology,* 131, 2855-2863.

TILLETT, D., DITTMANN, E., ERHARD, M., DOHREN, H., BORNER, T., NEILAN, B.A., 2000a, Structural organization of microcystin biosynthesis in Microcystis aeruginosa PCC7806: an integrated peptide polyketide synthetase system, *Chemistry and Biology,* 7(10), 753-764.

TILLETT, D., NEILAN, B. A., 2000b, Xanthogenate nucleic acid isolation from cultured and environmental cyanobacteria, *J. Phycol,* 35, 1–8.

TILLETT, D., PARKER, D. L., NEILAN, B. A., 2001, Detection of toxigenicity by a probe for the microcystin synthetase A gene (*mcyA*) of the cyanobacterial genus *Microcystis*: comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (phycocyanin intergenic spacer) phylogenies. *Appl. Environ*. *Microbiol*., 67, 2810–2818.

UTKILEN, H., GJOLME, N., 1992, Toxin production by *Microcystis aeruginosa* as a function of light in continuous cultures and its ecological significance, *Appl Environ Microbiol*., 58: 1321-1325.

VAITOMAA, J., RANTALA, A., HALINEN, K., ROUHIAINEN, L., TALLBERG, P., MOKELKE, L., SIVONEN, K., 2003, Quantitative real-time PCR for determination of microcystin Synthetase E copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes, *Appl Environ Microbiol*, 69(12), 7289–7297.

VAN DEN HOEK, C., MANN, D.G., JAHNS, H.M., 1995, Algae: an introduction to phycology, *Cambridge University Press,* İngiltere, 0521 316871.

VAN DER WESTHUIZEN, A.J., ELOFF, J.N., 1985, Effect of temperature and light on the toxicity and growth of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (UV-006), *Planta,* 163, 55–59.

VEZIE, C., RAPALA, J., VAITOMAA, J., SEITSONEN, J., SIVONEN, K., 2002, Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and nontoxic Microcystis strains and on intracellular microcystin concentrations, *Microb. Ecol*., 43 (4), 443–454.

WALSBY, A.E., AVERY, A., SCHANZ, F., 1998, The critical pressures of gas vesicles in *Planktothrix rubescens* in relation to the depth of winter mixing in Lake Zurich, Switzerland, *J. Plankton Res*., 20, 1357-1375.

WATANABE, M.F., OISHI, S., 1985, Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* under culture conditions., *Appl. Environ. Microbiol*., 49, 1342.

WATANABE, M.F., HARADA, K., CARMICHEAL, W.W., FUJUKI, H., 1996, *Toxic Microcystis,* CRC Press, Florida, 0-8493-7693-9.

WELKER, M., DOHREN, H.V., 2006, Cyanobacterial peptides Nature's own combinatorial biosynthesis, *FEMS Microbial REV.,* 30: 530-563.

WHITTON, B.A, POTTS, M., 2000, *The Ecology of Cyanobacteria-Their Diversity in Time and Space*, Kluwer Academic Publisher, USA, 0-306-46855-7.

WILMOTTE, A., 1994. Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria, p. 1–25. *In* BRYANT, D. A., (ed.), *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1385-0237.

WILSON, H., 1991, Cloning and sequence analysis of the phycocyanin genes of the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH7803, *Plant Molecular Biology,* 17(4), 931-933.

WOESE, C. R., 1987., Bacterial evolution. *Microbiol. Rev*. 51, 221-271.

WOLK, C.P, KRAUS, J., 1982, Two approaches to obtaining low, extracellular deoxyribonuclease activity in cultures of heterocyst-forming cyanobacteria, *Archives of Microbiology,* 131 (4), 302-307.

WONG, B. S. F., LAM, P. K. S., XU, L. H., ZHANG, Y. Y., RICHARDSON, B. J., 1999, A colorimetric assay for screening microcystin class compounds in aquatic systems, *Chemosphere*, 38, 1113–1122.

YOSHIDA, T., YUKI, Y., LEİ, S., CHINEN, H., YOSHIDA, M., KONDO, R., HIROISHI, S., 2003, Quantitative detection of toxic strains of the cyanobacterial genus *Microcystis* by competitive PCR, *Microb Environ,* 18, 16–23.

ZURAWELL, R.W., CHEN, H., BURKE, J.M., PREPASS, E.E., 2005, Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments, *Journal of Toxicology and Environmental Health,* 8, 1-37.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında İstanbul'da doğdum. İlk ve orta öğretimimi Şehit Pilot Muzaffer Erdönmez İlköğretim Okulu'nda, lise eğitimimi Osman Ülkümen Lisesi'nin yabancı dil ağırlıklı bölümünde tamamladım. 2002 yılında girdiğim İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'nden 2007 yılında mezun oldum. Aynı yıl İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Su Ürünleri Temel Bilimler Anabilim Dalı, İç sular Biyolojisi Programı'nda Yüksek Lisans eğitimime başladım.