

**PORSUK ÇAYI VE
SEYDİSUYU'NDA BULUNAN
CYANOBACTERİ'LERİN
KARAKTERİZASYONU**

Meral YILMAZ
Doktora tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Aralık 2009

**Bu tez alışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 051008**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Meral YILMAZ'ın “Porsuk Çayı ve Seydisuyu’nda Bulunan Cyanobacteri’lerin Karakterizasyonu” başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Doktora Tezi 03/08/2009 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) : Prof. Dr. MERİH KIVANÇ
Üye : Prof. Dr. KIYMET GÜVEN
Üye : Prof. Dr. BELMA ASLIM
Üye : Yard. Doç. Dr. NALAN SARIÖZLÜ
Üye : Yard. Doç. Dr. BUKET KUNDUHOĞLU

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

PORSUK ÇAYI VE SEYDİSUYU'NDA BULUNAN CYANOBACTERİ'LERİN KARAKTERİZASYONU

Meral YILMAZ

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Merih KIVANÇ
2009, 170 sayfa

Bu çalışmada Porsuk Çayı ve Seydisuyu'nda bulunan Siyanobakteri'lerin karakterizasyonu amaçlanmıştır.

Porsuk Çayı'na ait 21, Seydisuyu'na ait olan 5 farklı istasyondan ve Eti-Boraks İşletmesine ait olan bor atık havuzundan 2006 yılı boyunca örnekleme yapılmıştır. BG-11 besiyeri kullanılarak 141 adet Siyanobakteri izolatu elde edilmiştir. Elde edilen izolatların mikroskopik analizleri yanında bu izolatlardan elde edilmiş olan genomik DNA ekstraksiyonu sonrasında 16S rRNA PCR ile çoğaltılarak moleküler tanımlama da yapılmıştır.

Porsuk Çayı, Seydisuyu ve Bor havuzundan Ekim 2006'da alınan su örneklerinden ise kültür bağımsız testlerle komünite analizine yönelik çalışmalar olan Denatüre edici gradient jel elektroforezi (DGGE) ve 16S rRNA klonları ile gen kütüphanesi oluşturulması metodları uygulanmıştır. Yapılan bu mikroskopik ve moleküler çalışmalar ile Porsuk Çayı ve Seydisuyu'nda bulunan Siyanobakterileri kompozisyonu ilk kez ortaya konmuştur.

Kültürel yöntemler ile Porsuk Çayı'nda *Synechococcus*, *Cyanobium*, *Anabaenopsis*, *Leptolyngbya*, *Microcoleus*, *Pseudanabaena*, *Synechocystis*, *Oscillatoria*, *Snowella*, *Nostoc*, *Phormidium* ve *Limnothrix* cinslerine ait izolatlar, Seydisuyu'ndan *Pseudanabaena*, *Anabaenopsis*, *Leptolyngbya*, *Phormidium*, *Synechocystis* ve *Nostoc* genuslarına ait izolatlar Bor havuzundan ise sadece *Leptolyngbya* cinsine ait izolatlar elde edilmiştir.

16S rRNA gen sekansı BLAST sonuçlarına dayalı olarak DGGE yöntemi ile Porsuk Çayı 100 no'lu istasyondan *Arthrospira*, *Lyngbya*, *Planktothricoides*, *Microcystis* genuslarına ait sekanslar, Seydisuyu'ndan *Cyanobacterium*, *Lyngbya*, *Nostoc* ve *Phormidium* genuslarına ait sekanslar, Bor havuzundan ise *Nostoc*, *Phormidium*, *Arthrospira*, *Phormidium*, *Planktothricoides* genuslarına ait sekanslar klonlama yöntemi ile *Leptolyngbya*, *Merismopedia*, *Nostoc* genuslarına ait olan sekanslar elde edilmiştir. Ayrıca BLAST ve filogenetik analiz sonuçlarına göre Seydisuyu ve bor havuzu'ndan çoğu henüz tanımlanamamış sekansları içeren DGGE bantları ve klonlar elde edilmiştir. Bu nedenle Seydisuyu ve Bor havuzunda yeni Siyanobakteri türleri olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Porsuk Çayı, Seydisuyu, Siyanobakteri, DGGE (Denature Edici Gradient Jel Elektroforezi), 16S rRNA gen kütüphanesi

ABSTRACT**PhD Dissertation****CHARACTERIZATION OF CYANOBACTERIA WHICH ARE
FOUNDED IN PORSUK RIVER AND SEYDISUYU****Meral YILMAZ****Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program****Supervisor: Prof.Dr. Merih KIVANÇ
2009, 170 pages**

This study focused on the characterization of Cyanobacteria founded in Porsuk River and Seydisuyu.

The sampling was performed during year 2006 from 21 different stations in the Porsuk River and 5 different stations in the Seydisuyu and boron waste pool of Etibor Establishment. 141 Cyanobacterial isolates were obtained with BG-11 medium. In addition to microscobic analysis, molecular analysis also was applied for identification of Cyanobacterial isolates by using 16S rRNA PCR amplification of genomic DNA.

Water samples collected from Porsuk River, Seydisuyu and boron waste pool at 2006 October were analysed by using culture independent methods such as denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and 16S clone library. Cyanobacterial composition found in Porsuk River and Seydisuyu was shown for the first time by using microscopic and molecular studies.

With the cultural methods, strains belong to *Synechococcus*, *Cyanobium*, *Anabaenopsis*, *Leptolyngbya*, *Microcoleus*, *Pseudanabaena*, *Synechocystis*, *Oscillatoria*, *Snowella*, *Nostoc*, *Phormidium*, and *Limnothrix* genera in Porsuk River and *Pseudanabaena*, *Anabaenopsis*, *Leptolyngbya*, *Phormidium*, *Synechocystis* and *Nostoc* genera in Seydisuyu were obtained. The isolates belong to only *Leptolyngbya* genus was obtained from boron waste pool.

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) fingerprint analysis based on BLAST results of 16S rRNA gene sequences based on the revealed that Porsuk River water sample may have species from *Arthrospira*, *Lyngbya*, *Planktothricoides*, *Microcystis* genera, Seydisuyu water sample have *Cyanobacterium*, *Lyngbya*, *Nostoc*, *Leptolyngbya* and *Phormidium* genera where the boron pool water samples have representative species from *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Phormidium*, *Arthrospira*, *Planktothricoides*, *Aphanothece*, and *Leptolyngbya* genera. With the cloning method *Leptolyngbya*, *Merismopedia*, *Nostoc* genera were obtained from boron pool. Phylogenetic and BLAST analysis of some representative partial sequences indicates that most of the 16S rRNA sequences were under currently unavailable nucleotide sequence databases. As a result, we conclude that novel Cyanobacterial species may be present in Seydisuyu and boron pool.

Keywords: Porsuk River, Seydisuyu, Cyanobacteria, DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), 16S rRNA gen library

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın başlangıcından bitimine kadar, deneyimi ve bilgisi ile her türlü desteği sağlayan ayrıca kendimi geliştirmem için yurt dışı eğitim konusunda her türlü katkılarını benden esirgemeyen ve en iyiyi başarma yönündeki tutumuyla her zaman örnek aldığım değerli danışman hocam Prof. Dr. Merih KIVANÇ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme komitesinde bulunan sayın hocalarım Prof.Dr.Kıymet GÜVEN ve Prof.Dr.Savaş KOPARAL'a verdikleri destek nedeniyle teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın gerçekleştirilmesinde su örneklerinin alınabilmesi için gerekli olan tüm olanakları sağlayan Eskişehir Devlet Su İşleri personeline teşekkürlerimi sunarım.

Erasmus öğrenci değişim programı ile 6 aylık süre ile eğitim aldığım Liege Üniversitesi/Belgium'da çalışmalarımın tamamlanmasını sağlayan ve laboratuvarındaki tüm olanakları kullanmamı sağlayan Dr. Annick Wilmotte'ye ve oradaki çalışmalarım sırasında bana her türlü yardımı gösteren çalışma arkadaşım Cedric Lessence'ye teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım süresince gösterdikleri yardım ve dayanışmalarından ötürü mikrobiyoloji laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Tüm çalışmam süresince her türlü maddi ve manevi desteği sağlayan değerli aileme gösterdikleri sabır ve anlayıştan ötürü teşekkür ederim.

Meral Yılmaz

Aralık 2009

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Porsuk Çayı ve Seydisuyu.....	3
1.2. Siyanobakteriler	4
1.2.1. Siyanobakterilerin Ekolojisi.....	6
1.2.2. Siyanobakterilerin Morfolojisi	9
1.2.3. Siyanobakterilerin Hücre Yapıları	10
1.2.3.1. Glikokaliks, Hücre Duvarı ve Plazma Membranı	10
1.2.3.2. Tilakoit Membranlar	12
1.2.3.3. Sitoplazmik Yapılar	14
1.2.4. Siyanobakterilerdeki Özelleşmiş Hücreler ve Farklılaşma	15
1.2.4.1. Heterosistler	15
1.2.4.2. Akinete	18
1.2.4.3. Hormogonia	18
1.2.4.4. Termini.....	19
1.2.5. Siyanobakterilerin Fizyolojisi	19
1.2.6. Siyanobakteriyel Bloomlar	22
1.2.7. Siyanotoksinler.....	23
1.2.8. Siyanobakterilerin Moleküler Evrimi ve Taksonomisi	25
1.2.8.1. Siyanobakteriler ile Kemotaksonomik Çalışmalar	33
1.2.8.2. Siyanobakteriler ile Makromoleküler Çalışmalar	34
1.2.9. Siyanobakterilerin Biyoteknolojideki Potansiyel Uygulamaları	38

2. MATERYAL VE METOD.....	42
2.1. Materyal	42
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Su Örnekleri	42
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri	43
2.1.2.1. BG-11	43
2.1.2.2. BG-11 ₀	44
2.1.2.3. Microelements A.....	44
2.1.2.4. Luria Bertani (LB) Besiyeri	45
2.1.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler	45
2.1.3.1. TAE 50X (1L için).....	45
2.1.3.2. Filtreler İçin Lizis Tamponu	45
2.1.3.3. TE ⁻⁴ Tamponu	46
2.1.3.4. %0 Denature Edici DGGE Stok Solüsyonu.....	46
2.1.3.5. %100 Denature Edici DGGE Stok Solüsyonu.....	46
2.1.3.6. %10 Amonyum Persülfat Solüsyonu	46
2.1.3.7. %10 SDS Solüsyonu	47
2.1.3.8. Sal-EDTA solüsyonu	47
2.1.3.9. Çalışmada Kullanılan Primerler.....	47
2.1.3.10. Çalışmada Kullanılan Markırlar.....	48
2.2. Metod	49
2.2.1. Su Örneklerinin Toplanması	49
2.2.2. Su Örneklerinin Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	49
2.2.3. Su Örneklerinden Siyanobakteri İzolasyonu ve Kültüre Alınması	49
2.2.4. İzolatların İdentifikasyonu	50
2.2.4.1. İzolatların Mikroskopik Analizi.....	50
2.2.4.2. İzolatların Moleküler İdentifikasyonu.....	50
2.2.5. Siyanobakteriyel Kommünite Analizleri.....	55
2.2.5.1. Su Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu	55
2.2.5.2. Ribozomal DNA'nın Klonlanması.....	57
2.2.5.3. Elde Edilen Klonların Amplified Ribosomal DNA Restriction Analizi (ARDRA).....	64

2.2.5.4. Denature Edici Gradient Jel Elektroforezi (DGGE).....	64
2.2.5.5. Sekans Verilerinin Analizi	69
3. BULGULAR	71
3.1. Su Örneklerinin Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	71
3.2. Su Örneklerinden Siyanobakteri İzolasyonu ve Kültüre Alınması.....	75
3.3. İzolatların İdentifikasyonu	78
3.3.1. İzolatların Mikroskopik Analizi.....	78
3.3.2. İzolatların Moleküler İdentifikasyonu	81
3.3.2.1. 16S rRNA geni Amplifikasyonu İçin İzolatlardan DNA Ekstraksiyonu	81
3.3.2.2. 16S rRNA + ITS + 5' 23S rRNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) İle Amplifikasyonu.....	81
3.3.2.3. Elde edilen İzolatların 16S rRNA + ITS + 5' 23S rRNA'nın Amplified Ribosomal DNA Restriction Analizi (ARDRA).....	83
3.4. Siyanobakteriyel Kommünite Analizleri.....	97
3.4.1. Su Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu	97
3.4.2. Klon Kütüphanesi Oluşturulması (Ribozomal DNA'nın Klonlanması, Klonların Seçimi ve Klonlardan Dizi Analizleri)	97
3.4.3. Denature Edici Gradient Jel Elektroforezi (DGGE)	114
3.4.4. "Chimera" Analiz Sonuçları	123
3.4.5. Filogenetik Ağacın Elde Edilmesi	128
4. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER	134
KAYNAKLAR	161

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1.	16S rRNA alt ünitesine göre üç temel evrimsel grup	4
1.2.	Siyanobakteriyel bir hücrenin dış yüzeyinin bir modeli	11
1.3.	Fikobilizomların yapısı ve absorbe ettikleri dalga boyları.....	13
1.4.	Siyanobakteriyel bir hücrenin diagramatik şekli.....	15
1.5.	Heterosist yapısı.....	17
1.6.	Akinete yapısı	18
2.1.	pCR®2.1-TOPO Vektörü	60
2.2.	Topoisomerase I enziminin PCR Ürünü ile Etkileşimi.....	61
2.3.	Karışık mikrobiyal populasyonlardan Siyanobakteriyel çeşitliliğin belirlenmesinde kullanılmış olan moleküler yaklaşımların basamakları	70
3.1.	Seçilen bazı izolatların agar üzerindeki görüntüleri.....	77
3.2.	Seçilen bazı izolatların mikroskopik görüntüleri	80
3.3.	16S rRNA + ITS + 5' 23S rRNA geni amplifikasyon ürünleri	82
3.4.a.	Elde edilen izolatların ARDRA jeli (1) (MspI)	84
3.4.b.	Elde edilen izolatların ARDRA jeli (2) (MspI)	85
3.4.c.	Elde edilen izolatların ARDRA jeli (3) (MspI)	86
3.5.	fA1 ve fB1 filtrelerine ait olan PCR ürünleri.....	98
3.6.	fB1 örneğinden klonlama için elde edilen PCR ürünlerinin ardışık saflaştırmaları.....	99
3.7.	fA1'den elde edilen klonların seçimi için insert büyüklüklerinin kontrolü amacıyla yapılan PCR sonrası elde edilen jeller	100
3.8.	fA1'den elde edilen klonların Amplified Ribosomal DNA Restriction Analizi (ARDRA) PCR ürünleri	108
3.9.a.	DGGE (a1): 378 F_23S30R primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü.....	114
3.9.b.	DGGE (a2): 378 F_781RGC (a2) primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü.....	115
3.9.c.	DGGE (b1): 378 F_23S30R primerleri kullanılarak yapılan	

PCR sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü.....	115
3.9.d. DGGE (b2): 378 F_781RGC primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü.....	116
3.10.a. DGGE a2 reaksiyonu ile elde edilen jel görüntüsü.....	117
3.10.b. DGGE b2 reaksiyonu ile elde edilen jel görüntüsü.....	118
3.11. DGGE jelinden kesilen bantların yeniden amplifikasyonu ile elde edilen agaroz jel görüntüsü.....	119
3.12. Bellerophon analiz sonucu	123
3.13.a. Elde edilen izolatların filogenetik ilişkisi	129
3.13.b. Elde edilen klonların filogenetik ilişkisi	130
3.13.c. Elde edilen DGGE bantlarının filogenetik ilişkisi	131
3.13.d. Elde edilen izolatlar, klonlar, DGGE bantları ve gen bankasından seçilen en yakın ilişkili sekansların filogenetik analizi.....	132

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1.	Siyanotoksinlerin etkileri ve semptomları	24
2.1.	Porsuk çayı ve Seydisuyu üzerindeki istasyon isim ve numaraları....	42
2.2.	Çalışmada kullanılan primerler	47
2.3.	Kommunité analizi için alınan örnekleme bölgeleri ve kodları	56
2.4.	Ligasyon reaksiyonu	61
2.5.	DGGE için PCR koşulları	65
2.6.	DGGE jel için stok solüsyonlar	66
2.7.(a).	Denature edici jel solüsyonu	67
2.7.(b).	Yükleme jeli	67
3.1.a.	Porsuk üzerindeki istasyonların analiz edilen kimyasal parametre sonuçları (yıllık ortalama).....	73
3.1.b.	Seydisuyu üzerindeki istasyonların ve bor havuzunun analiz edilen kimyasal parametre sonuçları (yıllık ortalama)	74
3.2.	İzolatların ARDRA profil grup numaraları.....	87
3.3.	İzolatların 16S rRNA + ITS + 5' 23S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu ile elde edilen BLAST analiz sonuçları	90
3.4.1.	İzolat numaraları, izolatların tek hücreli (u) ya da filamentöz özellikleri, örnekleme yapılan tarihler, örnekleme bölgelerinin kodları ve ARDRA jel sonucunda elde edilen grup numaraları ve identifikasyon sonuçları	92
3.4.2.	Elde edilen izolatların istasyonlara göre morfolojik dağılımları.....	96
3.5.	fA1 ve fB1 örneklerinden elde edilen beyaz ve mavi kolonilerin sayısı	100
3.6.	fA1 ve fB1 filtrelerinden elde edilen klonların ARDRA grup profil numaraları	109
3.7.	fA1 ve fB1 filtrelerinden elde edilen temsili olarak seçilmiş olan klonların BLAST sonuçları	111
3.8.	Düşük benzerlik yüzdesine sahip olan klonların	

	iki kısım halindeki BLAST sonuçları	113
3.9.	DGGE bantlarına ait olan BLAST sonuçları	120
4.1.	Kültüre alınabilen bakterilerin toplam hücre sayısı ile karşılaştırması	136
4.2.	Porsuk Çayı, Seydisuyu ve bor havuzundan elde edilen kültüre alma, klonlama ve DGGE identifikasyon sonuçları	156

1. GİRİŞ

Siyanobakteriler morfolojik açıdan çeşitli fototrofik bakterilerden oluşan oldukça geniş bir grubu içermektedir. Siyanobakterileri mor ve yeşil anoksifototroflardan ayıran, onların oksijenik fototroflar olmalarıdır. Bu grup, bakteriler içerisindeki en büyük alemlerden biridir. Bu canlılar evrimsel açıdan büyük öneme sahiptir çünkü onların Dünya üzerinde ilk oksijen oluşturan fototrofik organizmalar olduğu, bu sayede de Dünya atmosferinin oksijensiz (anoksik) halden oksijenli (oksik) hale geçtiği düşünülmektedir. Siyanobakteriler' de sadece bir çeşit klorofil bulunmaktadır (klorofil a). Ayrıca, hepsinde fikobilin (phycobilin) adı verilen karakteristik bir pigment çeşidi bulunmaktadır. Fikobilinlerin, fikosiyanin (phycocyanin) adı verilen bir sınıfı mavi renklidir ve yeşil renkli klorofil pigmentleriyle birlikte bu canlılara mavi-yeşil renk verirler. Siyanobakteriler'de beslenme oldukça basittir. Vitamin ihtiyaçları yoktur, azot (N) kaynağı olarak nitrat ya da amonyağı kullanmaktadırlar. Bazı mavi-yeşil bakteri türleri, fotosenteze ilave olarak azot fiksasyonu (bağlaması) da yapmaktadırlar. Siyanobakterilerin çoğu nörotoksin üretme yeteneğine sahiptir ve bu toksinlerin bulunduğu suyu içen herhangi bir canlı hızla ölebilir. Ayrıca Siyanobakteriler toprağa has kokunun oluşmasını sağlayan bakteri gruplarından biridir (Whitton ve Potts 2000; Rai ve ark. 2002).

Siyanobakterileri tanımlamada kullanılan geleneksel teknikler, mikroskopik incelemelere dayanmaktadır, fakat bu teknikler mikrobiyal çeşitliği tanımlamak için doğru bir yaklaşım sağlamamaktadır. Genetik sekansa dayalı identifikasyon metotları bakteriyel popülasyonları tanımlama olanaklarını arttırmıştır. Özellikle 16S rRNA genindeki varyasyonlar mikroorganizmalar arasındaki filogenetik ilişkileri anlamayı sağlamıştır (Bryant 1994).

Eskişehir ilinin ortasından geçen Porsuk Çayı, kenti ikiye bölmektedir. Eskişehir Şeker Fabrikası pancar yıkama sularının büyük bir kısmını Porsuk Çayından karşılamaktadır. Porsuk Çayı pek çok evsel ve endüstriyel atıklar için alıcı ortam oluşturmakta ve bu tür atıklar Porsuk Çayının su kalitesini önemli ölçüde değiştirmektedir. Eskişehir ilinin içme ve kullanma suyu Porsuk Çayı'ndan karşılanmaktadır (<http://tr.wikipedia.org/wiki/Porsuk>).

Seydisuyu ise Seyitgazi ilçesinin Kırka bucağı civarından çıkmakta, Kumarcıadası civarında Sakarya'ya karışmaktadır. Seydisu, Etibor Kırka Boraks İşletmesi'nin atıkları ve tarımsal faaliyetler ile kirlenmektedir. Eskişehir-Seyitgazi yöresi boraks yönünden zengin bir havzadır. Bu nedenle 1972 yılından beri Eubank Boraks İşletmesi, bu bölgede bor cevheri işlemektedir. Eskişehir-Seyitgazi sulama şebekesinin başlıca su kaynağı olan Seydisuyu ve Seydisuyu'nun iki ayrı kolu üzerinde, DSI' nin inşa etmiş olduğu sulama amaçlı Kunduzlar ve Çatören Barajları da bu havza içerisindedir. Bilindiği üzere bor iyonu, yaşayan organizmalar üzerinde zehirli etkiler yapmakta, suda yaşayan canlılara zehirli etkisi ile çok büyük zararlar verebilmektedir (Uygan ve Çetin 2004).

Eskişehir içme ve sulama suyu olarak önem taşıyan Porsuk Çayı ve bölgenin sulama suyu ihtiyacını karşılayan Seydisuyu'ndaki Siyanobakteri çeşitliliği konusunda yapılmış detaylı bir çalışmanın bulunmaması nedeniyle farklı iki bölgedeki su kaynağının Siyanobakteri kompozisyonunun belirlenerek karşılaştırması amaçlanmıştır.

1.1. Porsuk Çayı ve Seydisuyu

Sakarya Nehri'nin bir kolu olan Porsuk Çayı havzası Kuzeybatı Anadolu da 11188 km²'lik bir alanı kapsamaktadır. Porsuk Çayı iki koldan oluşmuştur. Birinci kolunun kaynağı Murat Dağı'ndadır. Altıntaş havzasında hafif meyilli bir arazide akar. Diğer kol, Kütahya'nın batısından gelir. Bunlar Çukurova'da birleşirler. Eskişehir il sınırında, sırasıyla Kunduzlar, Kargın Deresi, Ilıcasu, Mollaoğlu Deresi, Sarısu, Keskin-Muttalip dereleriyle birleşerek, Sakarya Nehri'ne yaklaşırken de Pürtek Çayı'nı içine alır.

Porsuk Çayı'nın en önemli kirletici kaynakları arasında Altıntaş Ovası içerisinde yer alan ilçe belediyelerinin (Altıntaş İlçesi ve Aslanapa ilçesi) sanayi ve evsel atık suları, Kütahya İl Merkezinin Evsel nitelikli atık suları, Kütahya–Eskişehir kara yolu üzerinde bulunan sanayi kuruluşları ve Tarımsal kökenli kirleticiler yer almaktadır

(<http://www.kutahya-cevreorman.gov.tr/duyuru/7/7.html>).

Porsuk Barajı, Porsuk Çayı üzerindedir. Şehrin su taşkınlarını önlemek, sulama ve kullanma suyunu temin amacıyla yapılmıştır. Ayrıca burası balık üretimi ve mesire yeri olarak da kullanılmaktadır. Porsuk Baraj Gölü 1990'lı yıllarda Bakanlar Kurulu tarafından Eskişehir ilinin içme ve kullanma suyunu temin etmek amacıyla içme ve kullanma suyu rezervuarı ilan edilmiştir (<http://www.eskisehir.gov.tr/akarsuvebarajlar.asp>).

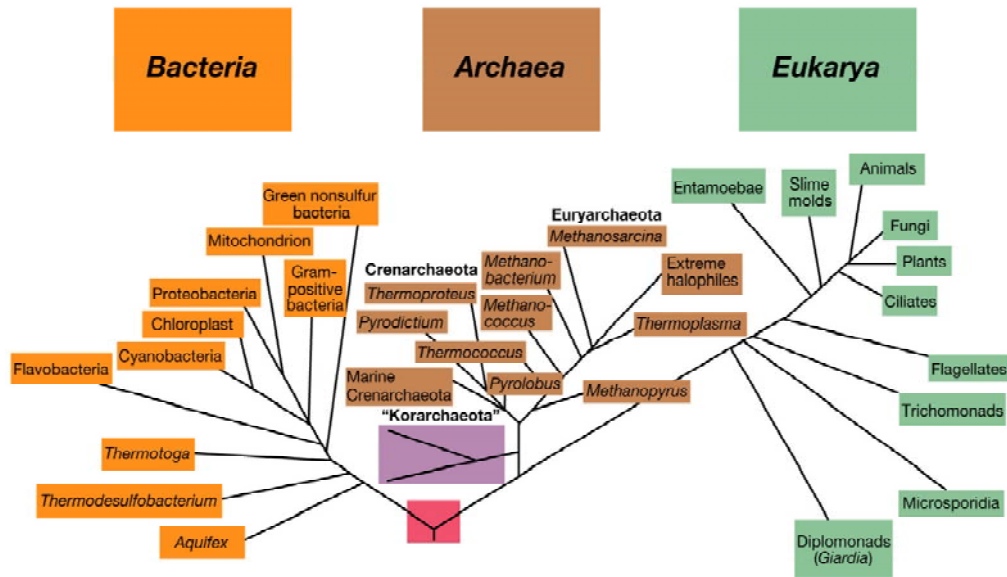
Seydisuyu, Seyitgazi ilçesinin Kırka bucağı civarından çıkmaktadır. Uzunluğu 107 km. ve drenaj alanı 1800 kilometrekare olan bu akarsuyun taşkın debisi 38 metreküp /saniyedir. Mart aylarında kar sularının da etkisiyle yükselmekte yaz aylarında ise çevredeki sulamalarında etkisi ile akışı tamamen durmaktadır (http://www.mahmudiye.gov.tr/m_c_dur.php).

Eskişehir-Kırka Türkiye'deki en önemli bor rezervlerinden birisidir. Bor, tüm dünya için önemli olan ve geleceğin petrolü olarak nitelendirilebilecek bir madendir. Ülkemizin de en önemli yeraltı zenginliklerinden biri belki de en önemlisi ve tek stratejik önemi olan doğal kaynaklardan birisidir. Bu nedenle maden ihraç ürünleri arasında birinci sırada yer almaktadır. Bor, tabiatta daha çok bileşikler halinde (boroksit, boraks, kalemanit, kernit v.b.) bulunmaktadır. Sularda

ve tabii kaynaklarda borik asit (H_3BO_3) halinde çok yaygındır. Bor, toprakta da özellikle borik asit (H_3BO_3) ya da borat (BO_3) olarak bulunur. Ülkemizde sulama sularını en çok kirleten toksik elementlerin başında bor gelmektedir. Doğal olarak sulama sularının tümünde bor bulunur ancak, derişimi çok düşüktür. Bor, yeraltı suyunda doğal olarak, yüzey sularında endüstriyel kirletici olarak veya tarımsal yüzey akışların ve çürüten bitki materyallerinin bir ürünü olarak bulunabilmektedir (Uygan ve Çetin 2004).

1.2. Siyanobakteriler

Siyanobakteriler eubacteria domaini içerisinde yer alırlar (Şekil 1.1). 16S rRNA gen sekans analizine göre bu kümenin dalları daha çok Gram-pozitif bakteriler ile yakın ilişkilidir, özellikle *Clostridium* sp. ve *Bacillus* sp. içeren düşük G + C grubu ile benzerlik göstermektedir (Castenholz 1992).



Şekil 1.1. 16S rRNA alt ünitesine göre üç temel evrimsel grup (Madigan ve ark. 2003).

Fosil bulguları, Siyanobakterilerin Precambrian dönemi boyunca coğrafik olarak farklı çevrelerde bulunduğunu desteklemektedir (Whitton ve Potts 2000). Archaean ve Proterozoic dönem süresince oksijen atmosferi Siyanobakteriler tarafından oluşturulmuştur (Peschek ve ark. 1999).

Birçok Proterozoic yağ depoları Siyanobakterilerin aktivitesi ile ilişkilendirilmektedir. Ayrıca, pirinç ve fasulyenin kültüre alınmasında azot fiksasyonunu sağlamaları bakımından önem taşırlar. Evrim akışının ve dünya tarihi süresince oluşan ekolojik değişimin şekillenmesinde oldukça önemlidirler.

Siyanobakteriler birçok sucul ve karasal ekosistemlerin temel bileşenlerindedir. Tatlı su ve deniz çevreleri, tuzlu göller, sıcak sular, çöller ve buzlar gibi çeşitli habitatlarda bulunmaktadır (Ward ve ark. 2006). Siyanobakterilerin ekolojik açıdan başarısı uzun evrimsel geçmişleri ile ilişkilendirilmektedir. Düşük oksijen koşullarına tolerans gösterebilmeleri, suya ilave olarak bir hidrojen vericisi olan H₂S kullanabilme yetenekleri, yüksek dozda ultraviyole ışınlarına ve radyasyona dirençli olmaları bu organizmaların erken evrimleşmelerinde çok önemli bir rol oynamıştır (Whitton ve Potts 2000).

Siyanobakteriler morfolojik özelliklerine göre 5 bölüm içerisinde sınıflandırılmışlardır:

Chroococcales (I), Pleurocapsales (II), Oscillatoriales (III), Nostocales (IV) ve Stigonematales (V) (Ripka et al., 1979). Chroococcales, Pleurocapsales ve Oscillatoriales'e ait üyeler polifiletik orjinli, Nostocales ve Stigonematales ise monofiletik orjinli olarak bildirilmektedir (Ishida ve ark. 2001).

Son zamanlarda yeni potansiyel ilaç kaynakları olması bakımından Siyanobakterilere olan ilgi artmaktadır. Siyanobakteriler alkaloidler, poliketidler ve nonribozomal peptidleri içeren biyoaktif sekonder metabolitlerin zengin bir kaynağını oluşturmaktadır (Carmichael 1992; Erhard ve ark. 1997).

Siyanobakterilerin diğer önemli özelliklerinden birisi de bitkilerin orijini oluşturmalarıdır. Kloroplastlar aslında bitki hücrelerinin içinde yaşayan bir Siyanobakteridir. Bazen geç Proterozoic ya da erken Cambrian da, Siyanobakteriler bazı ökaryotik hücrelerin içinde ökaryotik hücreye besin sağlayarak yer almışlardır. Bu durum endosimbioz ve aynı zamanda da ökaryotik mitokondrilerin orijini olarak bilinmektedir (Whitton ve Potts 2000).

Prochlorophytes (Oxychlorobacteria)'e olan ilgi esasen kloroplast evrimine dayalı olan endosimbioz teorisi ile desteklenmiştir. Bu tipteki ilk organizma *Prochloron didemni*'dir. Oksijenik fotosentez yapan, klorofil a ve b içeren bir prokaryot olarak tanımlanmaktadır. Bu iki pigmentin kombinasyonu o zamana

kadar sadece Chlorophyte kloroplastlarının karakteristiği olmuştur. Prochlorophyte'ler bundan dolayı kloroplastlardan orijinlenen potansiyel endosimbiontlar olarak tanımlanmıştır. *Prochloron* sp., den önce, Siyanobakteriler oksijenik fotosentezi gerçekleştirdiği bilinen tek prokaryotlardır. Bu nitelikli özellikten dolayı, kloroplastların orijini endosimbiyotik Siyanobakteriler ile ilişkilendirilmiştir. Daha fazla prochlorophyte türünün keşfedilmesini takiben (örneğin *Prochlorothrix hollandica*, *Prochlorococcus marinus*), birçok alandaki araştırma sonuçları prochlorophyte'ler ve yeşil kloroplastlar arasındaki tahmin edilen ilişkinin çok kesin olmadığını göstermektedir. Ayrıca, korunmuş genlerin sekans analizi desteklemektedir ki, prochlorophyte'ler ve Siyanobakteriler arasında kloroplastlara göre daha yakın bir ilişki vardır. Buda prochlorophytelerin, Siyanobakterilerin diğer tipi olarak düşünülmesine yol açmıştır (Whitton ve Potts 2000).

1.2.1. Siyanobakterilerin Ekolojisi

Jeologlar ve jeokimyacılar Siyanobakterilerin en az 3500 Ma yıllık bir geçmişe sahip olduklarını belirtmektedirler. Schopt ve Walter (1982) Siyanobakterilerin yaşını Proterozoic Döneme (2500-570 Ma) göndermiştir.

Bazen Proterozoic kayalarda bulunan filamentöz yapılar günümüz filamentlerine belirgin şekilde benzemektedir. Stromatolitler olarak bilinen tabakalaşmış yapılar günümüzde Batı Avusturalya'da bulunan Shark Bay körfezindeki birkaç bölgede gelişen yapılara oldukça benzer görünmektedir. Siyanobakteriler petrolce zengin birçok katmanın oluşumunda da önem taşımaktadırlar. Siyanobakterilerin çeşitli habitatlarda başarılı olma nedenlerinden bazıları da onların uzun bir evrimsel sürece sahip olmaları ile ilişkilendirilmektedir. Sonuç olarak, Siyanobakteriler yarı-çöl alanların yüzey kabuklarının stabilitesinin ve kurak bölgelerdeki çiftçilik için kullanılan toprak verimliliğinin korunmasında önemli bir rol oynamaktadırlar. Oldukça geniş habitatlarda bulunabilen Siyanobakteriyel türlerin çoğu özelleşmiştir ve farklı çevresel koşullara tolerans gösterebilirler (Whitton ve Potts 2000).

Düşük konsantrasyonlarda karbondioksitin çok etkin kullanımı ya da yüksek pH'da HCO_3^- kullanma yeteneği Siyanobakterilerin evrimsel başarısını sağlayan faktörler olarak ileri sürülmektedir. Oligotrofik deniz ya da tatlı sularda azot fiksasyon kabiliyeti birincil önem taşımaktadır. Küçük pico-planktonik hücreler düşük ışık yoğunluğunda fotonları oldukça etkili şekilde adsorbe etme yeteneğine sahip olduklarından dolayı *Synechococcus* ve *Prochlorococcus* derin oligotrofik sularda yaşayabilmektedirler (Whitton ve Potts 2000).

Birçok Siyanobakterinin gelişimi için optimum sıcaklık, ökaryotik alglerinkinden en az birkaç derece daha yüksektir. Bu özellik yaz aylarındaki Siyanobakteriyel gelişmede önemli bir rol oynamaktadır. Bazı türler ökaryotik fototrofların gelişemediği kaya yüzeyleri ve sıcak çöl toprakları gibi 74°C ve daha yüksek sıcaklıkları bile tercih edebilirler. Siyanobakteriler ayrıca kutup bölgelerindeki soğuk tatlı su göllerinde de yoğun olarak gelişebilirler. Antartika'nın tatlı suları ve karasal mikrobiyal kümeleri temel olarak Siyanobakterilerden oluşmaktadır. Siyanobakterilerin gelişimi, donmaya ve çözünmeye karşı toleranslı olmaları ile açıklanabilir. Yüksek tuzluluğa dayanma yeteneği birçok tuzlu deniz göllerinde Siyanobakterilerin baskın olmasına neden olmaktadır. Siyanobakteriler ayrıca serbest sülfid gibi spesifik maddelerin yüksek konsantrasyonlarına da toleranslıdır (Whitton ve Potts 2000).

Çoğu Siyanobakterinin önemli bir özelliği, atmosferik azotu fikse edebilmeleridir. Ökaryotik alglerin azot fikse edemedikleri bilinmektedir, bu nedenle azot fikse edebilen Siyanobakteriler önemli bir avantaja sahiptirler. Araştırmacılar ökaryotik algler ile karşılaştırıldığında Siyanobakterilerin azot bakımından sınırlı koşullar altında amonyak için oldukça fazla rekabetçi yeteneklerinin olduğunu fakat nitrat için düşük rekabet yeteneğinde olduklarını belirtmişlerdir. Siyanobakterilerin tatlı sulardaki ve topraktaki miktarının ortamın pH sı ile yakın ilişkili olduğu bildirilmiştir. Yüksek pH değerlerinde daha fazla sayı ve çeşitte buldukları ortaya konulmuştur. Daha düşük pH değerlerinde bazen pH 4,5'un altında bazı planktonik pikosiyano bakteriler ($<2 \mu\text{m}$ çapında) bulunmaktadır. Düşük pH değerlerinde bulunan Siyanobakterilerin çoğu heterosist içermektedir (Whitton ve Potts 2000).

Siyanobakteriler, ökaryotik konukçuları olan bitkiler, funguslar, süngerler ve protistlerin geniş bir grubu ile simbiyotik ilişkiler oluşturabilmektedirler. Siyanoliken birliktelikleri birçok bölgede oldukça yaygındır. Azot fikse eden Siyanobakteriler, fungus ile tek fotosentetik partner oluşturabilmekte ya da fotosentez yapan yeşil bir alg ile üçlü bir birliktelik de oluşturulabilmektedir. Fototroflar ve birçok durumda fakültatif heterotroflar ve azot fikse edici Siyanobakteriler, fotosentetik olmayan konukçularına hem azot hem de karbon sağlayabilirler. Siyanobakterilere olan yarar daha az belirgindir. Konukçu tarafından sağlanan kapalı çevreler, Siyanobakterileri ekstrem çevresel koşullardan, yüksek ışık, kuruma ve de olası avcılarından koruyabilmektedir (Whitton ve Potts 2000).

Siyanobakteriler bitkilerin kök, tallus, gövde ve yapraklarını enfekte edebilmektedirler. Bazı bitkiler kimyasal sinyaller üreterek enfeksiyon şansını arttırmırlar. Konukçu içerisinde bitkisel sinyaller hormogonia oluşumunu baskılayarak heterosist gelişimini stimüle etmektedir. Siyanobakteriler bitki sinyallerine cevap olarak oldukça morfolojik ve fizyolojik değişimler geçirmektedirler. Bu değişimler genellikle karbondioksit fiksasyonu ve gelişme oranında azalma ve azot fiksasyonunda artma şeklinde görülmektedir (Whitton ve Potts 2000).

Siyanobakteriyel popülasyonların büyüklüğü bazen spesifik cyanofajlar ile ya da aquatik funguslar ile kontrol edilmektedir. Siyanofajlar çift iplikli DNA virüslerinin tanınmış üç ailesine dahildirler; Myoviridae, T4 (kontraktıl kuyruklar); Styloviridae, lambda (uzun kontraktıl olmayan kuyruklar); ve Podoviridae, T7 (kısa kuyruklar). Siyanofajlar kompleks bir konukçu çeşidine sahiptirler, oldukça yaygındırlar, deniz ve tatlı sulardan izole edilebilirler. Siyanofajlar diğer bakteriyofajlar ile ilişkili oldukları halde, 3 milyon yıldan daha fazla süre önce evrimleşmişlerdir. Fikoeritrin bakımından zengin *Synechococcus* spp.'yi enfekte eden cyanofajlar kıyısal deniz çevrelerinde oldukça fazla miktarda bulunabilmektedir. Yüzey sularındaki bolluk, mevsimsel duruma göre değişmektedir. *Synechococcus* komuniteleri enfeksiyona karşı oldukça direnç gösterirler. Tatlı sulardaki filamentöz Siyanobakterileri enfekte eden virüsler oldukça bol miktardadır ve aynı zamanda güçlü mevsimsel dinamizm gösterirler.

Deniz yüzey sularında siyanofaj popülasyonu saat-gün aralığında değişim göstermektedir. Solar radyasyon, siyanofajların aktivitesinde büyük bir öneme sahiptir. Yaz ayları süresince güneş ışığının etkisine karşı daha dirençli cyanofaj komüniteleri ortaya çıkmaktadır. Litik enfeksiyona ek olarak lizojenik ortaklıklar filamentöz ve tek hücreli Siyanobakterilerde gösterilmiştir, fakat lizojeninin ekolojik önemi dikkate alınmamıştır (Whitton ve Potts 2000).

Tek hücreli Siyanobakterilerden tüvelendiği düşünölen “Siyaneller” bazı tek hücreli ökaryot konukçularda bulunan fonksiyonel intrasellöler kloroplastlardır. Sistematik olarak ökaryotlar ile ilişkili olmayan, plastid benzeri organeller, “Siyaneller” olarak tanımlanmaktadır. Peptidoglikan duvarın varlığı ile, morfolojileri ile ve fotosentetik aygıtlarının biyokimyasal organizasyonu ile günümüzdeki Siyanobakterilere benzemektedirler. Siyanellerin varlığı, evrimsel geçmişte siyanobakteri benzeri organizmaların, canlı heterotrofik organizmalara olan tekrarlı saldırıları işaret etmektedir. Siyanel-taşıyan alglerden sadece bir tanesinin bir kısım çalışması yapılmıştır. Tek hücreli ökaryotik alg *Cyanophora paradoxa* siyanelinin gen yapısı ve genomuyla ilgili incelemeler yayınlanmıştır. Siyanel genomu yaklaşık 130,000 bp dir, yüksek yapılı bitkilerin kloroplast kromozomlarından daha fazla gen içermektedir, siyanel genlerinde çok az intron bulunmaktadır. Genler operonlarda sıkıca paketlenmiştir, bakteriyel operonlardaki yapıya benzerdir. Kloroplastlarda bulunan genler, ayrıca Siyaneller’de de bulunmaktadır. Siyaneller karboksizom içermektedirler. Karboksizomlar RuBisCO ve karbon konsantrasyonunda önemli bir rol oynayan karbonik anhidraz biriktirirler (Whitton ve Potts 2000; Reyes-Prieto ve Bhattacharya 2007).

1.2.2. Siyanobakterilerin Morfolojisi

Siyanobakteriler oldukça fazla morfolojik çeşitliliğe sahiptirler. Tek hücreli (örn. *Chroococcus*) ya da filamentöz (örn. *Anabaena*) olabilirler ve bu hücreler, tekli ya da gruplaşmış koloniler oluşturabilmektedir. Tek hücreliler bir, iki ya da üç düzlemde bölünebilmektedir. Bir düzlemde bölünen tek hücrelilerin bazıları asimetrik bölünme geçirmektedir. Filamentlerin dallanması gerçek ya da yalancı olabilir. Yalancı dallanmada, bir filament bir kılıf içinde bölünerek iki ayrı

kılıflı filamentin oluşumuna neden olmakta ve bunlardan birisi diğerinden ayrı gelişmektedir. Gerçek dallanmada ise bir filament içerisinde, hücreler birden fazla düzlemde bölünme potansiyeline sahiptirler. Bu formların birçoğunda koloni yapısının korunması ekzopolisakaritlerin varlığı ile sağlanmaktadır. Heterosist'in varlığı ya da yokluğu cinsleri ayırmada önemli bir özelliktir. Gaz vakuolleri ise yüzmeye yardımcı olan yapılardır ve farklı birçok türde bulunmaktadır. *Lyngbya*'da olduğu gibi trikom kılıf, filamentin hücresel parçası anlamına gelmektedir. Yalancı dallanan bazı filamentöz formlarda, filament apikal olarak gelişmekte ve bazal kısımdan ölmektedir. Çok görülen diğer morfolojik bir formda ise kılıflı bir trichomun bazalına yakın bir bölgesinde hücre bölünmesi gerçekleşmekte ve apikal hücreler daralarak çok filamentli bir yapıya gelişmektedir (Boone ve ark. 2001).

1.2.3. Siyanobakterilerin Hücre Yapıları

1.2.3.1. Glikokaliks, Hücre Duvarı ve Plazma Membranı

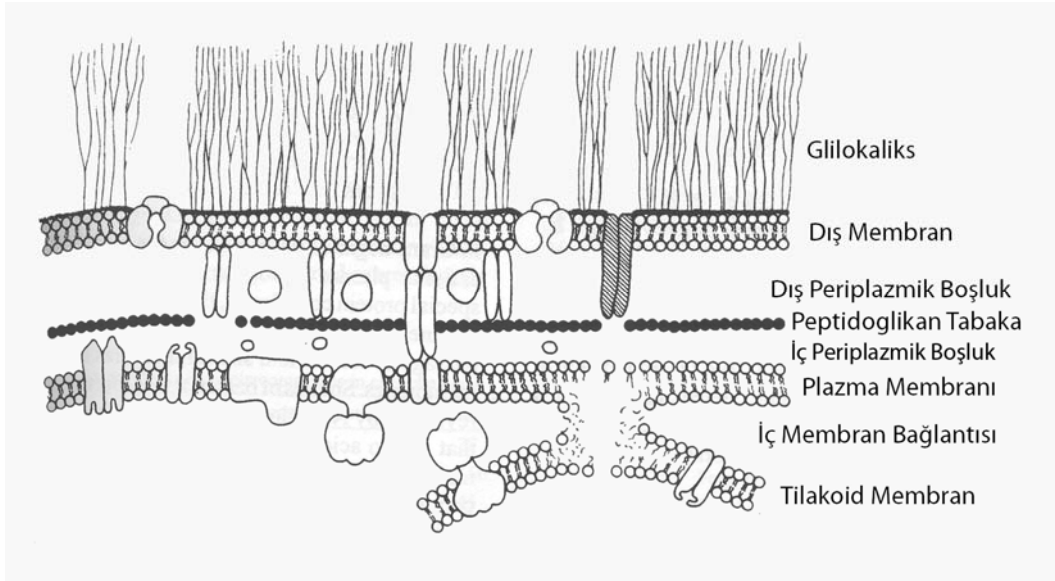
Son on yıl içerisinde, moleküler biyoloji teknikleri Siyanobakteriyel proteinlerin yapısı ile ilgili kapsamlı yeni bilgiler sağlamış ve böylece membran bileşenlerinin birbirleriyle olan ilişkileri ve düzenlenmesine yönelik önemli gelişmeler sağlamıştır. Genel yapısal özellikler oldukça detaylı şekilde tanımlanmasına rağmen, membranlar içerisindeki çoklu komplekslerin fonksiyonel birleşimi gibi temel yapılar henüz iyi bilinmemektedir.

Siyanobakteriyel hücreler, fibröz bir kılıf olarak görünen eksternal, karbonhidratça zengin bir glikokaliks ile çevrelenmişlerdir. Tek hücreli, kolonial ve filamentöz Siyanobakterilerde dış membranın dışında bir kılıf olarak yer alan glikokaliks kapsül, jel, musilaj ya da slime olarak adlandırılmaktadır. Glikokaliks, hücreleri kurumaya karşı koruyan ve sıvı bir ortamda çevreden temel besinlerin alımında etkili olan bir yapı olarak görev almaktadır. Siyanobakterilerdeki kılıf çoğunlukla polisakaritten oluşmaktadır ancak bazı suşlarda hücre ağırlığının %20'den fazlası polipeptitlerden oluşabilmektedir. Glikokaliks dış membran ile yakın ilişkilidir. Dış membran ve plazma membranı arasındaki

periplazmik boşluk peptidoglikan tabakası tarafından bölünür, böylece bir dış periplazmik ve bir iç periplazmik boşluk meydana gelir. Periplazmik boşluk aynı zamanda dış membran ve plazma membranı arasında kolaylaştırılmış transport kanallarını da içermektedir (Şekil 1.2).

Siyanobakterilerde Gram-negatif bakterilerdeki gibi peptidoglikan tabakası mekanik koruma sağlar ve ayrıca sertliği de hücre şeklini belirler. Bu tabaka yapısal olarak Gram-negatif bakterilerinki ile benzer olmasına rağmen, Siyanobakteriyel peptidoglikan tabaka daha kalındır. Kimyasal kompozisyonu ise Gram-pozitif bakterilerinkine daha yakındır (Bryant 1994).

Birçok kolonial ve filamentöz Siyanobakterilerin kılıflarında sarı, kırmızı ya da mavi pigmentler birikebilir. Bu durum hücrelerin renginin maskelenmesine neden olabilmektedir. Tipik sarı-kahverengi pigment UV absorblayan, koruyucu bir pigment olarak karakterize edilerek “scytonemin” olarak adlandırılmaktadır (Bryant 1994).



Şekil 1.2. Siyanobakteriyel bir hücrenin dış yüzeyinin bir modeli. Fibröz bir glikokaliks çeşitli transport kanallarını içeren dış membrana bağlanmıştır. Dış periplazmik boşluk peptidoglikan tabakası ile iç periplazmik boşluktan ayrılmıştır. Tilakoit ve plazma membranları arasındaki temas noktalarında, membran yapısı oldukça belirsizdir ve bu sentezlenen tilakoit membran komponentlerini temsil edebilir (Bryant 1994).

Hücre ya da plazma membranı, bakteri hücrelerinin organellerini ve sıvı içeriğini saran hücreye yapısal bütünlük sağlayan, ayrıca çok önemli işlevleri yürüten seçici geçirgen bir yapıdır. Hücre zarının koruma, madde alışverişi ve sinyal iletimi, tanıma yapılarını oluşturma, hücrelerarası bağlantıların sağlanması, organel ve hücre hareketinin sağlanması gibi görevleri vardır. Protein ve lipit moleküllerinden oluşan hücre membranındaki lipit molekülleri, fosfolipit, kolesterol ve glikolipitlerdir.

Siyanobakterilerde plazma membranı, bakterilerde olduğu gibi oksidatif fosforilasyon, elektron transferi, proton pompalama ve ATP oluşumu gibi birbirine bağımlı olayların meydana geldiği yerdir. Ayrıca plazma membranı, ATP sentaz, solunum enzimleri ve çeşitli taşıyıcıları içermektedir (Bryant 1994).

1.2.3.2. Tilakoit Membranlar

Siyanobakterilerdeki tilakoit membran grana benzeri bölgeler içermediğinden dolayı yapı olarak basit olduğu kabul edilmektedir. Fikobilizomlar genellikle tilakoit membranların stromal kısmını kaplamıştır. Tilakoit membranlar, sitoplazma içerisinde baştan başa uzanmaktadır fakat membranların organizasyonu türe göre ve bazen fizyolojik duruma bağlı olarak değişmektedir (Bryant 1994).

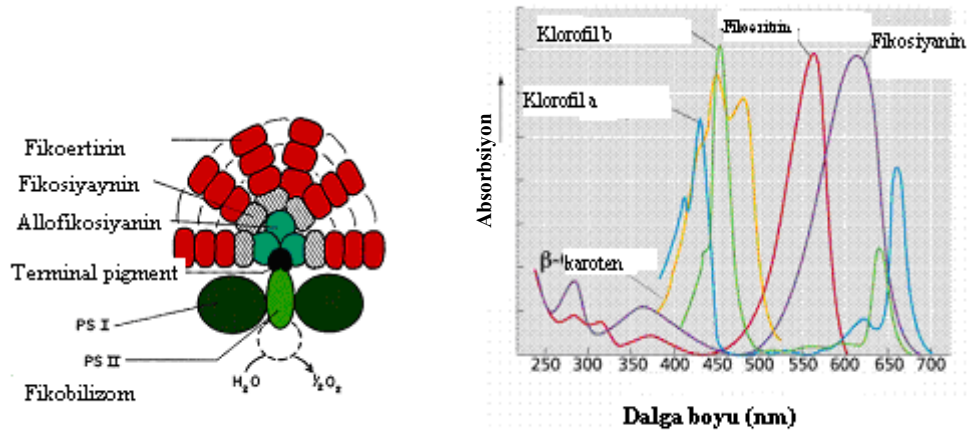
Siyanobakterilerdeki bütün tilakoitler sitoplazma ya da sitoplazmik membranın periferi ile ilişkilendirilmektedir. Siyanobakterilerdeki tilakoitler konsentrik ya da radyal olarak düzenlenmiştir. Siyanobakterilerin çoğu fikobilizomlara sahiptir ve bunlar protein-pigment kompleksleri olup tilakoitlerin her iki yüzeyi üzerinde düzenli bir şekilde yer almaktadır. Fikobilizom, Siyanobakterilerin çoğunda ışık tutucu kompleks olarak görev yapmaktadır. Tipik fikobilizomlarda bulunan pigmentler allofikosiyanindir (Madigan ve ark. 2003).

Diğer tüm fotosentetik bakteriler ışık yakalamak için klorofil ya da klorozomları kullanmaktadırlar. Fikobilizomlar derin deniz çevreleri gibi ortamlarda yeşil ışığı adsorblamak için özelleşmişlerdir ve diğer fotosentetik pigmentlerin adsorbsiyon bölgelerinden dağılan ışığı adsorbe ederler. Işık toplayan kompleksin (Allofikosiyanın), merkezi bir koru vardır ve fotosentetik

reaksiyon merkezinin üzerinde yer alır. Fikosiyanin ve fikoeritrin alt üniteleri yüzey alanını arttırmak için ince bir tüp gibi bu merkezden dışarı doğru yayılırlar. Fikobiliproteinler fikobilizomları oluştururlar ve solar enerjiye maruz kalma gibi stres koşulları dışında hemen hemen bütün Siyanobakterilerde bulunmaktadır.

Fikobilizomların büyüklüğü ve şekli türlere göre değişmekte ve genellikle hücrelerin geliştikleri ışık koşullarına bağlı olmaktadır. Birçok Siyanobakteriyel türde fikobilizomlar hemidiskoidaldir. Birçok filamentöz türde fikobilizom morfolojisi, kor yapısının kompleksliliği ve fikobilizomların silindirik şekli bakımından farklılık göstermektedir. Işık koşullarında oluşan bir değişme, fikobilizomların şeklinde bir değişim oluşturabilir, örneğin hemidiskoidal fikobilizomlar kırmızı ışıkta gelişen hücrelerde oluşurken, silindirik fikobilizomlar yeşil ışıkta gelişen hücrelerde oluşmaktadır (Bryant 1994).

Siyanobakterilerdeki temel ışık yakalayan, suda çözünebilir anten pigmentler olan fikobilizomlar, tilakoitlerin stromal kısmında yer alırlar. Fikobilizomlar eksitasyon enerjisini fotosistem II'ye transfer etmektedirler. Fikobilizomlardan Fotosistem I'e (PS I) e enerji transferi direkt olabilir. PS I'e olan bu enerji transferi fikobilizomdaki allofikosiyanin B varlığına bağlıdır. Fikosiyanin enerjiyi direkt olarak klorofile transfer edebilmektedir (Bryant 1994).



Şekil 1.3. Fikobilizomların yapısı ve absorbe ettikleri dalga boyları (Bryant 1994).

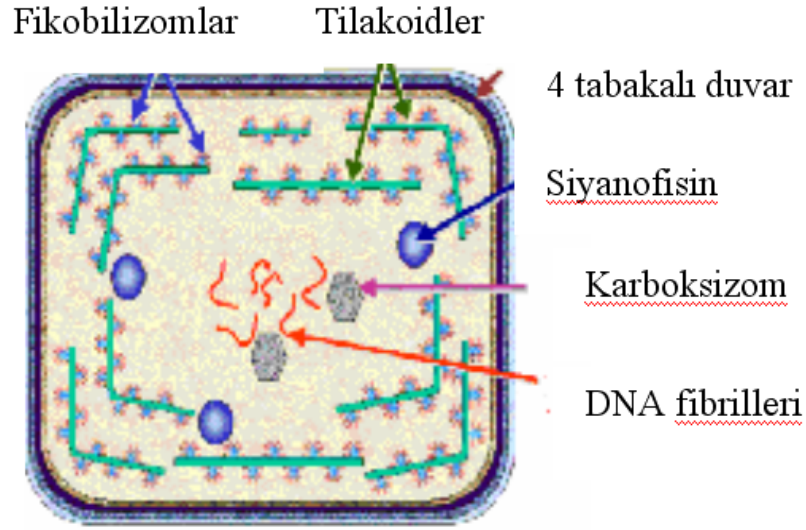
1.2.3.3. Sitoplazmik Yapılar

Siyanobakterilerin sitoplazmalarında birçok inklüzyon cisimciği bulunmaktadır, bunların çoğu çeşitli preparatif teknikler kullanılarak görsel hale getirilebilmektedir. Bunlar:

- 1) Glikojen granülleri: Genellikle tilakoitler arasında lokalize olmuştur. Bazı Siyanobakterilerde polihidroksibütirat granülleri mevcuttur.
- 2) Siyanofisin granülleri: Bunlar arjinin ve aspartik asitin polimerleri olup yapısal granüllerdir. Azot kaynağı olarak fonksiyon görürler. Işık mikroskobu ile belirlenebilirler.
- 3) Karboksizomlar (Polihedral cisimcikler): Çok miktarda ribuloz bifosfat karboksilaz (RUBİSCO) enziminden oluşan büyük yapılardır. Karboksilasyon enziminin bir deposunu oluştururlar.
- 4) Polifosfat (Volutin): 100-300 nm çapında granüllerdir. Transmission elektron mikroskobu ile sferik ya da porlu yapılar olarak görünürler.
- 5) Gaz vakuelleri: Su kolonundaki pozisyonu düzenlemeyi sağlayan gaz vakuelleri temel olarak planktonik Siyanobakterilerde görülür (Boone ve ark 2001).

Siyanobakteri hücrelerinin nükleotid bölgeleri genellikle sentroplazma olarak adlandırılmaktadır (Madigan ve ark. 2003).

Tek hücreli ve kolonial Siyanobakterilerin birçoğu ve filamentöz formlar ikiye bölünerek çoğalmaktadır. Tek hücreli ve pseudofilamentöz formların bir kısmında üreme, internal “multiple fission” ile meydana gelmektedir. Multiple bölünmeden sonra oluşan hücreler “baeocytes” ya da “microcytes” olarak adlandırılmaktadır. Siyanobakterilerdeki ikiye bölünme tek hücreli populasyonların meydana gelmesine neden olmaktadır (Bryant 1994).



Şekil 1.4. Siyanobakteriyel bir hücrenin diagramatik bir şekli (Bryant 1994).

1.2.4. Siyanobakterilerdeki Özelleşmiş Hücreler ve Farklılaşma

1.2.4.1. Heterosistler

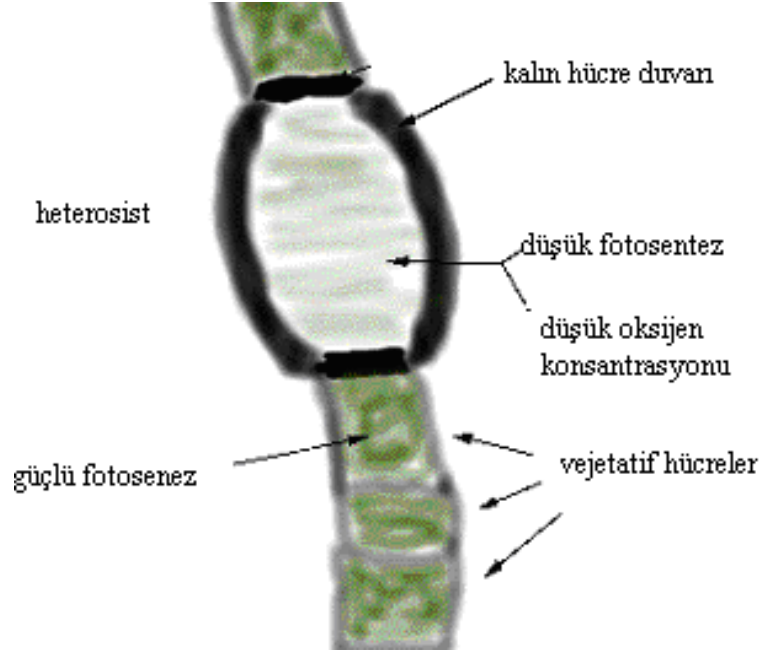
Heterosistler, Nostocales ve Stigonematales üyeleri tarafından oluşturulan azot yokluğunda azot fikse eden, vejetatif hücrelerin farklılaşması ile meydana gelmiş özelleşmiş hücrelerdir. Heterosist kalın duvarlı siyanofisin nodülü içeren bir hücre olup hücrenin bir ya da iki ucunda bulunmaktadır. Heterosistler nitrogenaz enzimi ile havadaki serbest azotu (N_2) fikse ederek filamentteki hücrelere biyosentez için gerekli olan azotu sağlarlar. Nitrogenaz enzimi oksijen ile inaktif hale geçtiği için heterosistin oksijensiz bir çevre oluşturması gerekmektedir. Bu çevrenin oluşumunda heterosistlerin fizyolojisi temel rol oynamaktadır. Heterosist, ek üç adet hücre duvarı içermektedir. Glikolipit içeren bu tabakalar oksijene hidrofobik bir bariyer görevi görmektedirler. Heterosistlerin diğer bir özelliği de nitrogenaz ve azot fiksasyonu için gerekli diğer proteinleri üretmeleridir. Ayrıca oksijen üreten fotosistem II yi içermezler ve de oksijeni tüketen ve nitrogenaz için enerji sağlayan glikolitik enzimleri düzenlerler. Az miktarda oksijen varlığına duyarlı proteinler üreterek mikroanaerobik bir çevrenin oluşumu sağlanmaktadır (Boone ve ark. 2001; Madigan ve ark. 2003).

Oksijen içeren çevrelerde azot heterosist içerisinde yer alır. Birçok Siyanobakteri iyi havalanma koşullarında azotu fikse edebilen özel fizyolojik stratejilere sahiptir fakat bu yetenek az oksijenli koşullarda daha fazla gelişmiştir.

Heterosistlerde fotosistem II olmadığından, vejetatif hücreler heterosistlere karbonhidratları sağlamaktadır. Bu karbonhidratın sukroz olduğu düşünülmektedir. Karbon ve azot kaynakları filamentte bulunan hücreler arasındaki kanallar aracılığı ile değiştirilmektedir. Heterosistler fotosistem I'i içermekte ve döngüsel fotofosforilasyon ile ATP oluşumunu sağlamaktadırlar. Bir heterosist yaklaşık olarak 9-15 hücrede bir oluşmaktadır. Filamentteki hücreler bölündüğü halde, heterosistler arasındaki aralar hemen hemen sabit kalmaktadır. Bakteriyel filament, çok hücreli bir organizma olarak düşünülebilir. Bazı heterosist oluşturan bakteriler "akinet" olarak adlandırılan spor benzeri hücrelere ya da "hormogonia" olarak adlandırılan hareketli hücrelere farklılaşabilmektedir. Heterosist oluşumu amonyum ya da nitrat gibi bir azot kaynağının varlığında inhibe olmaktadır. Heterosist yapısının korunumu *hetN* olarak adlandırılan bir enzime bağlıdır (Boone ve ark. 2001; Madigan ve ark. 2003).

Heterosistlerde anoksijenik Fotosistem I (PSI) fonksiyoneldir bu nedenle oksijensiz bir ortam sağlanmaktadır. Ayrıca nitrogenaz enzimi sentezlenmekte ve azot fiksasyonu gerçekleşmektedir.

Bazı planktonik formlarda azot fiksasyonuna izin veren hücresel ya da çevresel koşullar hala belirlenememiştir fakat nitrogenaz aktivitesi gösterilmiştir (Boone ve ark. 2001).



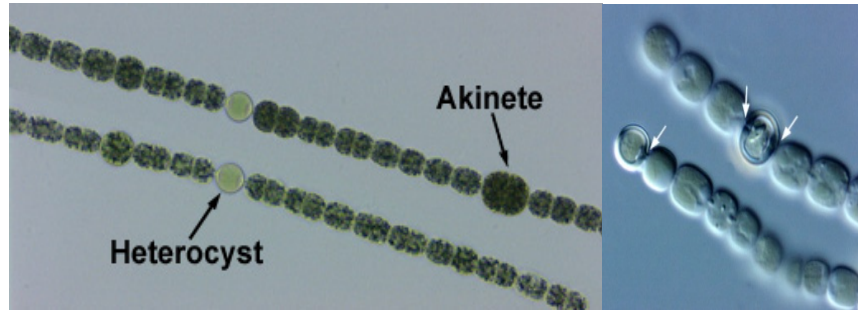
Şekil 1.5. Heterosist yapısı (Whitton ve Potts 2000).

Birçok Siyanobakteri, aerobik koşullar altındaki atmosferik N_2 'de gelişebilmekte ve birçoğu, anaerobik koşullar deneysel olarak sağlandığında N_2 'fiksasyonunu gerçekleştirebilmektedir. Siyanobakterilerin doğadaki geniş ekolojik dağılımı göz önünde tutulduğunda, biyolojik N_2 fiksasyonuna oldukça önemli katkı sağladıkları bilinmektedir (Bryant 1994).

Anabaena, *Nostoc* ve *Fischerella*, aerobik koşullarda N_2 fiksasyonunu gerçekleştirmektedirler. Heterosist içermeyen Siyanobakteriler arasında, aerobik koşullar altında N_2 fiksasyonunu gerçekleştirebilen *Gloeothece* sp. PCC 6909 olarak bildirilmiştir. Bu Siyanobakteriler, tek azot kaynağı olarak atmosferik N_2 varlığında fotoototrofik olarak gelişebilmektedir. Planktonik *Oscillatoria* (*Trichodesmium*) spp. açık denizlerdeki en önemli N_2 fikse ediciler olarak bilinmektedir. Filamentöz, heterosist içermeyen bir Siyanobakteri olan *Plectonema boryanum* da azot fiksasyonu anaerobik ortamda gerçekleşmektedir (Bryant 1994).

1.2.4.2. Akinete

Akineteler (dirençli sporlar) Nostocales grubundaki birçok Siyanobakteri tarafından özellikle de ışık ve besin sınırlaması olan koşullar altında oluşmaktadır. Akineteler eski duvarın çevresinde kalın bir duvar oluşması sonucu vejetatif hücrelerin farklılaşması ile meydana gelmektedir. Akineteler siyanofisin, glikojen, lipit ve karatenoid pigmentlerini biriktirmekte ancak polifosfatları içermemektedirler. Akinete oluşumu genellikle heterosist lokasyonu ile ilişkilidir. Akineteler ile heterosistler ya bitişik ya da uzak olarak bulunmaktadırlar. Bu hücreler kurumaya, donmaya ve oksijensiz sedimentlerde uzun süreli depolanmaya karşı dirençlidirler ve germinasyondan önce bir dinlenme periyoduna ihtiyaç duymazlar (Boone ve ark. 2001).



Şekil 1.6. Akinete yapısı (Whitton ve Potts 2000).

1.2.4.3. Hormogonia

Hormogonia Nostocaceae familyasındaki bazı Siyanobakteriler tarafından oluşturulan hareketli filament hücreleridir. Siyanobakteriler, çevresel strese ya da yeni bir ortama maruz bırakıldıklarında hormogonia'ya farklılaşırlar. Hormogonia farklılaşması azot fikse edici bitki-Siyanobakteri simbiyozislerinin gelişimi, özellikle *Nostoc* cinsi Siyanobakterileri ile konukçuları arasındaki ilişki açısından oldukça önemlidir.

Hormogonia 5-15 hücreli kısa zincirli hücrelerden oluşmaktadır ve bu hücreler trikomun vejetatif hücrelerinden farklıdır. Hücre çapları vejetatif trikomlarından daha azdır.

Hormogonia'nın oluşması ve serbest kalması örneğin, fosfor tüketimi gibi çevresel koşullar ile ilişkilendirilmektedir ya da morfogenetik döngünün özel basamakları ile ilişkilendirilmektedir (Boone ve ark. 2001).

1.2.4.4. Termini

Bazı filamentöz Siyanobakterilerde terminal hücre, konik, uzun, incelen kanca şeklinde farklılaşabilmektedir. Bazı filamentöz tipler örneğin *Calothrix* uzamış terminal hücreler geliştirmekte ve bu hücrelerde tilakoit ve pigmentlerin çoğu bulunmamaktadır (Boone ve ark. 2001).

1.2.5. Siyanobakterilerin Fizyolojisi

Siyanobakterilerin fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin başında onları diğer prokaryotlardan ayıran H₂O'nun kullanımına izin veren ikili fotosistemleri gelmektedir. Klorofil a, ökaryotik alg ve bitkilerin kloroplastlarında olduğu gibi reaksiyon merkezi pigmentidir ve Siyanobakteriler için ışık tutmada görev almaktadır (Bryant 1994).

Karbondioksit redüksiyonu için redüktif pentoz fosfat döngüsü kullanılmaktadır. Bazı Siyanobakterilerin oksijenik fotosentezi, serbest sülfidin varlığına göre değişebilmektedir. Fotosistem II (FS II) kısmen ya da tamamen inhibe edilmekte ve sülfitten türetilen elektronlar fotosentetik elektron transport sistemine Fotosistem I (FS I)'den girmekte ve karbondioksit redüksiyonu ile sonuçlanmaktadır (anoksijenik fotosentez). Siyanobakterilerin tümü sülfidi bu şekilde tolere edememektedirler. Bazıları oksijenik ve anoksijenik fotosentezi kombine ederler ya da sülfidin FS II'yi inhibisyonundan korumaktadırlar (Bryant 1994).

Fotosistem I (FS I), bir membran proteinidir. Bu protein, Siyanobakteriler, yeşil alglar ya da yüksek bitkiler gibi oksijenik fotosentetik organizmalar

tarafından kullanılan iki temel reaksiyon merkezi kompleksinden birisidir. FS I, güneş ışığından elde edilen eksitasyon enerjisini membrana transfer etmektedir. Siyanobakterilerin trimerik FS I'i, birkaç yüz adet klorofil molekülünün içine gömüldüğü protein bir iskeletten oluşmaktadır. Gömülü olan klorofiller ışığı adsorbe ederek, oluşan eksitasyon enerjisini reaksiyon merkezine transfer ederler (Bryant 1994).

Büyük çoklu bir protein kompleksi olan FS I reaksiyon merkezi, 82 ve 83 kDa luk bir polipeptitten oluşmaktadır. Bu polipeptitler P700, iki phyloquinon ve Fx olarak gösterilen [4Fe-4S] kümesine bağlanmaktadır. Bu polipeptitler hidrofobiktir ve bu hidrofobik yapısı sayesinde tilakoit membranın iç ve dış yüzeyine karşılık gelecek şekilde 8-9 kez kıvrılarak tilakoit membran içerisine yerleşmiştir (Bryant 1994).

FS I reaksiyon merkezine periferik olan, klorofillere bağlanan, polipeptitlerden ve ksantofil karatenoidlerden oluşan anten kompleksler bulunmaktadır. Siyanobakterilerdeki fotosistem I kompleksi (FS I) ışığı sitokrom c6: ferrodoksin oksidoredüktaz'a süren bir yapı olarak fonksiyon görmektedir (Bryant 1994).

Siyanobakterilerin fotosistem II (FS II) reaksiyon merkezi, çeşitli proteinlerden oluşan büyük bir komplekstir. FS II, oksijenik fotosentetik organizmaların tilakoit membranına gömülmüştür. Suyun moleküler oksijene ve redükleyici bileşenlere parçalanmasını sağlayan bir reaksiyon merkezi içermektedir. Redükleyici bileşenler elektron transport zinciri/proton taşıyıcıları yolu ile karbondioksitin organik moleküllere redüksiyonunda kullanılmaktadır. Fotosistem II spesifik ışık toplayıcı sisteme sahiptir. Fikobiliproteinler de FS II için ışık toplayıcı olarak görev yapmaktadır (Boekema ve ark. 1995).

FS II reaksiyonları pek çok pigment molekülünün biri tarafından bir ışık fotonunun adsorbsiyonu ile başlamaktadır. Siyanobakterilerde fikobiliproteinler yani fikoeritrobin, fikocyanobilin ve allofikocyanobilin klorofil b yerine bulunmaktadır. Eksitasyon enerjisi ışık toplayıcı pigmentlerden reaksiyon merkezine hızlı bir şekilde transfer edilmektedir (Barber ve Nield 2002).

Siyanobakterilerin çoğu obligat fototrofturlar, çünkü karanlıkta katabolik hızlar genellikle eksternal substratlar ile arttırılmamaktadır. Siyanobakterilerin

çok az bir kısmı glikoz, sukroz ya da fruktoz un kullanılması ile karanlıkta heterotrof olarak gelişmektedir. Fotoheterotrofi bazı Siyanobakterilerde yapay olarak zorlanabilmektedir (Bryant 1994).

Respirasyon fotosentetik ışık koşulları altında oldukça yavaştır, çünkü fotosentetik elektron zincirinin bir kısmı aynı zamanda respirasyonda kullanılmaktadır. Karanlıktaki anaerobik metabolizma fermantasyon için sınırlanmakta ve iyi bir durumda kalmayı sağlamaktadır (Bryant 1994).

Siyanobakterilerde gelişme ve üreme temel olarak ikiye bölünme (binary fission) ile meydana geldiği halde, bazı türler kompleks morfogenetik yaşam döngüsü geçirmektedirler (Bryant 1994).

Siyanobakterilerin fotobiyolojisi fikobilin sentezinin kontrolünü içermektedir, örneğin birçok Siyanobakteri kırmızı dalga boyundaki ışık miktarı arttırıldığında fikoeritrin sentezini sona erdirmektedir.

Siyanobakterilerde fototaksis (pozitif ve negatif) ve fotofobik reaksiyonlar da tanımlanmıştır. Siyanobakterilerin çoğu ışık kaynağı yönünde hareket etmektedirler (pozitif fototaksis) (Madigan ve ark. 2003).

Tabaka oluşturan çoğu Siyanobakteri için hareket oldukça önemli bir özelliktir ve bu hareket kayarak oluşmaktadır, Kayma hareketini açıklayan hipotezlerden en ilgi çekici olanları musilaj salgılanması ve yüzey dalgalanmalarına neden olan kasılabilir yapılardır (Whitton ve Potts 2000).

Siyanobakterilerde fimbria ya da pili bulunmakta ancak prokaryotik flagella bulunmamaktadır. Siyanobakterilerdeki kayma hareketinin mekanizması henüz açık olmasa da bazı küçük tek hücreli tiplerde de kayma hareketi belirlenmiştir (Bryant 1994).

Bazı Siyanobakteriler hücre duvarlarında porlara sahiptirler ve buradan musilaj salındığı farz edilmektedir. Bu hipoteze göre porlar aracılığı ile musilaj salınımı trikomun hareketi için itici güç sağlamaktadır. Siyanobakteriler ışığa karşı fototaksis, fotokinezis ve fotofobik cevap oluşturmaktadırlar. Siyanobakterilerin çoğu düşük ışık yoğunluğunda gelişmeye adapte olmuşlardır. Fazla ışık fotooksidatif strese neden olur ve hasar verebilir. Pozitif ve negatif fototaksisin kombinasyonu organizmanın küme içerisinde optimum bir pozisyon elde etmesini sağlamaktadır. Fotokinezis ışık yoğunluğu ile hareket hızının

artması şeklinde tanımlanır. Bu daha fazla enerji sağlamak içindir. Sadece pozitif fotokinezis bilinmektedir. Fotofobik cevap ışık yoğunluğundaki ani değişimin sonucu olarak hareket yönünün tersine çevrilmesi olarak tanımlanmaktadır. Bu cevap Siyanobakteriler için çok önemlidir. Azalan ve artan cevaplar bilinmektedir. Azalan cevap, ışıkta organizmanın kümeleşmesi şeklindedir. Oldukça yüksek ışıkta artan cevap meydana gelir yani gölgelik bir alanda organizmanın kümeleşmesi gerçekleşir (Whitton ve Potts 2000).

Birçok Siyanobakteri ışıkta glikoz ve fruktoz gibi organik bileşikleri asimile edebilir (fotoheterotrofi) ve hatta bazıları tamamen kemoorganotrofik bir metabolizma gösterebilirler. Siyanobakterilerin organik bileşiklere karşı kemotaksis cevapları oldukça az bilinmektedir (Whitton ve Potts 2000).

1.2.6. Siyanobakteriyel Bloomlar

“Bloom” kelimesinin tanımı tam olarak yapılmamıştır fakat genellikle bir fitoplankton biomasını tanımlamaktadır. Bloomlar genellikle bir ya da iki türden oluşmakta ve dominant fitoplanktonlar tarafından tanımlanmaktadır, örneğin Siyanobakteriyel bloom, diatom bloom, *Anabaena* bloom gibi (Whitton ve Potts 2000).

Siyanobakteriyel bloomlar temiz suyun bulanıklaşmasına neden olmaktadır. Genellikle yüzeyde oluşmakla birlikte sıcakta, besince zengin yavaş akan sularda da oluşabilmektedir. En büyük bloomlar içme suyu depoları ya da eğlenme suları gibi tatlı sularda olanlardır. Çevresel koşullar gelişim için uygun olduğunda tatlı su bloomları oluşmaktadır. Siyanobakteriyel bloomların oluşması mevsimlere bağlı olmasa da yazın sonlarına doğru ve sonbaharda olduğu bildirilmektedir (Whitton ve Potts 2000).

Genellikle yüzey bloomları gaz vakuelleri içeren Siyanobakterilerden oluşur ve bu yapı geçmişten beri “su bloomları” olarak tanımlanmaktadır. Bazı Siyanobakteriyel olmayan tür, su bloomları oluşturabilir, yeşil alg *Botryococcus braunii* yağ üretilip depolayarak yüzer. Bazen flagellatlar örneğin *Euglena* da yüzey bloomları oluşturabilir (Whitton ve Potts 2000).

Bazı Siyanobakteriyel bloomlar tatlı su ya da havuz yüzeyinde köpük, pislik ya da lif şeklinde görünmekte, mavi, koyu yeşil, kahverengi, ya da kırmızı renkte olabilmektedirler. Bu bloomların ölümü, suyun kötü kokmasına neden olmaktadır. Siyanobakteriyel bloomlar tarafından oluşturulan toksinler bilinen en güçlü doğal zehirlerdir. Bu nedenle bu sulardan analiz edilinceye kadar uzak kalmak gerekmektedir (Whitton ve Potts 2000).

Siyanobakteriyel bloomlar su arıtma tesislerinde filtrelerin tıkanmasına neden olarak, dezenfeksiyon maliyetini arttırarak, tat ve koku problemlerine neden olarak ekonomik bir etki oluşturmaktadırlar (Whitton ve Potts 2000).

1.2.7. Siyanotoksinler

Siyanotoksinler, insanlarda akut ve kronik sağlık problemlerine, diğer hayvanlarda, balıklarda ve kuşlarda ölümcül zehirlenmelere neden olmaktadır (Carmichael, 1992, 1994, Hunter, 1995a, b). Siyanobakteriler tarafından oluşturulan bloomlar suyun tadını, kokusunu ve görünümünü etkilemekle kalmaz, ayrıca yabani hayatı, evsel hayvanları ve insanları da alerjik ve gastroenterik yanıtlar oluşturarak oldukça fazla etkilemektedirler. İnsanlarda Siyanobakteriyel toksinler, akut karaciğer hastalıkları (hepatotoksikozlar), nörotoksikozlar ve gastrointestinal rahatsızlıklara neden olmaktadır. Dünya Sağlık Organizasyonu içme sularında microcystin LR L^{-1} limitinin $1\mu g$ olması gerektiğini bildirmiştir. Siyanobakterilerin toksinleri biyolojik olarak aktif sekonder metabolitlerdir ve bunların çoğu farmasotik potansiyele sahip olabilirler. Siyanotoksinler spesifik toksik etkilerine göre şu şekilde sınıflandırılırlar (Chorus ve Bartram 1999).

1) Sinir sistemini etkileyen nörotoksinler

Anatoksin-a

Anatoksin-a(s)

Saksitoksin

Neosaksitoksin

2) Karaciğeri etkileyen hepatotoksinler

Mikrositinler

Nodularinler

Klindrospermopsin

3) Tümör gelişimini arttırıcı kimyasallar

Mikrositinler

4) Gastrointestinal sistemi etkileyebilen kimyasallar olan lipopolisakkaritler

Siyanotoksinler ve onların spesifik toksik mekanizmaları, spesifik etkileri, neden oldukları semptomlar Çizelge 1.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge1.1. Siyanotoksinlerin etkileri ve semptomları (Chorus ve Bartram 1999).

<i>Toksin</i>	Akut etki	Belirtileri ve semptomları
Anatoksin-a	Nörotoksisite	İnsanlar: belgelenmemiştir Hayvanlar: soluk almada azalma, çarpınma, ölüm Kuşlar: opisthotonos (“s”-şekilli boyun)
Anatoksin-a (s)	Nörotoksisite	İnsanlar: belgelenmemiştir Domuzlar: aşırı tükrük salgılama, mukoid burun akıntısı, titreme, adalelerde hareket bozukluğu, ishal Ördekler: kusma, felç, opisthotonos (“s”-şekilli boyun), nöbet Fareler: gözyaşı salgılama, aşırı tükrük salgılama, idrar çıkarma, dışkı yapma, soluksuz kalarak ölüm. Siçanlar: kırmızı pigmentli kulaklar
Klindrospermopsin	Hepatotoksisite, Böbrek toksisitesi, Kromozom kırılması, anoplidi	İnsanlar: karaciğer büyümesi, kırgınlık, iştahsızlık, kusma, başağrısı Fareler: iştahsızlık, ishal, kesikli solunum
Mikrositinler	Hepatotoksisite	İnsanlar: gamma-glutamyl transeptidase artması İnsanlar, fareler: alanin aminotransferaz artması Siçanlar: embriyo ölümleri Memeliler: zayıflama, halsizlik, iştahsızlık, el ve ayaklarda solgunluk, akılda dengesizlik
Nodularin	Hepatotoksisite	İnsanlar: deri ve gözde hasar, protein fosfatazların inhibisyonu
Saksitoksin, neosaksitoksin	Nörotoksisite	İnsanlar: parestezi ve dudaklarda hissizlik ve maruz kalmadan 1 ya da 2 saat sonra konuşmada bozukluk, yüz, boyun ve ekstremitelerde büyüme; solunum ve kaslarda felç Hayvanlar: solunum yetmezliğinden ölüm

Siyanobakteriyel toksinleri içeren suların yutulması ile ciddi akut gastroenteritis (diare ve kusma), karaciğer toksisitesi (serumdaki karaciğer enzimlerinde artış) ortaya çıkabilmektedir. Karın ağrısı, diare ve kusma şeklinde ortaya çıkan karaciğer semptomlarının insan ya da hayvanlarda ortaya çıkması saatler ya da günler alabilmektedir.

Rengi bozuk olan sularda ya da yüzeyinde köpük, kirlilik ya da algal lifler görünen sularda yüzmek, su kayağı yapmamak ve botla dolaşmamak gerekmektedir. Eğer böyle bir suda yüzüldüyse mümkün olduğu kadar çabuk temiz su ile yıkanmak gerekmektedir. Siyanobakteriyel toksinlere maruz kalan insan ya da hayvanlara derhal tıbbi müdahale yapılması gerekmektedir (Keleti ve Sykora 1982; Utkilen ve Gjölme 1992; Chorus ve Bartram 1999).

1.2.8. Siyanobakterilerin Moleküler Evrimi ve Taksonomisi

Moleküler biyoloji, genetik bilginin şifresini çözme konusunda yeni araçlar sağlamış ve bu araçlar taksonomik çalışmalarda kullanılmaktadır. Siyanobakteriler için farklı kemotaksonomik ve makromoleküler teknikler yayınlanmış ve bunların kullanışlılıkları tartışılmıştır. Siyanobakterilerin en kesin filogenetik şeması şu anda 16S rRNA sekans analizine dayanmaktadır. Bu metotla geleneksel taksonomik problemler çözülmüştür. Kültüre alınmış suşlara ilave olarak, moleküler ekoloji çalışmaları yeni 16S rRNA sekans tiplerinin belirlenmesine katkı sağlamaktadır (Bryant 1994).

Geliştirilen moleküler yaklaşımlardan önce evrim ve taksonomi arasındaki ilişki, botanik ve bakteriyoloji dünyasında oldukça farklı düşünülmüştür. Cyanophyceae'nin morfolojisine dayanan farklı evrimsel şemalar botanikçiler tarafından önerilmiş ve yayınlanmıştır. Bakteriyel sınıflandırmaların çoğu fenotipik özelliklere dayalıdır ve evrimsel ilişkileri yansıtmamaktadır (Bryant 1994).

Günümüzde filogenetik ve fenotipik özelliklerin kullanımı "polifazik" taksonomi olarak adlandırılmakta ve bu yaklaşım bakteriyel taksonomistler tarafından tavsiye edilmektedir (Murray ve ark. 1990).

Maalesef Siyanobakteriler için var olan moleküler veriler hala çok eksiktir. Bu nedenle morfoloji, avantajları ve noksanlıkları ile hala Siyanobakterilerin taksonomisi için büyük ölçüde kullanılmaktadır. Taksonomik sonuçların karşılaştırılması ve yorumlanmasındaki temel bir problem de, suşların yanlış şekilde identifiye edilmesidir. Diğer bir problem de, bazı suşların isimlerinin değişmesidir. Örneğin “*Anabaena*” sp. PCC 7120 *Nostoc* sp. PCC 7120 olarak yeniden adlandırılmıştır (Bryant 1994).

Stainer ve arkadaşları (1978), Siyanobakterilerin bakteri olduklarını ve bu nedenle isimlendirmenin bakteriyolojik koda göre yapılması gerektiğini savunmuşlardır. Örneğin her bir türün referansı bir herbaryum türü yerine saf bir kültür olmalıdır şeklinde ortaya konulmuştur (Stainer ve ark. 1978).

Stainer ve arkadaşları aksenik kültürler ile belirlenmiş olan fizyolojik ve genotipik karakterlerin kullanımına öncülük etmişlerdir; pigment kompozisyonu, yağ asit analizi, heterotrofik gelişme, nitrojenaz aktivitesi, DNA baz kompozisyonu ve genom uzunluğu gibi karakterleri dikkate almışlardır. Siyanobakterilerin bakteriyolojik taksonomisinin temeli Rippka ve arkadaşları tarafından 1979’da yayınlanmıştır. Bu taksonomik sistem hala büyük oranda morfolojiye dayanmaktadır ve 5 temel bölüm tanımlanmıştır; Chroococcales, Pleurocapsales, Oscillatoriales, Nostocales ve Stigonematales dir.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology kitabının ikinci basımında (2001) 16S rRNA’ya dayalı olarak Siyanobakteriler 5 Altseksiyon’da incelenmiştir.

Altseksiyon I (eskiden Chroococcales)

Bu grubun üyeleri tek hücreli Siyanobakterilerdir. İkiye bölünme ya da tomurcuklanma ile çoğalırlar. Hücreler sferik, elipsoidal ya da çubuk şeklindedir ve hücre boyutu 0,5-30 µm çap arasında değişiklik göstermektedir. Kolonial formlar müsilaj ya da çok katlı kılıf tabaka ile bir arada tutulurlar ve hücreler bölünme düzenine bağlı olarak kümeler oluşturmaktadır. Planktonik formlar genellikle gaz vesikülleri içermektedir. *Prochloron* ve *Prochlorococcus* cinsleri fikobilizom içermezler ve klorofil a ya ilave olarak klorofil b sentezlemektedirler.

Bu grupta yer alan cinsler *Chamaesiphon*, *Chroococcus*, *Cyanobacterium*, *Cyanobium*, *Cyanothece*, *Dactylococcopsis*, *Gloeobacter*, *Gloeocapsa*, *Gloeotheca*, *Microcystis*, *Prochlorococcus*, *Prochloron*, *Synechoccus*, *Synechocystis*'dir. Altseksiyon I üyelerindeki hücre kümeleri çok katlı kılıf ile birarada tutulmaktadır. Ekstraselüler kılıf tabakalarının varlığı birçok Siyanobakteri grubunda stabil bir yapı olarak ortaya çıkmıştır ve birçok tek hücreli cinsin (*Chroococcus*, *Gloeobacter*, *Gloeocapsa*, ve *Gloeoeothece*) tanımlamasında kullanılan temel bir özelliktir. Diğer tek hücreli Siyanobakteriler, özellikle *Synechocystis* cinsini oluşturan bazı üyeler hücre kümesi oluştururlar ve bu küme kapsüler materyal ile birarada tutulmaktadır. Kapsüler materyal üretimi güvenilir olmayan taksonomik bir özelliktir, çünkü kültür ortamındaki üretimi Siyanobakterilerin gelişme fazına ve geliştikleri ortama bağlı olarak değişmektedir. İkiye bölünme bir, iki ya da üç ardışık düzlemde gerçekleşmektedir (Boone ve ark. 2001).

Altseksiyon II (eskiden Pleurocapsales)

Bu bölümdeki Siyanobakteriler yaşam döngülerinin bazı basamaklarında "baeocytes" adı verilen küçük sferik hücreler oluşturarak üremektedirler. Bu üreme hücreleri, ana hücrenin çoklu bölünmesi ile oluşmakta ve fibröz dış duvarın kırılmasından sonra serbest kalmaktadır. Ana hücreden salınan baeocytes sayısı, 4-1000 arasında değişmektedir. Ana hücrenin genişlemesine fibröz dış duvar tabakasının kalınlaşması eşlik etmektedir. Bazı cinslerin türleri çoklu bölünme ile çoğalmaktadır. Diğerleri hücre kümeleri ya da pseudofilamentleri oluşturacak şekilde ikiye bölünme ile çoğalmaktadırlar. Ardından, hücrelerin bazıları ya da tümü çoklu bölünme geçirerek kümeler oluşturmakta ve yeni baeocytes leri salmaktadırlar.

Çoklu bölünme, bu bölümü diğer tüm Siyanobakterilerden ayıran fenotipik bir özelliktir. Çoklu bölünme, vejetatif bir hücrenin baeocyte'ler olarak adlandırılan en az dört sferik yavru hücreye bölünmesi ile başlamaktadır. Çoklu bölünme süresince her bir ardışık bölünmeyi takiben hücre hacminde önemli bir artış meydana gelmemektedir. Her bir yavru hücrenin hacmi ana hücrenin dörtte

biri ya da daha azı kadardır. İkiye bölünmeyi daima hücre gelişimi takip etmektedir. Hücre boyutundaki belli küçülme, çoklu bölünmeyi ikiye bölünme serisinden ayırmaktadır. Bu durum iki işlem arasındaki farklılığı göstermektedir.

Bu grubun üyelerinde, baeocyte sferik ya da oval şekilli vejetatif hücreye genişlemekte ve ardından ardışık çoklu bölünme gerçekleşmekte ve yeni baeocyte'ler salınmaktadır. Genişlemenin ardından, baeocytler çoklu bölünmeyi yeniden başlatmaktadır. Bu gelişme basamağı, ardışık jenerasyonlar ile korunmaktadır. Bazı üyelerde baeocyte genişlemesi vejetatif hücrelerin küçük kümelerini oluşturmak için ikiye bölünme ile takip edilmektedir. Diğerlerinde ikiye bölünme daha kapsamlıdır ve oldukça büyük hücre kümeleri ile sonuçlanmaktadır.

“Pleurocapsaleon” vejetatif hücreleri iki dış hücre tabakasına ilaveten üçüncü bir dış tabaka ile çevrelenmişlerdir. Bu tabakanın elektron mikroskopisi, tabakanın değişen kalınlıkta fibröz bir yapıya sahip olduğunu ve dış membrana oldukça yakın bölgede bulunduğunu göstermektedir.

Vejetatif hücrelerin gelişimi ve genişlemesi süresince peptidoglikan ve dış membran tabakaları büyük oranda genişlemekte ve 1 µm kalınlığa kadar ulaşabilmektedir. İkili bölünme ya da çoklu bölünme süresince fibröz dış duvar tabakaları hücre bölünmesine katılmamakta, böylece ikili bölünmede enine duvar sitoplazmik membran, peptidoglikan ve dış membran tabakalarının içe doğru gelişmesi ile oluşturulmaktadır. Enine duvar oluşumunu takiben, iki yavru hücrenin yüzeyini tamamen örtecek şekilde yeni fibröz dış duvar materyalinin sentezi başlatılmaktadır. Fibröz dış duvar materyalinin tabakaları, vejetatif hücre kümelerinin birarada tutulmasını sağlamaktadır.

Çoklu bölünme süresince fibröz dış duvar materyalinin sentezini iki farklı protein yürütmektedir. Bazı “Pleurocapsalean” cinslerinde ardışık çoklu bölünme ürünleri hemen fibröz dış duvar materyalinin sentezine başlamakta ve bu Gram negatif duvara eksternal olarak depolanmaktadır. Sonuç olarak, baeocyte'ler bir Gram negatif hücre duvarını, ayrıca ince bir fibröz dış duvar tabakasını ifade etmektedirler. Baeocyte'ler vejetatif hücrelerden boyutları ile ayırt edilebilirler fakat duvar yapıları ile ayırt edilemezler.

Bu grubun tüm vejetatif hücreleri hareketsizdir. Fibröz dış duvarın sentezi, çoklu bölünme süresince baskılanmakta ve baeocyte'ler kısa bir süre için (6-24 saat) kayma hareketi gösterebilmektedirler. Hareketli baeocyte'ler ışığa karşı fototaksi gösterebilirler, ışığın yoğunluğuna bağlı olarak ışık kaynağına yönelir ya da uzaklaşırlar. Hareket kaybı, fibröz hücre duvarı sentezinin başlaması ile tesadüf etmekte ve baeocyteler vejetatif hücreye genişlemeye başlamaktadır. Doğada bu grubun üyeleri katı substratlara tutunarak gelişmektedirler.

Bu grup oldukça geniş ekolojik ve fizyolojik özellikler içermektedir. Birçok üyesi suculdur ve genellikle inorganik ya da organik substratlara tutunarak gelişmektedirler. Planktonik hiç bir üyesi bilinmemektedir. Doğada birçoğu endolittir ve kalkerli substratlara bağlanabilirler. Diğerleri karasaldır, genellikle epilitik kabukların bileşenleri olarak ya da soğuk ve sıcak çöllerde kum içerisinde cryptoendolitler olarak gelişmektedirler. Bu grup iki alt gruba ayrılmaktadır. Birinci alt grup, sadece çoklu bölünme ile üreyebilen ya da sınırlı (1-3) ikiye bölünme ile kombine edilmiş üremeye sahip olan gruptur. İkinci alt grup ise, sürekli bir ikiye bölünme ile üremeyi çoklu bölünmenin izlediği üremeye sahip olan gruptur. Bu bölümde yer alan cinsler:

Subgrup I: *Cyanocystis*, *Dermocarpella*, *Stanieria*, *Xenococcus*

Subgrup II: *Chroococcidiopsis*, *Myxosarcina*, *Pleurocapsa*.

(Boone ve ark. 2001).

Altseksiyon III (eskiden Oscillatoriales)

16S rDNA sekans analizlerinden anlaşıldığı üzere bu bölüm filogenetik olarak kolay anlaşılır bir grup değildir. Altseksiyon III uzun bir eksenle, sağ açılarla, tek bir düzlemde sadece ikiye bölünme ile çoğalan filamentöz Siyanobakterileri içermektedir. Heterosist ve akinete oluşturmazlar. İnterselüler ayırım ile oluşan trikom çapları yaklaşık olarak 1 µm ile 100 µm arasında değişmektedir. Trikomlar esnek ya da yarı katı yapıdadır. Bazı durumlarda, tüm trikom gevşek ya da sıkı bir heliks şeklinde kıvrılmaktadır.

Bazı cinslerde gözle görülür bir kılıf bulunmaktadır. Birçok üyede kayma hareketi meydana gelir, bu hareket trikomlar katı ya da yarı katı bir substrat ile

temas ettiğinde gerçekleşir. Bu bölümde yer alan Siyanobakteriler, tatlı su ve deniz gibi oldukça çeşitli habitatlarda plankton, bentik kümeler ve perifiton olarak bulunmaktadır. Kara yüzeyleri, mat'lar ve çimenliklerde de bulunabilmektedirler. Bazı üyeler 62°C deki sıcaklıklarda yaşayabilmektedir. Bu gruptaki türlerin çoğu obligat fototrof, bazıları fakültatif fotoheterotroftur. Fakültatif fotoheterotroflar arasında birkaçı kemoheterotrofik koşullar altında aerobik ya da fermentatif metabolizma ile oldukça yavaş gelişebilmektedir. Suşların çoğu azot fikse etmektedir. Bu grup içindeki Siyanobakterilerin birçok türü de sülfid bağımlı anoksijenik fotosentez bilinmektedir. Bu grupta yer alan cinsler *Arthrospira*, *Borzia*, *Crinalium*, *Geitlerinemia*, *Leptolyngbya*, *Limnothrix*, *Lyngbya*, *Microcoleus*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Prochlorothrix*, *Pseudanabaena*, *Spirulina*, *Starrria*, *Symploca*, *Trichodesmium*, *Tychonema*'dır (Boone ve ark. 2001).

Altseksiyon IV (eskiden Nostocales)

Bu grup, trikomun uzun eksenine dik olarak tek bir düzlemde ikiye bölünme ile çoğalan filamentöz Siyanobakterileri içermektedir. *Nostoc* cinsinin bazı türleri dışında trikomlar daima tek seri halinde bulunmaktadır. *Calothrix* ya da *Scytonema* gibi bazı kılıflı filamentler yalancı dallanma gösterirler. Bu dallanma sadece Altseksiyon V üyelerinde görülen gerçek dallanmadan farklı bir gelişimsel işlemdir ve birden fazla düzlemde bölünmeyi gerektirmektedir. Birçok cins örneğin incelen trikomlar gibi, filamentlerin bazal-apikal polaritesi ile tanımlanmaktadır. Apikal uç, genellikle ince ve renksiz hücreler şeklinde sonlanmaktadır. Bu grubun üyeleri arasında trikom çapı oldukça değişken olup, 2-15 µm arasında değişmektedir. Bağlı azot yokluğunda (amonyum ya da nitrat) vejetatif hücrelerin %5-10'u heterosistlere farklılaşmaktadır.

Bu grubun bazı üyeleri akinete oluşturmaktadır. Bu yapılar soğuğa ve kuraklığa karşı dirençlidir. Bu kalın duvarlı hücreler, genellikle sarı-kahverengi görünümündedirler. Akineteler ışık ya da besin sınırlaması olduğunda oluşmakta ve heterosistlerden ya uzak ya da bitişik şekilde yerleşmektedirler.

Birçok üye, hormogonia oluşumunu içeren farklı bir döngü geçirmektedir. Farklılaşma en iyi taze kültür yaşlandıktan sonra ortaya çıkmaktadır. Çoğu hormogonia, ana trikomdan kayma hareketi ile ayrılmakta ve trikom uzunluğu azalarak hücreler küçülmektedir. Hormogonia'lar gelişim olmadığında, hızlı ardışık hücre bölünmeleri ile oluşturulmaktadır. Hormogonial hücreler şekil bakımından ve/ya da gaz vesikül kümeleri bakımından da farklılık gösterebilmektedirler. Oldukça yoğun kılıfa sahip olgun filamentler ile karakterize edilen türlerde, hormogonia kılıfsızdır ya da ince bir kılıf içermektedir. Cins düzeyine bakmaksızın, yeni salınan hormogonia'da asla heterosist görünmez, bu durum bağlı azot içermeyen ortam olsa bile geçerlidir. Sonuç olarak, hormogonia, azot fikse etmemektedir.

Bazı cinsler farklı bir gelişimsel döngü sergilemezler, trikomlar ya gelişimin tüm basamaklarında hareketlidir ya da çoğu planktonik temsilciler gibi sürekli olarak hareketsizdirler.

Anabaena, *Aphanizomenon* ve *Gloeotrichia*'nın birçok türü planktoniktir ve tropikal tatlı su göllerinde ya da ılıman su bloom'larındaki temel bileşenlerdendir. *Anabaenopsis*, *Cyanospira*, ve *Nodularia* tuz gölleri ve acı su bloom'larında tipik olarak bulunmaktadır. Deniz habitatlarında planktonik heterosist Siyanobakteriler nadir olarak bulunmaktadır. Birçok temsilcisi soğuklarda ve şiddetli kurak koşullarda yaşayabilmektedir. Ancak hiçbirisi 52-54°C yi aşan sıcak ortamlarda bulunmamaktadır. Bu bölümün bazı üyeleri, konukçuya fikse azot sağlayarak ve fikse karbon elde ederek endosimbiyont ya da ekzosimbiyont olarak bulunmaktadır. En yaygın simbiyotik konukçular, ascomycetes, ciğerotları, eğreltiotları, cycad'lar ve *Gunnera* angiospermidir. Kayma hareketi, oldukça yavaş bir düzen içerisinde gerçekleşmekte ve hormogonia ya da olgun trikomlar dönme hareketi yapmamaktadır.

Altseksiyon IV üyelerinin Altseksiyon III üyelerinden ayırımı 16S rRNA sekans verileri ile desteklenmiştir. Trikom morfolojisindeki farklılıklara dayanarak Altseksiyon IV iki kısımda (IV.I ve IV.II) tanımlanmaktadır. Ancak bu ayırım, filogenetik bir grupta değil, sadece tanımlamayı kolaylaştırmak için yapılmıştır.

Altseksiyon IV.I Siyanobakterilerinde trikomlar asla bazal-apikal polaritesi göstermezler, tüm vejetatif hücreler eş boyuttadırlar. Azotun sınırlı olduğu koşullarda, bazı üyeler heterosistleri özellikle terminal ya da interkalar pozisyonda, diğerleri hem terminal hemde interkalar pozisyonda oluşturabilmektedirler. Eğer varsa akineteler tek tek ya da kısa zincirler (iki ya da üç akinete) halinde, heterosistlere çok yakın ya da bitişik şekilde oluşturulabilmektedir. Bazı üyelerde, akineteler iki heterosist arasında eşit mesafede yer almaktadır. Birinci akinetenin her iki yana doğru ardışık farklılaşması genellikle oldukça uzun akinete zincirlerinin oluşumuna neden olmaktadır, bu da hücre popülasyonunun çoğunluğunu oluşturmaktadır. Altseksiyon IV.I. bölümünde yer alan cinsler *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Aphanizomenon*, *Cyanospira*, *Cylindrospermopsis*, *Cylindrospermum*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Scytonema*'dır.

Altseksiyon IV.II alt bölümü botaniksel ismi "*Rivulariaceae*" familyasına ait *Calothrix* ve *Rivularia* cinslerini, "*Scytonemataceae*" familyasına ait olan *Tolpothrix* ve "*Microchaetaceae*" familyasına ait olan *Microchaete* cinslerini içermektedir. *Calothrix* ve *Rivularia* cinsleri, farklı bir bazal-apikal polaritesine sahip ve oldukça incelen olgun trikomlar sergilemektedir. Yeni salınmış hormogonia bazal-apikal polaritesi ne sahip değildir. Hızlı bir kayma hareketi göstermekte ve olgun trikomlardan hücre boyutu ve morfolojisi bakımından farklılık göstermektedir. *Tolpothrix* ve *Microchaete* "rivulariacean" cinsi ile birçok yapısal ve gelişimsel özellikleri paylaşmaktadırlar fakat olgun trikomlar, bağlı azot yokluğunda gelişmeler bile çok az derecede incelme göstermektedirler (Boone ve ark. 2001).

Altseksiyon V (eskiden Stigonematales)

Bu bölümdeki cinsler, Siyanobakteriler içerisinde yüksek derecede morfolojik komplekslik ve farklılaşma göstermektedirler. Enine hücre bölünmesine ek olarak, boyuna ve eğik hücre bölünmeleri de gerçekleşmektedir. Bu durum tüm cinslerde periyodik gerçek dallanma ile ve bazı cinslerde çoklu seri halinde trikomların oluşumu (iki ya da daha fazla hücre sırası) ile sonuçlanmaktadır. Bazı cinslerde yalancı dallanma da meydana gelmektedir. Bu

cinslerin bazılarında trikom hücreleri arasında çukur benzeri sinapslar ya da por kanalları oluşmaktadır. Heterosistler interkalar ve terminaldir. Üreme trikomun rastgele kırılması ile olduğu halde, hormogonia da çoğu suşda oluşmaktadır. Akineteler ya da akinete benzeri hücreler bazı cinsler tarafından oluşturulmaktadır. Çoğu durumda trikom genişliği tek bir klon içerisinde bile oldukça değişkendir. Kültüre alınmış en iyi bilinen sucul formlar *Fischerella*'nın çeşitli izolatlarıdır. 57-58°C sıcaklığa sahip akışkan sularda bulunmaktadırlar. Bu grup Siyanobakterilerin büyük bir kısmının az asidik oligotrofik göller ve hızlı akan derelerden elde edildiği bilinmektedir. Bu bölümün bazı üyeleri ekstraselüler kılıflarında UV-absorbe eden koruyucu bir pigment (scytonemin) üretebilirler. Elde edilen bulgulardan, kültüre edilememiş birçok cinsin var olduğu bilinmektedir. Bu bölümde yer alan cinsler *Chlorogloeopsis*, *Fischerella*, *Geitleria*, *Lyngariella*, *Nostochopsis*, *Stigonem*'dir (Boone ve ark. 2001).

1.2.8.1. Siyanobakteriler ile Kemotaksonomik Çalışmalar

Moleküler metotlar ile Siyanobakteriyel taksonomi çalışmaların, kemotaksonomik markırlar içermesi gerekmektedir. Oldukça kolay ve hızlı belirleme metotları bulunmaktadır. Ancak bu konuda oldukça az veri vardır ve birçok çalışma hala başlangıç aşamasındadır (Bryant 1994). Siyanobakterin lipit kompozisyonu ile yapılmış bir çalışmada altmış altı Siyanobakteriyel suşun yağ asit kompozisyonu Kenyon ve arkadaşları tarafından çalışılmıştır (Kenyon 1972; Kenyon ve ark. 1972). *Anabaena* ve *Calothrix* grupları için uniform bir yağ asit kompozisyonu elde edilirken diğer gruplar için uniform bir asit kompozisyonu elde edilememiştir. Sallal ve ark. (1990) üç heterosistli suşda oldukça polar bilinmeyen bir glikolipit belirlemişlerdir. Ayrıca alkol glikozitlerinin azot fikse eden suşlar ile sınırlanmadığını da göstermişlerdir. Caudales ve arkadaşları serbest yaşayan *Nostoc* ve *Anabaena* cinsi suşlarının ve *Azolla* sp. simbiyontunun yağ asidi kompozisyonlarını belirlemişlerdir (Caudales ve Wells, 1992; Caudales ve ark. 1992). Sonuçlar yorumlandığında simbiyontların her iki cinsten eşit uzaklıkta olduğu görülmüştür.

Lipit kompozisyonu dışında bakteriyel sistematikte kemotaksonomik markır olarak polyaminlerin kullanılabilirliği incelenmiştir. Bu güne kadar test edilen suşlardaki baskın polyaminler, spermidin ya da sym-homospermidindir (Hamana ve Matsuzaki 1992).

Diğer bir kemotaksonomik araç olan karatenoidler fotosentez, beslenme ve fotooksidatif hasara karşı koruma gibi önemli fonksiyonlara sahiptirler. Karatenoidler, tüm fotosentetik algler ve bakteriler ve hatta birçok fotosentetik olmayan eubakteri türleri tarafından üretilmektedir. Siyanobakterilerdeki karatenoidler iki temel fonksiyona sahiptir. Birincisi, fotosentezde ışık toplayıcı pigmentler olarak görev yaparlar, ikinci fonksiyonu ise fotooksidatif hasarlara karşı korumadır.

Siyanobakterilerdeki karatenoid kompozisyonunun kromatografi ile yapılan analiz sonuçları, profillerdeki değişikliğin türlerin identifikasyonu için yararlı olduğu fakat daha yüksek taksonomik düzeyleri belirlemek için yararlı olmadığını ortaya koymuştur. Benzer karatenoid profilleri, 16S rRNA sekansları hemen hemen benzer olan *Phormidium ectocarpi* PCC 7375 ve *Phormidium persicinum* suş CCAP 1462/5 için elde edilmiştir. Ancak aynı türlerin kırmızı ya da yeşil izolatlarında karatenoid içeriği ve kompozisyonunun farklı olması, bu karakterin taksonomik çalışmalarda kullanımını sınırlandırmıştır (Bryant 1994).

1.2.8.2. Siyanobakteriler ile Makromoleküler alışmalar

Makromoleküller, nükleik asitler ve proteinler genetik bilginin kopyalarıdır ve bu nedenle filogenetik ilişkilerin yorumlanması için iyi bir araç olabilmektedirler. 16S rRNA, Siyanobakteriler içerisindeki evrimsel ilişkilerin en detaylı hipotezini vermektedir. Makromoleküller direkt olarak, sekanslanarak ya da elektroforez, hibridizasyon veya immünolojik metotlar ile indirekt olarak alışlabilmektedir. Protein elektroforezi ile yapılan çalışmalardan α -esterase izozyme profilleri kullanılarak yapılan taksonomik bir çalışmada elde edilen protein bantları test edilen on üç Oscillatoriaceae suşları arasındaki suş ilişkisinin dört kümede tanınmasını sağlamıştır. Bu sonuç daha sonra 16S rRNA sekans analizi ile de doğrulanmıştır. Diğer bir çalışmada malat dehidrogenaz

elektroforetik profilleri sekiz Siyanobakteriyel suşu karakterize etmek için kullanılmış ve ayrılan bantların *Anabaena* ve *Nostoc* cinslerine ait olduğu gözlenirken, iki tek hücreli suş, *Synechococcus* sp. PCC 6301 ve *Synechococcus elongatus* suş CCAP 1497/1 arasında ise ortak bant elde edilememiştir. Başka bir çalışmada ise beş *Zamia integrifolia* (cycad) bitkisinden izole edilmiş on iki Siyanobakteriyel simbiyonta ait altı enzimin zymogramları benzer bulunurken, farklı bir cycad türünün simbiyontu ve aynı bölgedeki topraktan izole edilen bir *Nostoc* türü için elde edilen bant profillerinde farklılıklar gözlenmiştir (Bryant 1994).

Diğer bir araç olarak fikobiliprotein profilleri kullanılarak yapılan bir çalışmada yirmibir Siyanobakteriyel türdeki fikobiliprotein profillerini polyakrilamid disk-jel elektroforezi ile incelenmiştir. Aynı türe dahil olan suşlar arasında bile belirgin bir farklılık gözlenmiştir. Bu nedenle araştırmacılar bu metodun sadece benzer türlerin identifikasyonu için yararlı olduğunu fakat sınıflandırma şemasının kurulması için yararlı olmadığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar *Pseudoanabaena* cinsinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile fikobiliprotein alt ünitelerinin elektroforetik profillerini belirlemişlerdir. Fikosiyaninin dört alt ünitesini tüm *Pseudoanabaena* cinsinin sentezleyemediğini ortaya koymuşlar ve bu nedenle PCC 7403 suşunu bu cinsten hariç tutmuşlardır. Bu farklılık diğer moleküler markırlar tarafından desteklenmiştir. Ayrıca, fikoeritrosiyanin sentezleyebilen suşlar için Pastör Kültür Koleksiyonu'nun tümü incelenmiştir. Fikobiliproteini sentezleyememe yeteneğinin taksonomik bilgi açısından yarar sağlamadığı kabul edilmiş ancak bu proteini sentezleme yeteneği, heterosist içeren filamentöz Siyanobakterilerin cins düzeyindeki tanımlamasında önemli bir özellik olarak kabul edilmiştir. Ayrıca fikoeritrosiyanin oluşturma yeteneği *Chroococciopsis* üyelerinde de bulunmuştur (Bryant 1994).

Siyanobakteriyel sistematik çalışmalar için proteinlerin immunolojik karşılaştırmaları ile ilgili çalışmalar çok sınırlıdır (Bryant 1994).

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) tekniği genellikle populasyondaki organizmaları sınıflandırmak ve identifiye etmek için kullanılmaktadır. Bu teknik Siyanobakteriyel simbiyontları çalışmak için de oldukça güçlü bir teknik olarak kabul edilmekte ve bu konuda çok fazla sayıda

çalışma bulunmaktadır (Lindblad ve ark. 1989; Lyra ve ark. 1997; Margheri ve ark. 1999; Lyra ve ark. 2001; Iteman ve ark. 2002; Bauer ve ark. 2008).

DNA baz kompozisyonu da az sayıdaki moleküler karakterlerden birisidir. DNA baz kompozisyonundaki büyük farklılıklar, suşlar arasında yakın ilişki olamayacağını belirtmektedir. Benzer G+C yüzdeleri de genotipik ilişkileri değerlendirmede bir ipucu sağlamamaktadır (Bryant 1994; Kondo ve ark. 2000).

Wayne ve ark. (1987) eubakteriyel türlerin tanımlanması için DNA-DNA hibridizasyonlarının kullanımını önermişlerdir. Siyanobakteriler için DNA-DNA-hibridizasyon metodunun kullanımına Stam öncülük etmiştir. Aynı türlerde en az %70 hibridizasyon oranı olması gerekmektedir, farklı türler için ise bu oran %20 olarak bildirilmiştir.

rRNA genlerinin sekansları mikrobiyal evrim ve ekoloji çalışmalarında önemli bir rol oynamaktadır. 16S rRNA özellikle filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde, çevredeki çeşitliliğin ve spesifik popülasyonların değerlendirilmesinde kullanılan önemli bir moleküler markıdır. Filogenetik analizlerde, moleküler taksonomik markılar olarak kullanılan genler universal olmalı, horizontal olarak transfer edilmemeli ve spesifik koşullara göre herhangi bir mutasyona uğramamalıdır (Yamamoto ve Harayama 1995).

16S rRNA gen sekanslarının karşılaştırmalı analizi suş koleksiyonları ve doğal komüniteler arasındaki farklılığı incelemeye önemli bir araç sağlamaktadır (Ferris ve ark. 1996). rRNA operonları universal olarak dağılmıştır ve organizmalar arasındaki filogenetik ilişkilerin karşılaştırılmasına ve filogenetik ağaçların yapılmasına izin vermektedir. rRNA lar genellikle protein kodlayan genlerden ziyade horizontal gen transferlerinden az etkilenen informatif gen kümesinin bir parçasıdır ve bu nedenle evrimsel değişimlerin değerlendirilmesinde oldukça sağlam bir iskelet sağlamaktadır. rRNA'lar fonksiyonel olarak korunmuş ve değişebilen sekans uzunluklarından oluşurlar ve bu da uzak ve yakın ilişkili türler arasındaki farklılaşmaya izin vermektedir. Internal Transcribed Spacer (ITS) bölgesi gibi daha değişken bir bölge, oldukça yakın ilişkili türler arasındaki ayırımı oldukça yardımcı olmaktadır. ITS sekansları her bir tür arasında farklı olabilmektedir. Bu farklılık sadece baz kompozisyonu bakımından değil ayrıca uzunluk bakımından da olabilmektedir

(Janse ve ark. 2003; Marquardt ve Palinska 2007). Bu durumun PCR primerlerinin ve hibridizasyon problemlerinin tasarımını ve bunların mikrobiyal ekolojide kullanımını sağladığı öne sürülmüştür (Acinas ve ark. 2004). 16S rRNA genlerinin sekansı kültüre alma koşullarından bağımsızdır ve laboratuvar kültürlerinden ya da çevresel örneklerden elde edilen DNA dan PCR reaksiyonunun kullanımı ile kazanılabilmektedir (Wilmotte, 1994; Steindler ve ark. 2005).

Eubacteria üyelerinde 16S, 5S ve 23S bir operon içerisinde organize olmuştur, bu operon genellikle internal transcribed spacer (ITS) ve en az bir tRNA içermektedir. Bu operonların kopya sayısı her bir bakteriyel genomda 1 den 15'e kadar değişmektedir. Ancak Siyanobakteriler içerisinde ortalama kopya sayısı çok düşüktür ve bir Siyanobakteriyel genomun rRNA operonunun iki kopya içerdiği tahmin edilmektedir. En yüksek kopya sayısı *Anabaena flos-aquae* (bir genom beş kopya) için belirlenmiştir (Iteaman et al., 2002). Bir genom içerisindeki sekans heterojenitesi, farklı kopyaların sekansları benzer olmadığı durumlarda mikrobiyal komünitelerin bağımsız analizi için büyük bir problem oluşturabilmektedir. Bu nedenle, rRNA'nın küçük alt birimi kullanılarak yapılan filogenetik analizler, organizmalar arasındaki farklılığı çözmeye yardımcı olduğu halde, bazen her bir türün genom evrimini bütünüyle yansıtmak zor olabilmektedir (Acinas ve ark. 2004).

16S rRNA, eubakterilerin evrimini çalışmak için yeterli bir makromolekül olarak görünmektedir. Bu nedenle özellikleri ve kullanımı oldukça önemlidir

- 16S rRNA'lar evrensel moleküllerdir. Tüm canlılarda bulunması, aynı atadan çok eskiden geliştiği ve oldukça az değişime uğradığını belirtmektedir.
- Protein sentezindeki fonksiyonu hücre yaşamı için temeldir ve belli domainler üzerindeki fonksiyonel sınırlamalarının stabil olduğu düşünülmektedir.
- Sekonder yapısı oldukça korunmuş olmasına rağmen, primer yapısı evrimsel olarak korunmuş ve değişebilen bölgelerden oluşan bir mozaiktir.

- 16S rRNA, yaklaşık 1500 nükleotid içeren uzun bir moleküldür. Bu çok sayıda karakterin kombinasyonunu sağlar ve istatistiksel bir evrim bilgisine izin verir.

- Bu karakter için lateral gen transferi elde edilmemiştir.

- 16S rRNA, iyi bir moleküler kronometredir.

Taksonomide keşfedilmiş olan spesifik genetik markırlar konusuna gelince grup I intronlarının farklı tipleri Siyanobakterilerde farklı evrimsel geçmişe sahip olabilmektedir ve bu sekansların bazıları lateral gen transferleri aracılığı ile dağılmış olabilmektedir. Bununla birlikte bazı liken simbiyontları durumunda, grup I intron analizi yararlı bir teknik olarak ileri sürülmektedir. Moleküler çalışmalar, bir ya da iki morfolojik karakter ile sınırlandırılmış olan türleri, yakın ilişkili olarak kabul etmemektedir (Bryant 1994; Paulsrud ve ark., 1998).

1.2.9. Siyanobakterilerin Biyoteknolojideki Potansiyel Uygulamaları

Güneş enerjisinin biyolojik dönüşümü çevre kirliliği olmadan hidrojen elde edilmesi için olası bir yaklaşımdır. Yeşil algler gibi azot fikse eden Siyanobakteriler, güneş enerjisi biyo dönüşüm sistemlerinde potansiyel olarak kullanılmaktadırlar. Suyu kullanarak hidrojen salma kabiliyetleri Siyanobakterilerin önemli bir özelliğidir. Son yıllarda bu konuda önemli gelişmeler elde edilmiştir (Tsygankov 2007). Siyanobakteriler çeşitli şekillerde insanlığa yarar sağlayan potansiyel organizmalardır. Siyanobakteriler gıda, yakıt, gübre, tıp gibi çeşitli endüstrilerde ve kirlilikle mücadele gibi uygulamalarda sürekli bir potansiyel oluşturmaktadırlar (Thajuddin ve Subramanian 2005).

Gıda

Algal proteinler ya katkı maddesi olarak ya da alternatif bir kaynak olarak dünyanın ilgisini çekmektedir. Bazı *Anabaena* ve *Nostoc* suşları Şili, Meksika, Peru ve Filipinlerde gıda maddesi olarak tüketilmektedir. *N.commune* yüksek miktardaki lif ve orta derecedeki protein içeriği ile yeni bir diyet kaynağı olarak potansiyel kullanıma sahiptir. *Spirulina* mükemmel besin içeriği ve

sindirilebilirliği ile gıda katkısı olarak kullanılmaktadır. Spirulina %60-70 protein, %20 karbonhidrat, %5 lipit , %7 mineraller ve %6 su içermektedir. Ayrıca zengin bir beta-karoten, thiamine, ve riboflavin kaynağıdır ve vitamin B₁₂'nin en zengin kaynaklarından birisidir. Ticari olarak toz, granül, tablet ya da kapsül halinde marketlerde satılmaktadır. Denizcil azot fikse eden Siyanobakterilerin büyük bir kısmı besinsel değerlerine göre test edilmiştir ve çoğu gıda katkısı olarak kullanılabileceği kabul edilmiştir (Thajuddin ve Subramanian 2005).

Kimyasallar

Pigmentler, vitaminler ve enzimler gibi hassas kimyasalların çoğu Siyanobakterilerden ticari olarak elde edilmektedir. Siyanobakterilerin büyük bir kısmı vitamin bakımından zengindir ve çevrelerine salgırlar. Bazı deniz Siyanobakterileri B-kompleks grubu vitaminler ve E78 gibi ticari önemi olan vitaminlerin büyük ölçekli potansiyel kaynaklarıdır. Karatenoidler ve fikobiliproteinler büyük ticari öneme sahiptirler. Bunlar gıdalarda renklendirici olarak, Som balıklarının ten rengini arttırmak ve sığırlarda sağlığı ve verimliliği arttırıcı olarak kullanılmaktadır. *Phormidium valderianum* mükemmel bir fikosiyanın kaynağıdır, bu doğal mavi bir renklendirici olarak kullanılmaktadır (Thajuddin ve Subramanian 2005).

Fototrof olan Siyanobakteriler 14CO_2 , 13CO_2 , $33\text{H}_2\text{O}$, 15NO_3 gibi basit, işaretli bileşikleri kompleks organik moleküllere transfer edebilirler. Lipitler ve amino asitler gibi izotopik olarak işaretli Siyanobakteriyel metabolitler ticari olarak bulunmaktadır (Thajuddin ve Subramanian 2005).

Siyanobakteriler tarafından sentezlenen enzimler ticari olarak kullanılmaktadır. Örneğin laktamaz, proteaz, ve lipaz gibi enzimlerin büyük ölçekli olarak üretimi denizcil Siyanobakteriler kullanılarak yapılmaktadır. *Anabaena cylindrica* (Acy I), *Anabaena flos-aquae* (Afl I & Afl III), *Anabaena variabilis* (AvaI & AvaII), *Anabaena variabilis* UW (AvrII), *Microcoleus* sp. UFE_X 2220 (MstII), *Nostoc* sp. PCC 7524 (Nsp C I)'dan elde edilmiş birçok sekans-spesifik endonüklezlar bilinmektedir. Alkalın fosfotaz aktivitesi ile

organik fosforu mineralize eden Siyanobakteriler yayınlanmıştır. Kitinaz, L-asparajinaz, L-glutaminaz, amilaz, proteaz, lipaz, selulaz, üreaz ve süperoksit dismutaz gibi enzimler Siyanobakterilerden elde edilmektedir. Siyanobakteriler tarafından amonyak ve amino asitlerin fotoüretimi bildirilmiştir. *N.muscorum* ve *Hapalosiphon fontinalis* tarafından salınan ekstraselüler gelişmeyi-destekleyici maddelerin analizi, serin, arjinin, glisin, aspartik asit, threonin, glutamik asit, sistin, prolin, valin, ornitin, lizin, histidin ve isolösin gibi amino asitleri içerdiğini göstermiştir. Ayrıca Siyanobakteriler, polyoller, polisakaritler, lipitler, yağ asitleri, halojenlenmiş bileşikler bakımından oldukça zengin bir kaynaktır (Thajuddin ve Subramanian 2005).

Farmasötikler

Siyanobakteriler, bilinen ve geniş farmasötik uygulamaları ile toksinleri içeren yeni biyoaktif bileşenlerin en zengin kaynaklarından birisidir. *Lyngbya lagerheimii* ve *Phormidium tenue*'den elde edilen deniz Siyanobakteriyel bileşiklerin anti-HIV aktivitesi bildirilmiştir. Ayrıca, deniz Siyanobakterilerinden elde edilen ekstraktların antiviral, antibakteriyel, antifungal ve immuno-modülatör ve anti-candida aktivitesine sahip oldukları gözlenmiştir. Medikal önemi olan gamma linolenik asit (GLA) *Spirulina platensis* ve *Arthrospira* sp. de oldukça zengindir, bu madde insan vücudunda kolaylıkla arachidionic asit ve daha sonra prostoglandin E2'ye dönüştürülmektedir. Prostoglandin E2 kan basıncını düşürücü etkiye sahiptir ve de lipit metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır (Thajuddin ve Subramanian 2005).

Gübre

Azot fikse eden Siyanobakteriler pirinç yetişen tropikal toprakların verimliliğine katkıda bulunmaktadır. Heterosist oluşturan Siyanobakteriyel suşlar, pirinç tarlalarını kolonize edebilirler ancak heterosist içermeyen bir çok Siyanobakteri atmosferik azotu mikroaerofilik koşullar altında fikse edebilmektedir. Pirinç tarlalarının verimliliğinin korunmasında azot fikse eden

Siyanobakterilerin rolü kanıtlanmıştır. Siyanobakteriyel inokülasyonun yararlı etkileri arpa, yulaf, domates, turp, pamuk, şekerpancarı, mısır, kırmızıbiber, marul gibi diğer ekinlerde de gösterilmiştir. Pirincin kültüre alınmasında organik bir gübre olarak *Azolla*'nın önemi iyi değerlendirilmekte ve birçok ülkede yaygın şekilde kullanılmaktadır. Siyanobakteriyel simbiyont *Anabaena-azollae*'nin birim hektar başına 120-312 kg azot fikse ettiği tahmin edilmektedir. Algler ve Siyanobakteriler oksijen oluşumuna ve mineralizasyona neden oldukları için farklı yollardan atık arıtılmasında yarar sağlamaktadırlar. Ayrıca sucul türler için besin kaynağı olarak görev yaparlar. *Phormidium valderianum* BDU 30501'un 50 mg/ml seviyesindeki fenol konsantrasyonunu tolere edebildiği ve yedi günlük bir alıkonma periyodu içerisinde 38 mg/ml sini uzaklaştırabildiği bildirilmiştir. Bu sonuçlar fenol içeren atıkların arıtılmasına olanak sağlamaktadır. Bu organizma ayrıca ağır metal içeren iyonların optimal adsorbsiyon/desorbsiyon unda etkili olmuştur. Diğer deniz Siyanobakterisi *Oscillatoria boryana* BDU 92181 içki fabrikası atıklarında bol bulunan melanoidin pigmentinin metabolizasyonu ve degradesyonunda etkili olmuştur. National Facility for Marine Cyanobacteria (NFMC)'daki çalışmalar pestisitler, deterjanlar, antibiyotikler ve diğer molekülleri içeren zararlı atıkların ve lignolitik aktivitelerinden dolayı katı atıkların büyük bir kısmının arıtılması amacıyla kullanılan etkili Siyanobakterileri tanımlamışlardır. Bu nedenlerden dolayı birçok ülke, Siyanobakteriyel biyoçeşitliliği korumak ve anlamak ayrıca da kirliliğin azaltılması gibi çeşitli uygulamalar da kullanmak için çalışmalar yapmaktadır (Thajuddin ve Subramanian 2005).

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Su Örnekleri

Su örnekleri, Porsuk Çayı üzerinde belirlenen 21, Seydisuyu üzerinde 4 farklı istasyondan ve Eskişehir Kırka Bor işletmesinin bor havuzundan, yaklaşık 2 ayda bir, dönüşümlü olarak Devlet Su İşleri (DSİ), su analiz laboratuvarındaki yetkili kişiler ile birlikte alınmıştır. Bu istasyonlar ve numaraları Çizelge 2.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Porsuk çayı ve Seydi suyu üzerindeki istasyon isim ve numaraları

	İstasyon ismi	İstasyon numarası
1	Porsuk çayı arıtma girişi regülatör (Ağaçköy)	(010)
2	Porsuk çayı pis su arıtma öncesi	(202)
3	Porsuk çayı pis su arıtma sonrası	(203)
4	Porsuk azot öncesi	(205)
5	Porsuk azot sonrası	(206)
6	Porsuk çalça istasyonu	(011)
7	Porsuk çayı beşdeğirmen istasyonu Kütahya çıkışı	(012)
8	Porsuk sabuncupınar köprüsü baraj girişi	(094)
9	Porsuk baraj çıkışı	(047)
10	Eskişehir temiz su arıtma öncesi (Eşenkara)	(100)
11	Porsuk Eskişehir temiz su arıtma sonrası	(013)
12	Porsuk çayı Atatürk caddesi köprüsü	(236)
13	Porsuk çayı Eskişehir Şeker fabr.öncesi	(238)
14	Porsuk çayı Eskişehir Şeker fabr.sonrası	(239)
15	Porsuk çayı Eskişehir Pis su arıtma öncesi	(237)

16	Porsuk çayı Eskişehir Pis su arıtma sonrası	(015)
17	Porsuk çayı Alpu	(072)
18	Porsuk çayı Yeşildon	(016)
19	Porsuk çayı Beylikova	(017)
20	Porsuk çayı Yunusemre	(018)
21	Porsuk çayı Sazılar	(019)
22	Kunduzlar baraj çıkışı (Seydisuyu)	(136)
23	Çatıören baraj çıkışı (Seydisuyu)	(137)
24	Seydi suyu Kozyaka (Seydisuyu)	(008)
25	Seydi suyu Hamidiye (Seydisuyu)	(156)
26	Boraks çöktürme havuzu	

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

2.1.2.1. BG-11

NaNO ₃	1,5 g
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,04 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,075 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,036 g
Ac.citrique	0,006 g
Citrate ferrique	0,006 g
EDTA	0,001 g
Na ₂ CO ₃	0,02 g
NaHCO ₃	0,15 g
Microelements A	1 ml
Agar (g)	15 g
Cycloheximide	0,5 g

Yukarıda verilen bileşenler tartılmış ve hacim 1000 ml'ye distile su ile tamamlanarak, 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Abelson ve Simon 1988).

2.1.2.2. BG-11₀

K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,04 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,075 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,036 g
Ac.citrique	0,006 g
Citrate ferrique	0,006 g
EDTA	0,001 g
Na ₂ CO ₃	0,02 g
Microelements A	1 ml
Agar (g)	15 g
Cycloheximide	0,5 g

Yukarıda verilen bileşenler tartılmış ve hacim 1000 ml'ye distile su ile tamamlanarak, 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Abelson ve Simon 1988).

2.1.2.3. Microelements A

H ₃ BO ₃	2,86 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,222 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,390 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,079 g
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,049 g (ya da CoCl ₂ . 6H ₂ O 0,050 g)

Yukarıda verilen bileşenler tartılarak, hacim distile su ile 1000 ml' ye tamamlanmıştır. BG-11 ve BG-11₀ besiyerlerine belirtilen miktarda aktarılması amacıyla hazırlanmıştır (Abelson ve Simon 1988).

2.1.2.4. Luria Bertani (LB) Besiyeri

NaCl	10 g
Yeast Ekstrakt	5 g
Tripton	10 g

Yukarıdaki bileşenler tartılmış ve hacim distile su ile 1 litreye tamamlanarak pH 7,2'ye ayarlanmıştır. Hazırlanan besiyeri 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Katı besiyerinin hazırlanması %2 agar ilavesi ile yapılmıştır (Dhaulakhandi ve ark. 2006).

2.1.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

2.1.3.1. TAE 50X (1L için)

Tris base	242 g
Asetik asit	57,1 ml
EDTA (0,5M pH 8)	100 ml

Son hacim distile su ile 1 litreye tamamlandıktan sonra, pH 8'e ayarlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır (Sambrook ve ark. 1989).

2.1.3.2. Filtreler İçin Lizis Tamponu

40 mM EDTA
400 mM NaCl
0,75 M Sukroz
50 mM Tris HCl (pH 8,3)

Yukarıda verilen konsantrasyonları sağlayacak şekilde hazırlanan lizis tamponu ağzı kapaklı cam şişe içerisine konularak oda sıcaklığında saklanmıştır (Boutte ve ark. 2005).

2.1.3.3. TE⁻⁴ Tamponu

10 mM Tris HCl (pH 7,5 ya da 8,3)

0,1 mM EDTA

Yukarıda belirtilen konsantrasyonda cam şişe içerisinde hazırlanmış olan tampon -20°C'de saklanmıştır (Sambrook ve ark. 1989).

2.1.3.4. %0 Denature Edici DGGE Stok Solüsyonu

Acrylamide/Bis 30% (Protogel national diagnostics) 21,66 ml

TAE 50X 2 ml

Yukarıda verilen bileşenler bir balon jöle içerisine konulmuş ve hacim ultra saf su ile 100 ml' ye tamamlanmıştır. Solüsyon Nalgene filtre kullanılarak steril şişelere filtre edilmiş ve 4°C'de saklanmıştır (Boutte ve ark. 2006).

2.1.3.5. %100 Denature Edici DGGE Stok Solüsyonu

Acrylamide/Bis 30% (Protogel national diagnostics) 21,66 ml

Üre 42 g

Deiyonize Formamide 40 ml

TAE 50X 2 ml

Yukarıda verilen bileşenler bir balon jöle içerisine konulmuş ve hacim ultra saf su ile 100 ml' ye tamamlanmıştır. Solüsyon Nalgene filtre kullanılarak steril şişelere filtre edilmiş ve 4°C'de saklanmıştır (Boutte ve ark. 2006).

2.1.3.6. %10 Amonyum Persülfat Solüsyonu

Amonyum persülfat	10 g
Distile su	100 ml

Hazırlandıktan sonra küçük hacimler halinde ependorflara paylaştırılarak - 20°C’de saklanmıştır (Sambrook ve ark. 1989).

2.1.3.7. %10 SDS Solüsyonu

Sodyumdodesilsülfat (SDS)	10 g
Distile su	100 ml

Hazırlandıktan sonra oda sıcaklığında saklanmıştır (Sambrook ve ark. 1989).

2.1.3.8. Sal-EDTA solüsyonu

Çözeltide 0,15 M NaCl ve 0,01 M EDTA olacak şekilde karıştırılmış ve pH, HCl ile 8,5’a ayarlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır (Sambrook ve ark. 1989).

2.1.3.9. Çalışmada Kullanılan Primerler

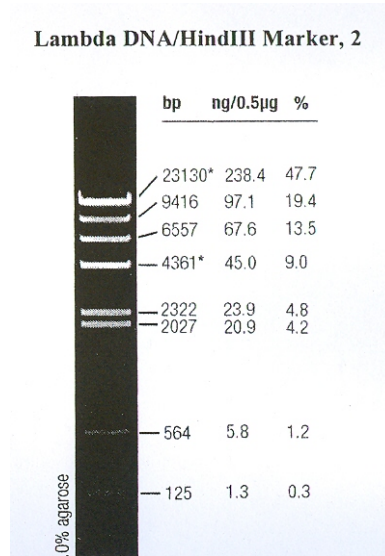
Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan primerler (Taton ve ark. 2003; Boutte ve ark. 2005; Boutte ve ark. 2006).

Primer ismi	Sekans (5’-3’)	Pozisyon 3’ ucu
CYA359F	ggg gaa ttt tcc gca atg gg	359
CYA1092R	gcg ctc gtt gcg gga ctt	1092
CYA781R (a)	gac tac tgg ggt atc taa tcc cat t	781
CYA781RGC (a)	cgc ccg ccg cgc ccc gcg ccc gtc ccg ccg ccc ccg ccg act act ggg gta tct aat ccc att	781
CYA781R (b)	gac tac agg ggt atc taa tcc ctt t	781
CYA781RGC (b)	cgc ccg ccg cgc ccc gcg ccc gtc ccg ccg ccc ccg ccg act aca ggg gta tct aat ccc ttt	781
CYA784R	gga cta cwg ggg tat cta atc cc	784

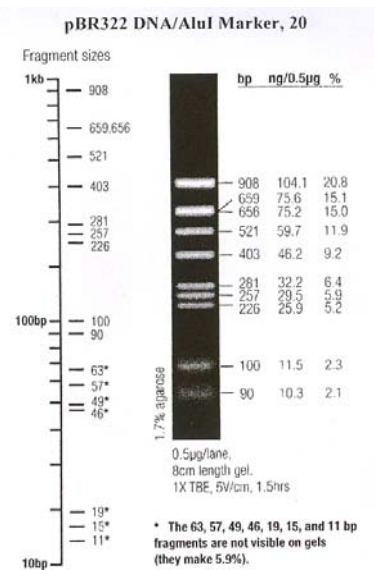
CYA1494R	gta cgg cta cct tgt tac gac	1494
23S30R	ctt cgc ctc tgt gtg cct agg t	30

2.1.3.10. Çalışmada Kullanılan Markırlar

Lambda DNA/HindIII Markır in fragment profili (Fermentas manualinden)



PBR322/*AluI* (Fermentas) Markır in fragment profili (Fermentas manualinden).



2.2. METOD

2.2.1. Su Örneklerinin Toplanması

Çizelge 2.1.'de belirtilen istasyonlardan 2006 yılı içerisinde yaklaşık olarak 2 ayda bir su örneği alınmıştır. Yapılan her örneklemede en az 500 ml su örneği steril cam şişeler içerisine alınmış ve şişeler soğuk plastik taşıma çantası içerisine yerleştirilerek aynı gün içerisinde laboratuara getirilerek analize alınmıştır.

2.2.2. Su Örneklerinin Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Su örneklerinin 2006 yılı boyunca ortalama pH değerleri, klorür, amonyak azotu, nitrit azotu, nitrat azotu, çözülmüş oksijen, organik madde, orto-fosfat, sülfat, demir, mangan, sodyum, potasyum, kalsiyum, magnezyum ve bor miktarları DSİ su analiz laboratuvarında analiz edilmiştir.

2.2.3. Su Örneklerinden Siyanobakteri İzolasyonu ve Kültüre Alınması

Su örneklerinden 1'er ml BG-11 ve BG-11₀ besiyerlerine ekilerek oda sıcaklığında ışıklı bir ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi, besiyerinde gözle görülür bir gelişme oluncaya kadar sürdürülmüştür. Yaklaşık olarak 2-3 haftalık bir inkübasyon süresi sonunda gelişen Siyanobakteriyel kültür ultrasonik su banyosunda düşük titreşim hızı kullanılarak, 10 sn gibi kısa titreşimlere maruz bırakılmıştır. Kültür 2000 rpm de 1,5 dk süre ile santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmış ve kültür steril besiyeri ile birkaç kez yıkanmıştır. Tüp içerisinde yaklaşık olarak 2 ml kültür bırakılarak içerisine cam püskürtme sistemi yerleştirilmiş ve petrilerdeki BG-11 ve BG-11₀ besiyerine kültür, spreyleme yöntemi ile aktarılmış ve petriyerler ışıklı bir odada gözle görülür bir gelişme oluncaya kadar inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra, seçilen kolonial ve filamentöz Siyanobakteri formları yeni bir petriye aktararak

saflaştırılmaya çalışılmış ve oda sıcaklığında sürekli ışık altında saklanmıştır (Abelson ve Simon 1988).

2.2.4. İzolatların İdentifikasyonu

2.2.4.1. İzolatların Mikroskopik Analizi

İzolatların mikroskopik incelemesi amacıyla sıvı kültürler kullanılmıştır. Sıvı kültürlerden steril, pamuk tıkaca sahip pasteur pipeti ile steril kabin içerisinde bir miktar örnek alınarak, steril ependorflar içerisine transfer edilmiş ve bu ependorf tüpleri ilgili izolat numarası ile etiketlenmiştir. Mikroskopik inceleme için, yine steril pasteur pipeti kullanılarak ependorf tüpü içerisinden bir miktar sıvı kültür, lam üzerine aktarılmış ve üzerine lamel kapatılarak ışık mikroskobu altında, izolatların filamentöz yada tek hücreli olup olmadıkları, saflıkları ve filamentöz türlerin heterosist içerip içermedikleri gibi morfolojik analizler yapılarak sonuçlar kaydedilmiştir (Boone ve ark. 2001).

2.2.4.2. İzolatların Moleküler İdentifikasyonu

Elde edilen Siyanobakteri izolatlarının identifikasyonu için nükleik asit analizine dayalı testler uygulanmıştır (Bryant 1994; Amann ve ark. 1995; Suzuki ve ark. 2001; Boutte ve ark. 2005; Case ve ark. 2007).

16S rRNA geni Amplifikasyonu İçin İzolatlardan DNA Ekstraksiyonu

Çalışmada elde edilen izolatlardan 16S rRNA geni amplifikasyonları için saflaştırılmış olan izolatların sıvı besiyerlerine ekimleri yapılmış ve yaklaşık olarak, ışık sistemi içeren bir odada 3 haftalık bir inkübasyon ile yeterli bir hücre yoğunluğu elde edilmesi sağlanmıştır. DNA izolasyonu, bu sıvı kültürler kullanılarak yapılmıştır. DNA izolasyonu için:

- Kültür 10 000 g'de 5 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır.

- 400µl Sal-EDTA solüsyonu ve 20µl lizozim (10 mg/ml) eklenmiştir.
- 15 dk 37°C'de inkübasyondan sonra 200 mg steril cam boncuk (0,1 mm, BIOSPEC PRODUCTS) eklenmiş ve hücreler steril plastik bir spatül ile ezilmiştir.
- 50µl %10 SDS ve 1µl proteinase K (18 mg/ml) eklenmiş ve vortekslenerek karıştırılmıştır.
- 420µl fenol eklenerek tüp ters-düz edilmiştir.
- 10 000 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant (+/- 400µl) yeni bir tüpe transfer edilmiştir.
- 1/10 hacim 3 M NaAc ve 2 hacim saf etanol eklenmiştir.
- DNA -70°C de 30 dk yada -20°C'de gece boyunca presipite edilmiştir.
- 10 dk 10 000 g'de santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- Pelet steril kabin içerisinde 20 dk kurutulmuştur.
- DNA 100µl TE⁴ buffer içerisinde çözülmüştür.
- Wizard DNA Clean-Up System (Promega) kiti prosedürü doğrultusunda saflaştırma yapılmış ve -20°C'de saklanmıştır. Saflaştırma işeminin basamakları şu şekildedir:

✓ Resin solüsyonu içeren kap kullanılmadan önce karıştırılmıştır.

✓ 1 ml Wizard® DNA Clean-Up Resin 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne eklenmiştir. Clean-Up Resin solüsyonuna örnek (50-500µl) eklenmiş ve birkaç kez ters-düz edilerek karıştırılmıştır.

✓ Resin/DNA karşımı kitle mevcut olan şırıngaya pipetlenmiş ve şırıngadan kolona geçişi sağlamak için vakum uygulanmıştır.

✓ Kolonu yıkamak için şırıngaya 2 ml %80'lik isopropanol eklenmiş ve tekrar vakum uygulanmıştır. Alkol, kolondan geçtikten sonra vakumlama işlemi 30 sn kadar daha uygulanmış böylece resin kurutulmuştur. Şırınga uzaklaştırılmış ve kolon 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne transfer edilmiştir.

- ✓ Mini kolon, kalan isopropanol kalıntılarını uzaklaştırmak için maksimum hızda (10,000 x g), 2 dk santrifüj edilmiştir.
- ✓ Mini kolon yeni bir santrifüj tüpüne transfer edilmiştir. Mini kolona 50µl önceden ısıtılmış (65-70°C) su yada TE tampon (10mM Tris-HCl [pH 7.6], 1mM EDTA) ilave edilmiş ve 1 dk bekletilmiştir. Mini kolon, DNA'yı ayırmak için 20 sn maksimum hızda santrifüj edilmiştir.
- ✓ Mini kolon uzaklaştırılmış ve saf DNA mikrosantrifüj tüpünde 4°C yada -20°C'de saklanmıştır (Boutte ve ark. 2005).

16S rRNA + ITS + 5' 23S rRNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) İle Amplifikasyonu

Elde edilen Siyanobakteriyel genomik DNA'dan 16S rRNA gen + ITS ve 5' 23S ucunun PCR amplifikasyonu 50µl lik bir reaksiyon karışımında gerçekleştirilmiştir. Kullanılan primer setleri CYA 359F (5'-ggggaattttccgcaatggg-3') ve 23S30R (5'-cttcgcctctgtgtgcctaggt-3') dir. Amplifikasyon reaksiyonu BioRad Thermocycler ile yapılmıştır. Kullanılan koşullar aşağıdaki şekilde tanımlanmıştır.

1 X of Super Taq Plus tampon, 1 mg ml⁻¹ BSA (bovine serum albumin), 200 µM dNTP mix, 0.5 µM forward and reverse primer leri, 1U/reaksiyon Super Taq Plus (HT Technology, UK), 1µl genomik DNA, toplam hacim 50µl'ye tamamlanmıştır. PCR koşulları aşağıdaki şekilde ayarlanmıştır.

başlangıç	denaturasyon basamağı: 94°C 5 dk	}	(30 döngü)
	denaturasyon basamağı: 94°C 45 s		
	annealing basamağı: 54°C 45 s		
	elongation basamağı: 68°C 2 dk		
son	elongation basamağı: 68°C 7 dk		

Tüm çalışmalar boyunca hem pozitif hem de negatif kontrol reaksiyonları hazırlanmıştır. Pozitif kontrol olarak *Arthrospira* sp. genomik DNA'sı, negatif

kontrol olarak da DNA içermeyen reaksiyon karışımları oluşturulmuştur. Elde edilen PCR ürünleri %1,5 agaroz jellerde 110V'da yürütülerek gözlenmişlerdir (Boutte ve ark. 2005).

İzolatlardan elde edilen 16S rRNA + ITS + 5' 23S rRNA'nın Amplified Ribosomal DNA Restriction Analizi (ARDRA)

İzolatlardan elde edilen PCR ürünlerinin, ARDRA analizleri için kalıp olarak, amplifiye edilen 16S rRNA + ITS + 5' 23S rRNA bölgesi kullanılmıştır. PCR reaksiyonu daha önce belirtilen koşullarda CYA 359F (5'-ggggaattttccgcaatggg-3') ve 23S30R (5'-cttcgcctctgtgtgcctaggt-3') primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

1 X of Super Taq Plus tampon, 1 mg ml⁻¹ BSA (bovine serum albumin), 200 µM dNTP mix, 0.5 µM forward and reverse primer leri, 1U/reaksiyon Super Taq Plus (HT Technology, UK), 1µl DNA, toplam hacim 50µl'ye tamamlanmıştır. PCR koşulları aşağıdaki şekilde ayarlanmıştır (Boutte ve ark. 2005; Calusinka 2005).

başlangıç	denaturasyon basamağı: 94°C 5 dk	} (30 döngü)
	denaturasyon basamağı: 94°C 45 s	
	annealing basamağı: 54°C 45 s	
	elongation basamağı: 68°C 2 dk	
son	elongation basamağı: 68°C 7 dk	

Restriksiyon Enzimleri ile Kesim

İzolatlardan elde edilen PCR ürünlerinin kesimi için *MspI* restriksiyon endonukleaz (MBI Fermentas) kullanılmıştır.

MspI (Hpa II)

5' ...C↓CGG...3'

3' ...GGC↑C...5'

Kesim reaksiyonu aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır

- 10µl PCR ürünü
- 2µl 10 x reaksiyon tampon (tampon Y+/Tango – *MspI*)
- 0.5µl restriksiyon enzim

son hacim 20µl'ye ultra saf su ile tamamlanmıştır. 37°C' de 3 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon 65°C'de 25 dk inkübasyon ile sona erdirilmiştir (Boutte ve ark. 2005; Calusinka 2005).

Agaroz Jel Elektforezi

%1 HR agaroz (Biotools) ve %1 Agaroz (Molecular Biology Grade Agarose, Eurogentec) son konsantrasyon %2 olacak şekilde hazırlanmıştır. Agaroz 1 X TAE tampon (50 X TAE: 242 g Tris base, 57.1 ml asetik asit, 100ml 0.5M EDTA, 1 litre milipore su ve pH 8.5) içinde süspande edilmiştir. Solüsyon agaroz eriyinceye kadar ısıtılmıştır. Sıcaklık 60°C'ye ulaştığında plastik tepsi (15 x 15 cm) içerisine dökülmüş ve 60 dk süre ile polimerizasyona bırakılmıştır. Jele yükleme yapmadan önce 4°C de 30 dk bekletilmiştir. Elektforez 90V'da 180 dk süre ile yapılmıştır. Elektforez sonrasında jel, ethidium bromide ile boyanmış ve UV ile görsel hale getirilmiştir. Marker olarak, pBR322 DNA/Alu I (MBI Fermentas) kullanılmıştır (Boutte ve ark. 2005; Calusinka 2005).

İzolatlardan Elde Edilen PCR Ürünlerinin Dizi Analizi

PCR ürünlerinden dizi analizi için, ARDRA jeli sonrasında elde edilen benzer bant profillerine sahip olan izolatlardan sadece bir tanesi seçilmiş ve bu izolatlara ait olan PCR ürünün, dizi analizi için saflaştırılması yapılmıştır. Saflaştırma amacıyla Amersham Biosciences GE Healthcare kiti kullanılmıştır.

İşlem basamakları şu şekildedir:

- GFX kolonu kit içerisindeki bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
- GFX kolonuna 500 µl “capture buffer” eklenmiştir.
- Saflaştırılacak olan DNA solüsyonu GFX kolonuna transfer edilmiş ve pipetleyerek 4-6 kez karıştırılmıştır.
- 30 saniye süre ile bir mikrosantrifüjde maksimum hızda (13 200 rpm) santrifüjlenmiştir.
- Toplama tüpü boşaltılmış ve GFX kolonu boş olan toplama tüpüne geri yerleştirilmiştir.
- Kolona 500 µl “wash buffer” eklenmiş ve maksimum hızda (13 200 rpm) 30 saniye santrifüj edilmiştir.
- Toplama tüpü atılmış ve GFX kolonu 1,5 ml’lik yeni bir mikrosantrifüj tüpüne transfer edilmiştir.
- GFX kolonu içerisindeki fiber matriks in üzerine 50 µl “elution buffer” (10 mM Tris-HCl pH 8.0, TE pH 8.0 yada otoklavlanmış ultra saf su) eklenmiştir.
- Örnek 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 1 dakika maksimum hızda santrifüj yapılmış ve saf DNA elde edilmiştir.
- Saflaştırılmış olan PCR ürünleri dizi analizi için GIGA Genomics Facility, Molecular Genetics/Belgium birimine gönderilerek analiz sonuçları elde edilmiştir.

2.2.5. Siyanobakteriyel Kommünite Analizleri

2.2.5.1. Su Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu

Su örneklerinden DNA izolasyonu için, Ekim 2006 da toplanan örnekler ve örnekleme bölgeleri Çizelge 2.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Kommunité analizi için alınan örnekleme bölgeleri ve kodları

Kodlar	Örnekleme Bölgesi
fA1 (Whatman filtre); fB1 (Supor filter)	1.Bor havuzu
fA2 (Whatman filtre); fB2 (Supor filter)	Seydisuyu (008)
fA3 (Whatman filtre); fB3 (Supor filter)	Porsuk Çayı (100)
fA4 (Whatman filtre); fB4 (Supor filter)	2.Bor havuzu

Alınan su örnekleri önce 500 ml hacimde Whatman filtre kağıdı (No 1) ile filtre edilmiştir. Uygulanan birinci filtrasyon işleminden sonra, su örnekleri 0.2 µm por çapındaki (Supor, Pall Life Science, USA) filtre ile ikinci bir filtrasyon işlemi yapılmıştır. fA kodları 1. filtre işlemini, fB kodları ise 2. filtreleme işlemi tanımlamaktadır. Her iki filtre ayrı ayrı 2 ml lizis tampon (40 mM EDTA, 400 mM NaCl, 0.75 M sucrose, 50 mM Tris HCl pH 8.3) içerisine derhal aktarılmış ve kullanılıncaya kadar -20°C’de saklanmıştır. Kodları ve örnekleme bölgeleri belirtilen 8 filtre DGGE analizi için kullanılmıştır. fA1 ve fB1 filtreleri ise klonlama basamaklarında kullanılmıştır.

Filtrelerden DNA izolasyonu aşağıdaki şekilde yapılmıştır:

- -20°C’de lizis tampon içerisinde saklanmış olan filtre üzerine 50µl lizozim (50 mg/ml) eklenerek 20 dk 37°C de inkübe edilmiştir.
- 100µl %10’luk SDS ve 43µl proteinaz K (14 mg/ml) eklenerek 2 saat 37°C’de inkübe edilmiştir.
- 56°C’de bekletilmiş olan 2 ml fenol/kloroform/isoamilalkol (25:24:1) eklenmiş, yavaşça karıştırılmış ve 56°C de 10 dk inkübe edilmiştir.
- 15 ml’lik bir santrifüj tüpüne transfer edilmiş ve 15 dakika 10000 g’de santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant yeni bir falkon tüpüne aktarılmış ve 2 ml kloroform/isoamilalkol (24:1) eklenerek yavaşça karıştırılmış ve 20 dk süresince 56°C’de inkübe edilmiştir.

- 15 ml'lik tüpe transfer edilmiş ve 15 dk 10 000 g'de santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant 1.5 ml'lik Eppendorf tüpüne (maksimum 450µl hacimde) transfer edilmiş, 1/10 oranındaki hacimde 3 M NaOAc eklenmiş, karıştırılmış ve 2 hacim saf etanol ilave edilerek tekrar karıştırılmış ve -20°C'de en az 2 saat yada tüm gece presipitasyona bırakılmıştır.
 - 20 dk 16 000 g'de santrifüj yapılmıştır.
 - Pelete dokunulmadan süpernatant atılmış, pelete 1 ml %70'lik etanol ilave edilmiş ve 10 dk 16 000 g'de santrifüj yapılmıştır.
 - Süpernatant atılmış, pelet havada kurumaya bırakılmış ve 30µl TE-4 (10mM Tris HCl pH 7.5 yada 8; 0.1mM EDTA)'de süspande edilmiştir.
 - Saflaştırma Wizard DNA Clean-Up System (Promega) kiti kullanılarak daha önce belirtilen şekilde yapılmıştır.

Su örneği geçirilmemiş olan boş filtre kağıdından da aynı şekilde DNA izolasyon yöntemi gerçekleştirilmiş ve bu örnek negatif kontrol olarak ileriki tüm basamaklarda kullanılmıştır (Boutte ve ark. 2005; Calusinka 2005).

2.2.5.2. Ribozomal DNA'nın Klonlanması

16S rRNA + ITS + 5' 23S rRNA'nın Amplifikasyonu

fA1 ve fB1 örnekleri klonlama için kullanılmıştır. Siyanobakteriyel 16S rRNA gene + ITS ve 5' 23S ucunun PCR amplifikasyonu 3 x 50µl lik bir reaksiyon karışımında gerçekleştirilmiştir. Kullanılan primer setleri CYA 359F (5'-ggggaatttccgcaatggg-3') ve 23S30R (5'-cttcgcctctgtgccttaggt-3') dır. Amplifikasyon reaksiyonu BioRad Thermocycler ile yapılmıştır. Kullanılan koşullar aşağıdaki şekilde tanımlanmıştır.

1 X of Super Taq Plus tampon, 1 mg ml⁻¹ BSA (bovine serum albumin), 200 µM dNTP mix, 0.5 µM forward ve reverse primerleri, 1U/reaksiyon Super Taq Plus (HT Technology, UK), toplam hacim 50µl'ye tamamlanmıştır (Boutte ve ark. 2005; Calusinka 2005).

başlangıç	denaturasyon basamağı: 94°C 5 dk	
	denaturasyon basamağı: 94°C 45 s	}
	annealing basamağı: 57°C 45 s	
	elongation basamağı: 68°C 2 dk	
	denaturasyon basamağı 92°C 45 s	}
	annealing basamağı: 54°C 45 s	
	elongation basamağı: 68°C 2 dk	
son	elongation basamağı: 68°C 7 dk	

PCR Ürününün Saflaştırılması

Vektör içerisine ligasyondan önce, DNA bağlanmamış dNTP lerden, küçük primer dimerlerinden ve herhangi kısa spesifik olmayan PCR ürünlerinden temizlenmiştir. 16S rRNA + ITS + 5' 23S rRNA'nın amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünü (3 x 50µl) birleştirilmiştir ve Quantum Prep® PCR Kleen Spin Columns (Bio-Rad) ile ard arda üç kez saflaştırılmıştır. Birinci saflaştırma için, 100µl PCR ürünü kolonun ortasına yüklenmiştir. Santrifüj sonrasında ilk saflaştırılmış olan örnek 8µl, 10µl ve 80µl'lik 3 hacime bölünmüştür. 8µl'lik kısım elektroforez ile saflık kontrolü için, 10µl'lik kısım olası klonlama reaksiyonu için ve 80µl'lik kısım ikinci saflaştırma işlemi için kullanılmıştır. İkinci saflaştırma işlemi için birinci kez saflaştırılmış olan 80µl'lik örnek, yeni bir kolona yüklenmiş ve santrifüj edilmiştir. Bu ikinci saflaştırma işlemi de 8µl, 10µl ve 62µl'lik kısımlara bölünmüştür. 8µl ve 10µl'lik kısımlar yine elektroforez ile saflık kontrolü ve olası klonlama reaksiyonu için, 62µl'lik kısım üçüncü saflaştırma basamağı için kullanılmıştır. Üçüncü saflaştırma basamağında, 62µl'lik örnek yukarıda anlatıldığı şekilde saflaştırılmıştır. Saf olmayan PCR ürünü ve saflaştırılmış örnekler elektroforez yapılarak hangi basamaktaki PCR

ürününün klonlama için en uygun olduğuna karar verilmiştir (Boutte ve ark. 2005; Calusinka 2005).

PCR Ürününün 3' Ucuna Tek Deoxyadenosine (A)'nın Eklenmesi

Super *Taq* Plus, *Taq* polymerase a ilave olarak proof-reading enzyme aktivitesine sahiptir. Enzim, PCR ürününün 3' ucuna tek bir deoxyadenosine (A) eklemekte ve böylece spesifik olmayan eklenmelerin oranı ikinci enzim ile doğrulanmaktadır. Bu basamak ileriki basamaklar için oldukça önemlidir. 3' uçlarının adeninlendiğini garanti etmek için, poly (A) uzaması Qiagen® A-Addition Kit ile gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılmış olan PCR ürününden 8µl alınarak, 2µl kit içerisinde bulunan reaksiyon karışımı eklenmiş ve PCR aletinde 37°C de 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Deoxyadenosine (A) eklenmiş olan PCR ürünü böylece ligasyona hazır hale getirilmiştir (Boutte ve ark. 2005; Calusinka 2005).

8µl saf PCR ürünü + 2µl reaksiyon karışımı
--

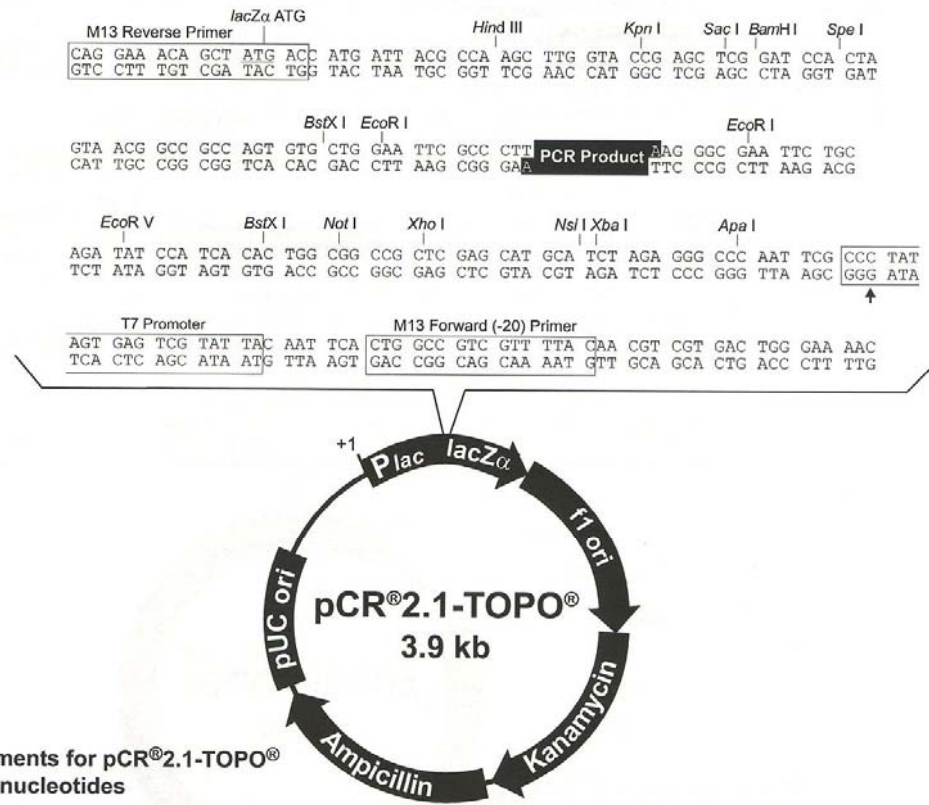


37°C de 30 dk inkübasyon

Ligasyon Reaksiyonu

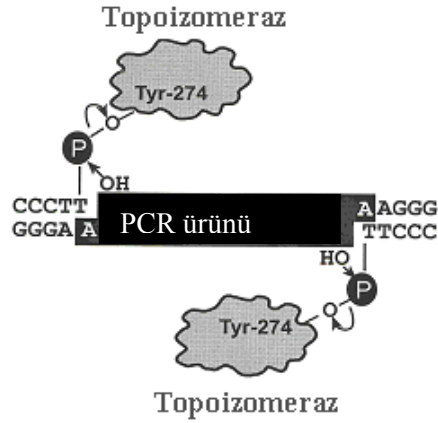
PCR ürününün plazmit vektör içerisine direk ligasyonu için TOPO® TA Cloning Kit (Invitrogen) kullanılmıştır (Boutte ve ark. 2005; Calusinka 2005; Yeager ve ark. 2007).

Vektör lacZ geninin yanında, ampicillin ve penicilinle direnç genlerini de içermektedir. Şekil 2.1.'de vektör olarak kullanılan pCR® 2.1-TOPO'nun restriksiyon kesim bölgeleri ve direnç genleri gösterilmiştir.



Şekil 2.1. pCR®2.1-TOPO Vektörü (TOPO klonlama kiti manualinden, Invitrogen)

Vaccinia virüsünden elde edilen Topoisomerase I, çift iplikli DNA 'yı spesifik bölgelerinden bağlamakta ve bir uçta bulunan 5'-CCCTT dizisinden sonraki fosfodiester bağını kırmaktadır. Kırılan fosfodiester bağından salınan enerji, kırılan ipliğin 3' fosfat ve *Topoisomerase I*'in tyrosyl ucu (Tyr-274) arasında kovalent bir bağın oluşumu ile korunmaktadır. Oluşan bağ, ardından orijinal kırılan ucun 5' hydroxyli ile bağlanabilmektedir. Böylece, reaksiyon geri dönmekte ve enzim salınmaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Topoisomerase I enziminin PCR Ürünü ile Etkileşimi (TOPO klonlama kiti manualinden, Invitrogen).

Ligasyon reaksiyonu Çizelge 2.4’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.4. Ligasyon reaksiyonu

Ajanlar	Ligasyon reaksiyonu
Saf PCR ürünü	4µl
Tuz solüsyonu	1µl stok (1.2 M NaCl, 0.06M MgCl ₂)
TOPO® vektör	1µl

Rekombinantların sayısını arttırmak için reaksiyon oda sıcaklığında, tuz solüsyonunun (200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) varlığında 30 dk inkübe edilmiştir. Tuzun eklenmesi, PCR ürününün ligasyonundan sonra topoisomerase I in DNA nın yeniden bağlanmasını ve çentik oluşturmasını önlemekte ve daha yüksek bir transformasyon verimi elde edilmektedir (Boutte ve ark. 2005; Calusinka 2005).

Kompetent *E.coli* Hücrelerine Transformasyon

Maksimum klonlama verimi için One Shot Chemically Component *E.coli* (Invitrogen) hücreleri kullanılmıştır. Prosedür aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

- 2.5µl ligasyon reaksiyonu *E.coli* hücrelerini içeren mikrosantrifüj tüpüne eklenmiş ve karıştırılmıştır.

- Isı şokundan önce hücreler, 30 dk buz üzerinde inkübe edilmiştir.
- Hücreler 42°C'de 30 saniye (karıştırma yapmadan) bırakılmış ve derhal buz üzerine konarak şoklanmıştır.
- Daha önceden 37°C de tutulmuş, kit içerisinde bulunan 250µl SOC recovery medium eklenmiştir (bacto tryptone 20 g, NaCl 0.5 g, 1M KCl 2.5 ml, 1 ml Mg⁺² stock-1M MgCl₂ x 6H₂O, 1M MgSO₄, ddH₂O 1000 ml ye tamamlanmış, pH 7.0 ye 10 N NaOH ile ayarlanmıştır. Otoklavdan sonra 20 ml 1M glikoz eklenmiştir).
- Tüpler kapatılmış ve yatay olarak 200 rpm, 37°C de 1 saat inkübe edilmiştir.
- En uygun sayıdaki klonları içeren petriyi elde etmek için, iki farklı hacim (25 ve 50µl) iki adet ampiciline (100 µg/ml) ve X-Gal (40µl 100 mM stok kullanmadan önce her bir petrinin üzerine yayılmıştır) içeren LB agar (bacto-tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 5 g, milipore su 1000 ml; pH 7.5'a 10 N NaOH ile ayarlanmıştır) üzerine yayılmıştır.
- Petriler 37°C de gece boyunca inkübe edilmiştir.

Elde Edilen Transformantların Saflaştırılması ve İnsert DNA'nın Taranması

LB agar üzerinde elde edilen beyaz koloniler numaralandırılarak, yeni bir ampicillin ve X-Gal içeren LB agar üzerine ekilmiş, ve tekrar beyaz renk oluşumu kontrol edilmiştir. Bu işlemden sonra insert DNA'nın varlığı için CYA359F ve CYA783R (5'-gactactggggtatctaatcccatt-3') (bunlar insert içerisinde yer alır) primerleri ile PCR yapılmıştır. Amplifikasyon koşulları aşağıdaki gibidir:

başlangıç	denatürasyon basamağı: 94°C 10 dk	} (35 döngü)
	denatürasyon basamağı: 94°C 1 dk	
	annealing basamağı: 60°C 1 dk	
	elongation basamağı: 68°C 1 dk	

son elongation basamağı: 68°C 7 dk

Kolonileri lizis etmek için PCR reaksiyonu 94°C’de (başlangıç denaturasyon basamağı) 5-10 dk inkübe edilmiştir. Bu basamak hücrelerin lize olmasını ve nükleazların inaktivasyonunu sağlamaktadır (Boutte ve ark. 2005; Calusinka 2005).

Elde Edilen Klonların Uzun Süreli Olarak Saklanması

Her bir klonu doğru olarak tanımlamak için gliserol stoğu hazırlanmıştır. Ampicillin ve X-Gal içeren LB agar üzerindeki beyaz renkli tek bir koloni aynı konsantrasyonlarda ampicillin ve X-Gal içeren 3 ml sıvı LB besiyerine aktarılmıştır. Kültür 37°C’de 12 saat süre ile inkübe edilmiştir. Daha sonra 625µl kültür 375µl 40%’lık glycerol ile karıştırılmış ve -20°C’de saklanmıştır. Gliserolün son konsantrasyonu %15’dir. Kalan sıvı bakteri kültürü, plazmit DNA izolasyonu için kullanılmıştır.

Plazmid DNA Ekstraksiyonu

Plazmid DNA, Quantum Prep® Plazmid Miniprep Kit (Bio-Rad) kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Prep® Plazmid Miniprep Kit’in prensibi alkaline lizis metoduna dayanmaktadır. Plazmit DNA ekstraksiyonu aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

- 2 ml lik gecelik kültür bir mikrosantrifüj tüpüne transfer edilmiş ve hücreler maksimum hızda (12 000 g) 30 sn santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant uzaklaştırılmış ve 200µl Cell Resuspension Solution ilave edilerek pelet tamamen çözülünceye kadar vortekslenmiştir.
- 250µl Cell Lysis Solution eklenerek tüp yaklaşık 10 kez ters-düz edilerek karıştırılmıştır (solüsyon viskoz olduğunda lizisin gerçekleştiği belirtisidir).
- 250µl Neutralization Solution eklenmiş ve yavaşça karıştırılmıştır (bu basamakta görülebilir bir presipitat oluşur).

- Tekrar maksimum hızda (12 000 g) 5 dk santrifüj işlemi uygulanmıştır.
- Süpernatant bir spin filtre içeren yeni bir tüpe transfer edilmiştir.
- 200µl suspended matrix eklenmiş, pipetleyerek karıştırılmış ve tüp 30 sn maksimum hızda (12 000 g) santrifüjlenmiştir.
- Filtrat uzaklaştırılmış ve matriks 500µl yıkama tamponu ile yıkanmıştır, yıkama işlemi iki kez uygulanmıştır. İkinci santrifüj etanol kalıntılarını uzaklaştırmak için 2 dk maksimum hızda (12 000 g) uygulanmıştır.
- Spin filtre yeni bir tüpe yerleştirilmiş ve 100µl ddH₂O eklenmiştir, son santrifüj maksimum hızda (12 000 g) 1dk süre ile uygulanmıştır.
- Spin filtre uzaklaştırılmış ve DNA -20°C’de stoklanmıştır.

2.2.5.3. Elde Edilen Klonların Amplified Ribosomal DNA Restriction Analizi (ARDRA)

Elde edilen klonların Amplified Ribosomal DNA Restriction Analizi (ARDRA) için, kalıp olarak plazmit DNA kullanılmıştır. PCR reaksiyonu, daha önce, izolatlardan elde edilen 16S rRNA + ITS + 5’ 23S rRNA’nın Amplified Ribosomal DNA Restriction Analizi (ARDRA)’nde belirtilen koşullarda, iki farklı restriksiyon endonükleaz, *MspI* and *MboI* kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



2.2.5.4. Denature Edici Gradient Jel Elektrofrez (DGGE)

DGGE analizinin duyarlılığını arttırmak için semi-nested PCR kullanılmıştır. 16S rRNA fragmentleri ilk olarak CYA359F (5’-ggggaattttccgcaatggg-3’) ve 23S30R (5’-cttcgcctctgtgtgcctaggt-3’) primerleri ile amplifiye edilmiştir. İkinci PCR reaksiyonu CYA359F ve reverse primerin 5’ uçları üzerinde GC etiketli

CYA781R(a) ve/yada (b), (5'-cgccccgcccgcccccgcccgtcccgcgcccccgcc-3') primerler ile gerçekleştirilmiştir. Uygulanan tüm PCR reaksiyonları Çizelge 2.5.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.5. DGGE için PCR koşulları

	DGGE (b1)				DGGE (a1)		
1. PCR	359 F_23S30R				359 F_23S30R		
	1. döngü	1 X	94°C	5 dk	1 X	94 °C	5 dk
	2. döngü	10 X Touch down	94 °C	45 s	27 X	94 °C	45 s
			(6X) 60°C	1 dk		54 °C	1 dk
			(4X) 54°C	1 dk		68 °C	1.5 dk
3. döngü	1 X	68 °C	7 dk	1 X	68 °C	7 dk	
2. PCR	378 F_781RGC (b2)				378 F_781RGC (a2)		
	1. döngü	1 X	94 °C	5 dk	1 X	94 °C	5 dk
	2. döngü	35 X	94 °C	1 dk	30 X	94 °C	1 dk
			60 °C	1 dk		60 °C	1 dk
			68 °C	1 dk		68 °C	1 dk
3. döngü	1 X	68 °C	20 dk	1 X	68 °C	20 dk	

Her bir reaksiyonda kalıp DNA olarak, filtrelerden yapılan DNA ekstraksiyonu sonucu elde edilen DNA lar kullanılmıştır.

Birinci PCR için 0.5µl DNA, 49.5µl lik amplifikasyon karışımına eklenmiştir. Komponentlerin son konsantrasyonu; 1 X Super Taq Plus tampon, 1 mg ml⁻¹ BSA (bovine serum albumin), 200 µM dNTP mix, 0.5 µM of the forward ve reverse primerleri, 1 U/µl Super Taq Plus (HT Technology, UK) 50µl'lik son hacim içerisinde bulunurlar. PCR programı yukarıda gösterilmiştir. 0.5µl'lik birinci PCR ürünü 49.5µl'lik ikinci PCR karışımına eklenmiştir. Bu reaksiyon the forward primer CYA359F ve the reverse primerler CYA781R(a) ve (b) nin bir kombinasyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir, birinci reaksiyondaki gibi aynı PCR reagentleri kullanılarak Çizelge 2.5'de belirtilen reaksiyon koşullarında gerçekleştirilmiştir. CYA781R(a) ve (b) primerleri sırasıyla filamentöz ve tek hücreli Siyanobakterileri hedef almaktadır, bu primerlerin ayrı şekilde

kullanılması populasyonun farklı tiplerinin açıklanmasını sağlamaktadır (Taton ve ark. 2003; Boutte ve ark. 2005; Calusinka 2005; Boutte ve ark. 2006).

Acrylamide Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Denatüre edici ajanlar içermeyen (%0) ve denaturant içeren (%100: 7M üre ve %40 formamide) DGGE stok solüsyonları hazırlanmıştır. Solüsyonların içeriği Çizelge 2.6.'da gösterilmiştir.

Çizelge 2.6. DGGE jel için stok solüsyonlar

	%0 denature edici solüsyon	%100 denature edici solüsyon
Acrylamide/Bis 30% (Protogel national diagnostics)	21,66 ml	21,66 ml
Üre	-	42 g
Formamide	-	40 ml
TAE 50X	2 ml	2 ml
	Hacim 100 ml'ye tamamlanır	

Reagentler karıştırılmış ve son hacim 100 ml oluncaya kadar steril su eklenmiştir. Bu şekilde hazırlanan acrylamide/bisacrylamide'in son konsantrasyonu %6,5'olmaktadır. Solüsyon Nalgene filtre kullanılarak steril şişelere filtre edilmiş ve 4°C'de saklanmıştır. %100 denature edici solüsyon her kullanımdan önce ısıtılmıştır (Taton ve ark. 2003; Boutte ve ark. 2005; Calusinka 2005; Boutte ve ark. 2006).

Gradientin Belirlenmesi

Sabit sıcaklıkta (60°C) ve %45-65 gradient oranında paralel (denaturant elektriksel alana paraleldir) bir denature edici ortam hazırlanmıştır. Jelin hazırlanması iki adımda yapılmıştır: denature edici jel solüsyonu ve yükleme solüsyonu şeklindedir. Denature edici jel ve yükleme jelinin içeriği Çizelge 2.7. (a) ve (b) de gösterilmiştir.

Çizelge 2.7.(a). Denature edici jel solüsyonu

	0 %	100 %	Temed	APS
40 %	7,2 ml	4,8 ml	8µl	100µl
65 %	4,2 ml	7,8 ml	8µl	100µl

%40 ve %65'lik denatüre edici solüsyonlar sistemdeki özel jel hazırlama kolonlarına ayrı ayrı dökülmüştür. Her iki kolondaki sıvılar magnetik karıştırıcılar ile karıştırılmıştır. Kapakçık açılmış ve her iki kolondaki solüsyon iki cam arasına dökülmüştür. Oluşan denaturant gradienti alt kısımda %65 ve üst kısımda ise %40 oranındadır. Jel, 1 saat süre ile oda sıcaklığında polimerizasyona bırakılmıştır. jelin üzerine kurumayı önlemek için 1 X TAE tampon (TAE tampon 50X: 40mM TRIS, 20mM acetic acid, 1 mM EDTA) dökülmüştür.

Çizelge 2.7.(b). Yükleme Jeli

	0 %	Temed	APS
Yükleme jeli	5 ml	8µl	100µl

Yükleme jeli, denature edici jelin polimerize olmasından sonra üst kısma dökülmüştür. Yükleme jeli, örneklerin konulacağı kuyucukları içeren jel olup denature edici ajanları içermemektedir. Bu jel, örneklerin denature edici jele girmesinden önce konsantre bir hal almasını sağlamaktadır. DGGE için kullanılan markır, academic Belgian project "LAQUAN"-Late Quaternary climate history of coastal Antarctic environments dan sağlanmıştır (Taton ve ark. 2003; Boutte ve ark. 2005; Calusinka 2005; Boutte ve ark. 2006).

Jel'deki Yürüme (Göç)

Elektroforez tankı 7 litre 1 X TAE ile doldurulmuştur. Tampon önceden 60°C'ye ısıtılmıştır. Elektroforez sistemi 16 saat süre için 75V a ayarlanmıştır.

Jelin Boyanması

Elektroforez bittikten sonra jel, 2µl of GelStar® nükleik asit boyası (BioWhittaker Molecular Applications) içeren 15 ml 1 X TAE tamponu ile yıkanmıştır. Ardından 30 dk süre ile su içerisinde dekolorize edilmiştir ve FluorImager (BioRad) GelDoc-IT Imaging System kullanılarak elde edilen görüntü TIFF formatında kaydedilmiştir.

Kesilen Bantların Yeniden Amplifikasyonu

Bantlar UV ışığı altında görsel hale getirilmiş ve jeldeki her banda bir numara verilmiştir. İlgili bantlar steril bir bisturi ile kesilmiştir. Her bandın kesim aşamasından sonra bisturi etanol ile temizlenmiştir. Bu işlem süresince UV koruyucu maske kullanılmıştır. Kesilen küçük jel parçaları 50µl of TE⁻⁴ tamponu (10mM M Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.5) içeren 1.5 ml'lik steril eppendorf tüplerine yerleştirilmiştir. Örnekler 24 saat 4°C'de DNA 'nın jelden diffüze olması için inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra süpernatantın 1µl'si yeni amplifikasyon reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmıştır. PCR koşulları

başlangıç	denatürasyon basamağı: 94°C 10 dk	}	(35 döngü)
	denatürasyon basamağı: 94°C 1 dk		
	annealing basamağı: 60°C 1 dk		
	elongation basamağı: 68°C 1 dk		
son	elongation basamağı: 68°C 7 dk		

şeklinde fakat kullanılan reverse primer CYA783R dir. PCR ürünleri konsantrasyonu ve büyüklüğü değerlendirmek için pBR322 DNA/Alu I Marker

(Fermentas) kullanılarak elektroforez edilmiş ve sekanslanmıştır (Taton ve ark. 2003; Boutte ve ark. 2005; Calusinka 2005; Boutte ve ark. 2006).

2.2.5.5. Sekans Verilerinin Analizi

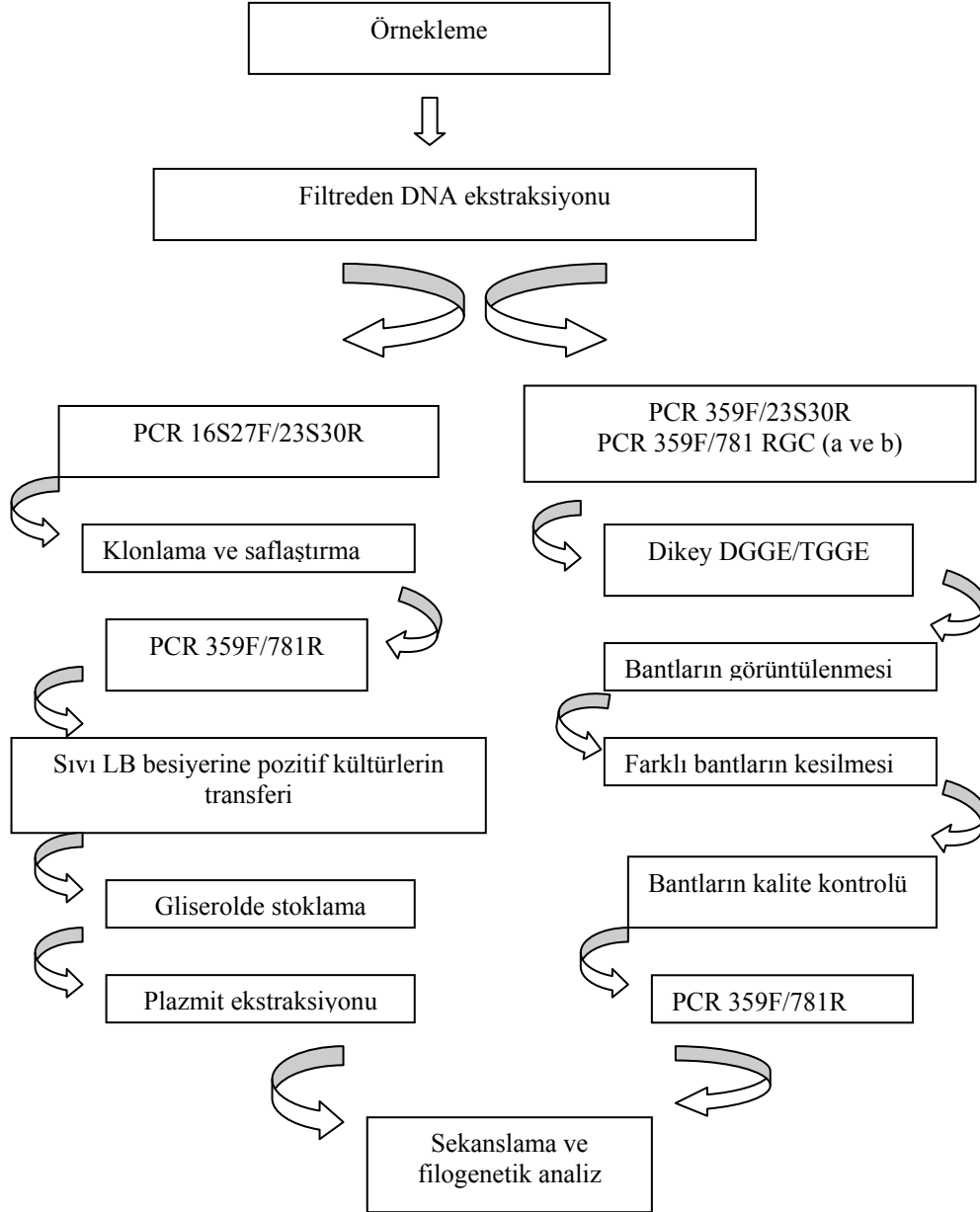
Elde edilen Siyanobakteril 16S rRNA sekansları ilk olarak Blast (Basic Local Alignment Search Tools) algorithm (<http://www.ncbi.nih.gov>) ile analiz edilmiştir. The BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) software programı otomatize Clustal W alignment temeline bağlı olarak sekans alignment için kullanılmıştır. Elde edilen alignment sonucu manuel olarak kontrol edilmiştir. Sekanslar Ribosomal DataBase Project II (<http://rdp.cme.msu.edu/html>) ve Bellerophon (<http://foo.maths.uq.edu.au/~huber/bellerophon.pl>) web sitesinde var olan Chimera Check ile olası “chimer” lerin varlığı analiz edilmiştir.

Chimera, birden fazla DNA kalıbından türemiş olan ve gerçek olmayan bir gen sekansıdır. Chimeralar PCR amplifikasyonu süresince oluşmaktadır. PCR sırasında bir kalıptan başlayan sekans sentezi örneğin, kalıp hasara uğradığında yarıda kalmaktadır ve orijinal kalıp ile bölgesel bir homolojiye sahip diğer kalıptan devam etmektedir. Böylece, bir chimera, farklı kalıp DNA lardan türevlenmiş iki ya da daha fazla filogenetik olarak farklı gen fragmentlerinden oluşmaktadır. Bir PCR karışımında birden fazla DNA kalıbı olduğunda, chimera oluşumu bir potansiyele sahiptir. Chimera oluşumu, PCR karışımında var olan farklı DNA kalıpları arasında fazla oranda homoloji varsa çok daha muhtemel olmaktadır. 16S rDNA sekansları, yüksek oranda korunmuş olduğundan dolayı bir homolojiye sahiptirler.

Chimeralar oldukça sinsi yapay oluşumlardır ve eğer belirlenemezlerse, doğru olmayan taksonomik identifikasyonlara ve mikrobiyal biyoçeşitliliğin tanımlanmasına yol açmaktadırlar.

Filogenetik ağaç “TREECON for Windows (version 1.3b)” programı kullanılarak, Neighbour-Joining metoduna göre yapılmıştır. Oluşan dalların istatistiksel olarak doğruluğu “bootstrap” analizi ile 500 kez örnekleme yapılarak belirlenmiştir (Taton ve ark. 2003; Boutte ve ark. 2005).

Şekil 2.3.'de su örneklerindeki Siyanobakteriyel çeşitliliğin belirlenmesi için uygulanmış olan moleküler yaklaşımların basamakları özetlenmiştir.



Şekil 2.3. Karışık mikrobiyal populasyonlardan Siyanobakteriyel çeşitliliğin belirlenmesinde kullanılmış olan moleküler yaklaşımların basamakları

3. BULGULAR

3.1. Su Örneklerinin Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Su örneklerinin 2006 yılı boyunca ortalama pH değerleri, klorür, amonyak azotu, nitrit azotu, nitrat azotu, çözülmüş oksijen, organik madde, orto-fosfat, sülfat, demir, mangan, sodyum, potasyum, kalsiyum, magnezyum ve bor miktarlarının yıllık ortalamaları Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1.a' da görüldüğü gibi, Porsuk Çayındaki ortalama pH değeri 7,6-8,1 arasında, klorür miktarı 8,7-109,8 mg/l arasında, amonyak azotu 0,111-12,084 mg/l arasında, nitrit azotu 0,013- 0,201 mg/l arasında, nitrat azotu 0,38-1,47 mg/l arasında, çözülmüş oksijen 2,7-10,5 mg/l arasında, organik madde 1,39-21,45 mg/l arasında, orto-fosfat 0,07-4,72 mg/l arasında, sülfat 28,6-108,8 mg/l arasında, demir 0,04-1,96 mg/l arasında, mangan 0,04-0,35 mg/l arasında, sodyum 8,50-98,0 mg/l arasında, potasyum 0,50-12,25 mg/l arasında, kalsiyum 54,1-89,7 mg/l arasında, magnezyum 21,2-45,6 mg/l arasında, bor 0,03-0,55 mg/l arasında değişmiştir.

Ayrıca, Seydisuyu üzerindeki 4 istasyonun yıllık ortalama değerleri Çizelge 3.1.b' de verilmiştir. Ortalama pH değeri 7,3-8,5 arasında, klorür miktarı 4,4-21,3 mg/l arasında, amonyak azotu 0,042-0,325 mg/l arasında, nitrit azotu 0,007-0,014 mg/l arasında, nitrat azotu 0,09-1,46 mg/l arasında, çözülmüş oksijen 4,8-8,4 mg/l arasında, organik madde 2,01-2,93 mg/l arasında, orto-fosfat 0,05-0,14 mg/l arasında, sülfat 13,2-71,6 mg/l arasında, demir 0,03-0,07 mg/l arasında, mangan 0,05-0,34 mg/l arasında, sodyum 6,5-22,5 mg/l arasında, potasyum 4,0-6,5 mg/l arasında, kalsiyum 36,6-93,0 mg/l arasında, magnezyum 11,1-32,9 mg/l arasında, bor 1,20-4,18 mg/l arasında bulunmuştur.

Çizelge 3.1.b'de de Bor havuzu'ndan alınmış olan su örneklerine ait ortalama değerler de verilmiştir. Ortalama pH değeri 9,01, klorür miktarı 4,10 mg/l, amonyak azotu 0,26 mg/l, nitrit azotu 0,005 mg/l, nitrat azotu 0,8 mg/l, çözülmüş oksijen 6,1 mg/l, organik madde 1,07 mg/l, orto-fosfat 0,1 mg/l, sülfat 7,86 mg/l, demir 0,06 mg/l, mangan 0,25 mg/l, sodyum 1,77 mg/l, potasyum 0,53-

mg/l, kalsiyum 5,15 mg/l, magnezyum 2,60 mg/l, bor 4,98 mg/l arasında bulunmuştur.

Çizelge 3.1.a. Porsuk üzerindeki istasyonların analiz edilen kimyasal parametre sonuçları (yıllık ortalama)

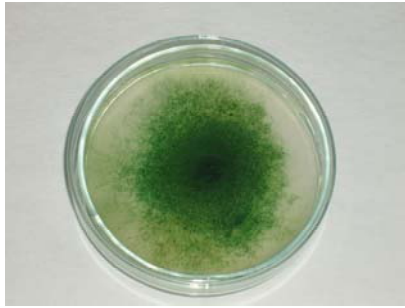
	pH	Klorür (mg/l)	Amonyak Azotu (mg/l)	Nitrit Azotu (mg/l)	Nitrat Azotu (mg/l)	Çözünmüş oksijen (mg/l)	Organik madde (mg/l)	Orto-fosfat (mg/l)	Sülfat (mg/l)	Demir (mg/l)	Mangan (mg/l)	Sodyum (mg/l)	Potasyum (mg/l)	Kalsiyum (mg/l)	Magnezyum (mg/l)	Bor (mg/l)
010	8,0	8,8	0,111	0,016	1,0	9,1	1,47	0,09	30,8	0,25	0,05	8,50	0,67	80,0	22,6	0,03
202	8,1	8,7	0,182	0,013	1,08	10,3	1,39	0,07	28,6	0,25	0,04	8,50	0,50	81,2	22,5	0,03
203	7,9	17,8	5,026	0,086	0,78	7,8	3,43	1,01	37,0	0,39	0,10	17,0	2,25	84,5	23,1	0,03
205	7,7	18,0	3,776	0,051	0,61	4,6	10,56	1,58	36,9	1,06	0,14	18,50	2,75	88,2	21,2	0,06
206	7,7	17,9	4,239	0,118	1,44	4,3	9,13	1,49	37,5	1,65	0,20	19,75	2,75	85,9	23,0	0,05
011	7,6	19,5	4,181	0,149	1,46	4,1	8,87	1,53	42,1	0,95	0,13	21,25	2,75	84,7	26,2	0,07
012	7,7	17,7	4,239	0,156	0,90	4,5	6,91	1,78	48,2	0,53	0,10	21,75	2,75	85,0	26,8	0,08
094	7,8	17,8	4,775	0,115	1,46	6,4	3,64	2,37	51,2	0,45	0,09	21,25	2,75	86,3	27,8	0,20
047	8,1	15,3	0,569	0,058	0,68	10,5	2,07	0,93	43,6	0,04	0,06	16,50	2,75	54,1	36,6	0,07
100	8,1	13,3	0,197	0,034	1,16	9,6	2,45	0,81	41,7	0,23	0,09	14,50	2,67	55,6	35,7	0,11
013	7,9	15,2	0,315	0,027	1,36	10,2	2,44	0,58	46,3	1,55	0,25	15,25	3,25	61,2	34,8	0,05
236	8,0	18,5	0,136	0,027	1,53	9,6	2,25	0,59	44,4	1,96	0,20	16,0	3,25	67,3	34,9	0,05
238	8,1	19,7	0,617	0,027	1,47	10,4	2,49	0,84	46,2	0,44	0,12	17,25	3,25	67,1	35,3	0,03
239	8,0	35,2	0,849	0,037	1,01	9,2	8,39	0,43	49,4	0,71	0,20	25,25	6,75	74,5	36,4	0,09
237	8,0	20,5	0,604	0,059	1,06	9,8	6,89	0,45	48,8	0,44	0,16	20,25	5,50	68,9	36,5	0,09
015	7,8	87,7	12,084	0,055	0,75	4,9	21,45	4,40	76,0	0,82	0,19	69,75	16,0	88,4	29,2	0,23
072	7,7	50,6	9,954	0,043	0,43	3,1	13,68	3,90	70,5	0,69	0,20	45,25	12,25	88,2	33,5	0,19
016	7,6	67,9	9,850	0,034	0,27	2,7	13,55	4,06	77,2	0,56	0,24	54,0	9,50	88,3	33,6	0,18
017	7,8	58,7	7,375	0,047	0,38	3,2	12,67	4,60	79,2	0,59	0,23	55,0	11,50	89,7	32,6	0,13
018	7,9	55,9	6,371	0,201	0,57	6,4	10,12	4,72	74,2	0,63	0,22	54,50	11,0	82,2	37,3	0,13
019	7,9	109,8	4,693	0,165	1,05	9,2	10,42	3,08	108,8	1,09	0,35	98,0	10,25	84,8	45,6	0,55

Çizelge 3.1.b. Seydisuyu üzerindeki istasyonların ve bor havuzunun analiz edilen kimyasal parametre sonuçları (yıllık ortalama)

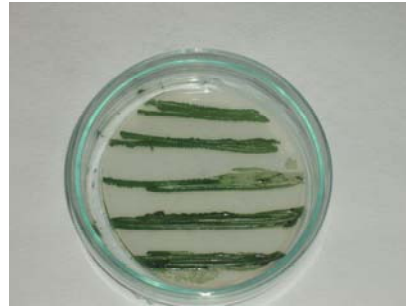
	pH	Klorür (mg/l)	Amonyak Azotu (mg/l)	Nitrit Azotu (mg/l)	Nitrat Azotu (mg/l)	Çözünmüş oksijen (mg/l)	Organik madde (mg/l)	Orto-fosfat (mg/l)	Sülfat (mg/l)	Demir (mg/l)	Mangan (mg/l)	Sodyum (mg/l)	Potasyum (mg/l)	Kalsiyum (mg/l)	Magnezyum (mg/l)	Bor (mg/l)
136	8,5	4,4	0,231	0,014	0,26	5,7	2,93	0,09	13,2	0,03	0,09	6,50	4,0	36,6	11,1	1,20
137	7,8	7,7	0,325	0,007	0,24	5,9	2,34	0,14	16	0,07	0,34	11,0	5,0	40,8	13,0	4,18
008	7,9	9,4	0,179	0,009	0,09	8,4	2,08	0,05	20,3	0,07	0,14	11,50	3,75	51,9	19,4	2,75
156	7,3	21,3	0,042	0,009	1,46	4,8	2,01	0,13	71,6	0,07	0,05	22,50	6,50	93,0	32,9	1,78
Bor havuzu	9,01	4,10	0,26	0,005	0,8	6,1	1,07	0,10	7,86	0,06	0,25	1,77	0,53	5,15	2,60	4,98

3.2. Su Örneklerinden Siyanobakteri İzolasyonu ve Kültüre Alınması

Su örneklerinden, BG-11 ve BG-11₀ besiyerlerine ekim yapılarak, ışıklı bir ortamda yapılan inkübasyon sonrasında, farklı filamentöz görünüme ve koloni morfolojisine sahip olan 141 adet izolat seçilmiş ve bu izolatların, katı besiyerine ekimleri yapılarak gelişmeleri sağlanmıştır. Gelişme görülen petrilerdeki izolatların saflık kontrolü, mikroskop altında analiz edilmiştir. Saf olmadığı gözlenen petrilere, tekrar taze besiyerine pelet şeklinde ekimler yapılmış ve gelişmeden sonra petrinin en uç kısmından filamentler alınarak tekrar taze besiyeri içeren petrilere orta kısma ekim yapılmıştır. Petrilerdeki gelişimden sonra tekrar mikroskop altında saflık kontrolü yapılmış ve bu işlemler kültür saflaştırılincaya kadar devam ettirilmiştir. Mikroskopta saflık kontrolü yapılarak saf olduğundan emin olunan kültürler oda sıcaklığında, sıvı kültürler şeklinde stoklanmıştır. Şekil 3.1’de Porsuk Çayı, Seydisuyu ve Bor havuzundan seçilen bazı izolatların besiyerindeki görüntüleri verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14 no’lu petrilere filamentöz, 2, 5 ve 10 no’lu petrilere ise tek hücreli Siyanobakteri kültürlerine aittir.



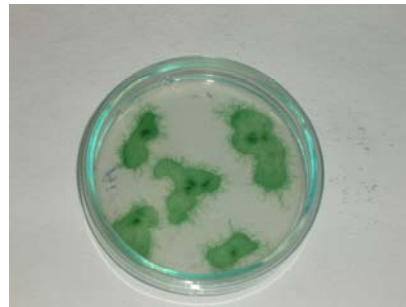
1)



2)



3)



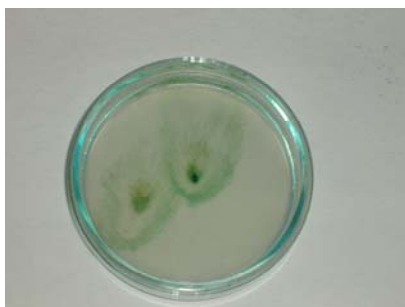
4)



5)



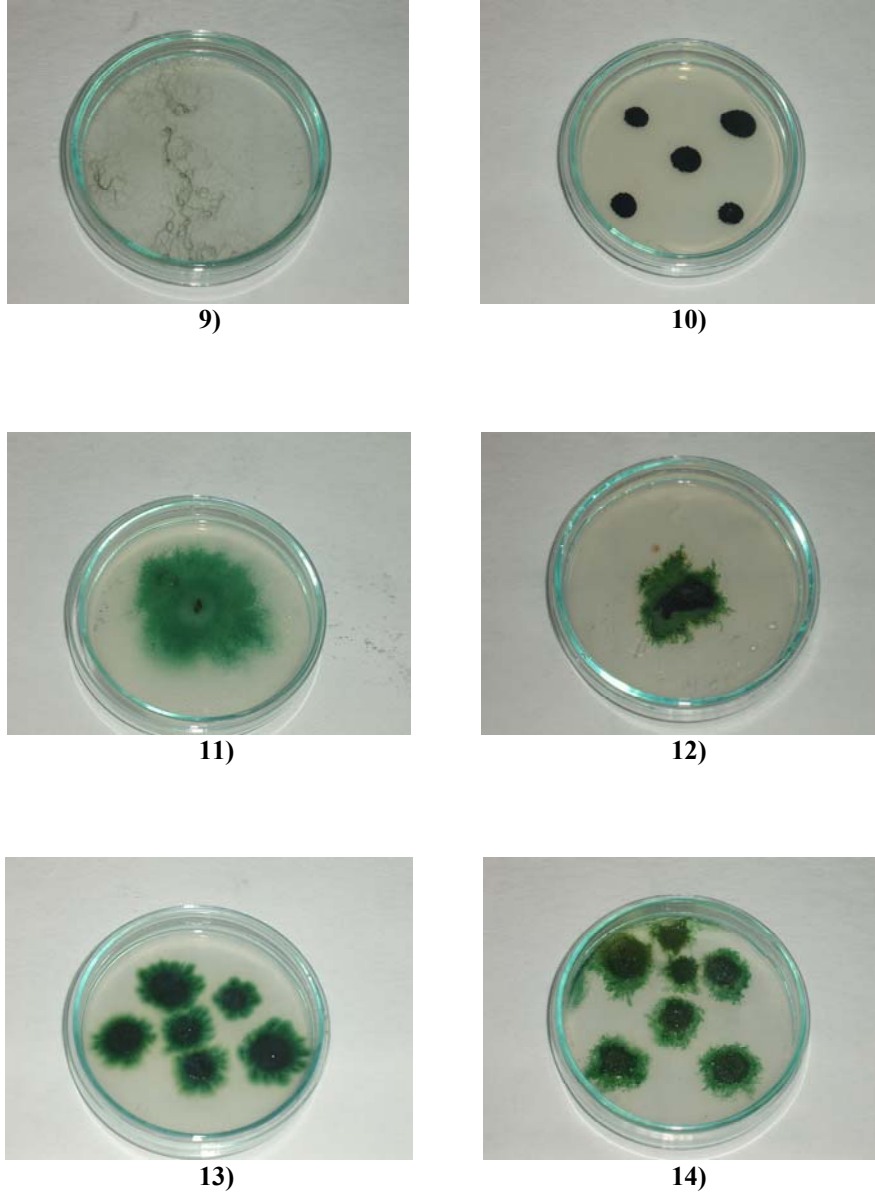
6)



7)



8)



Şekil 3.1. Seçilen bazı izolatların agar üzerindeki görüntüleri,

Porsuk Çayı'ndan elde edilmiş olan izolatlar, **1:** (M88), **2:** (M138), **3:** (M110), **4:** (M11), **5:** (M60), **6:** (M114), **7:** (M94) ve **8:** (M125), Seydisuyu'ndan elde edilmiş olan izolatlar, **9:** (M24), **10:** (M18), **11:** (M10), Bor havuzundan elde edilmiş izolatlar, **12:** (B43), **13:** (B44), **14:** (B50).

3.3. İzolatların İdentifikasyonu

3.3.1. İzolatların Mikroskopik Analizi

Sıvı kültürler kullanılarak ışık mikroskobu altında yapılan incelemeler sonucunda, izolatların filamentöz yada tek hücreli olup olmadıkları, saflıkları ve filamentöz türlerin heterosist içerip içermedikleri gibi morfolojik analizler yapılarak sonuçlar kaydedilmiştir. Yapılan mikroskopik inceleme sonucunda çoğu izolatın filamentli yapıda olduğu görülmüştür. Porsuk Çayı ve Seydisuyu'ndan elde edilen izolatların 98 tanesi Porsuk Çayı'ndan, 29 tanesi Seydisuyu'ndan ve 14 tanesi bor elementi içeren atık su havuzundan ve izole edilmiştir. Porsuk Çayı'ndan elde edilen izolatların 35 tanesinin tek hücreli, 63 tanesinin filamentöz olduğu, Seydisuyu'ndan elde edilen izolatların 6 tanesinin tek hücreli ve 23 tanesinin filamentöz olduğu, bor elementi içeren atık su havuzundan elde edilen 14 adet izolatın ise filamentöz olduğu yapılan mikroskopik incelemeler ile anlaşılmıştır. Porsuk Çayından 7, Seydisuyu'ndan ise 3 adet heterosist içeren filamentöz izolat elde edilmiştir. Şekil 3.2'de Şekil 3.1.de petrideki görüntüleri verilmiş olan Porsuk Çayı, Seydisuyu ve Bor havuzundan seçilen izolatların mikroskopik görüntüleri verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14 no'lu mikroskopik görüntüler filamentöz, 2, 5 ve 10 no'lu mikroskopik görüntüler ise tek hücreli Siyanobakteri kültürlerine aittir.



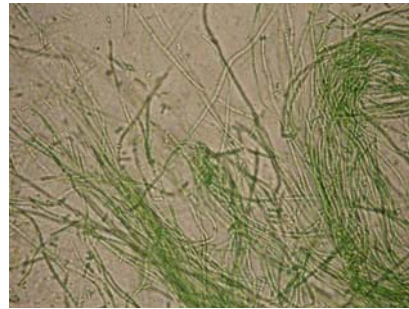
1)



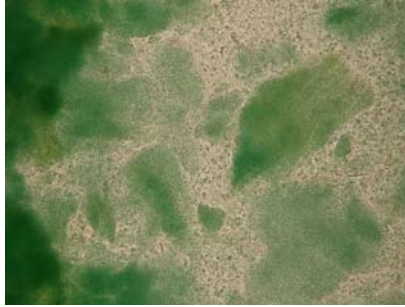
2)



3)



4)



5)



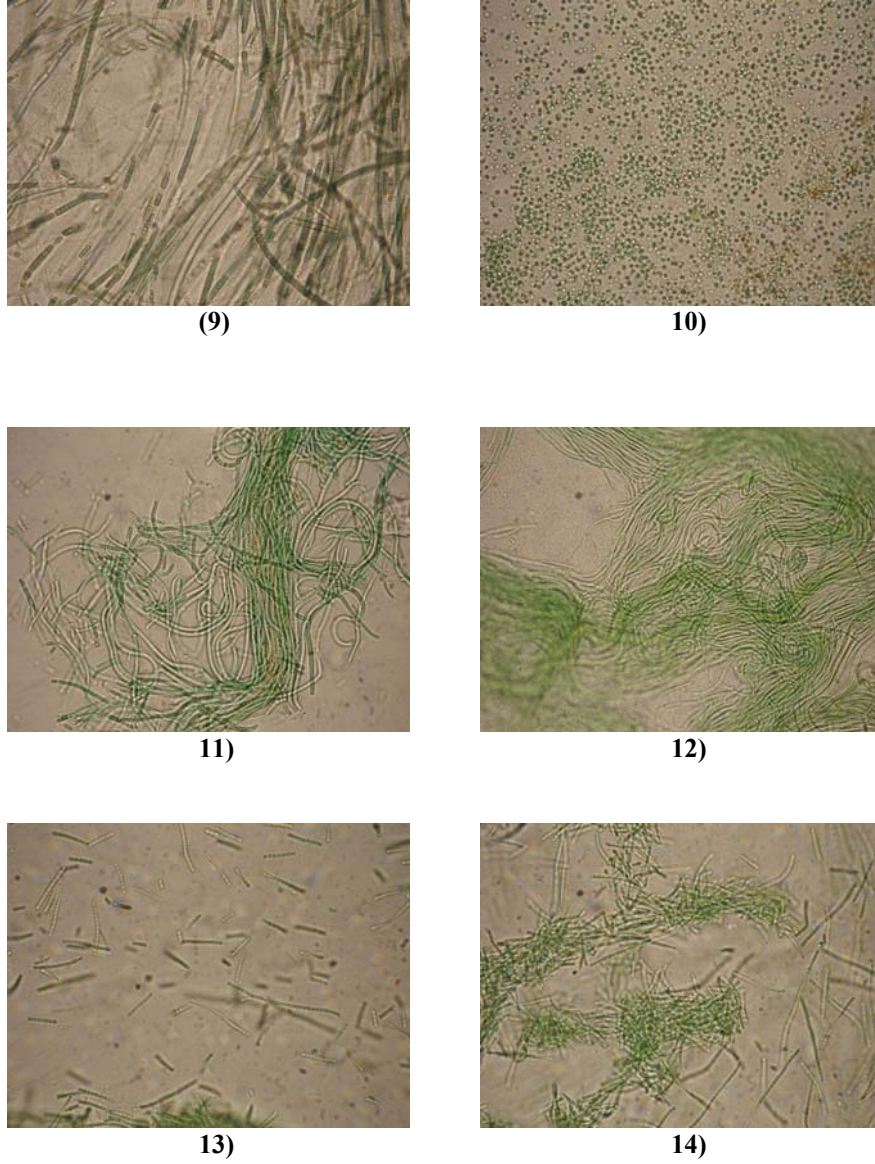
6)



7)



8)



Şekil 3.2. Seçilen bazı izolatların mikroskobik görüntüleri: (40 X objektif kullanılmıştır).

Porsuk Çayı'ndan elde edilmiş olan izolatlar, **1:** (M88; *Leptolyngbya*), **2:** (M138; *Synechococcus*), **3:** (M110; *Leptolyngbya*), **4:** (M11; *Leptolyngbya*), **5:** (M60; *Synechococcus*), **6:** (M114; *Pseudoanabaena*), **7:** (M94; *Leptolyngbya*) ve **8:** (M125; *Pseudoanabaena*), Seydisuyu'ndan elde edilmiş olan izolatlar, **9:** (M24; *Leptolyngbya*), **10:** (M18; *Synechocystis*), **11:** (M10; *Leptolyngbya*), Bor havuzundan elde edilmiş izolatlar, **12:** (B43; *Leptolyngbya*), **13:** (B44; *Leptolyngbya*), **14:** (B50; *Leptolyngbya*).

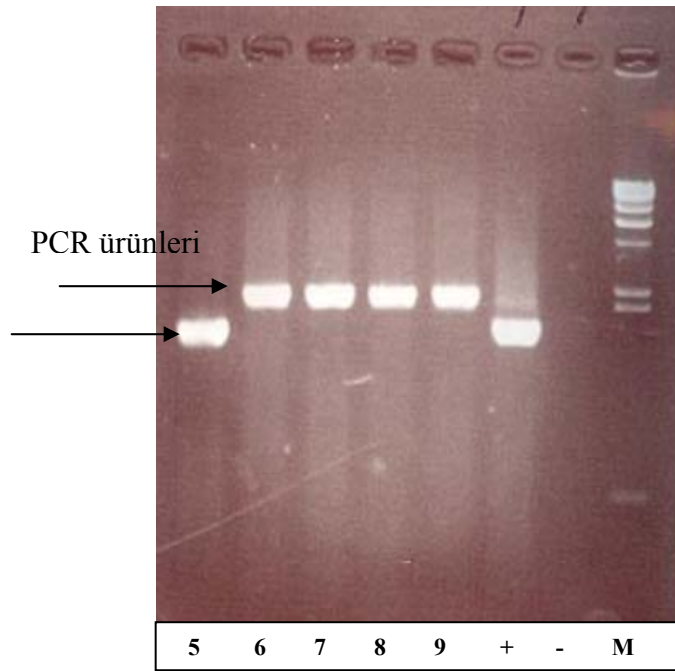
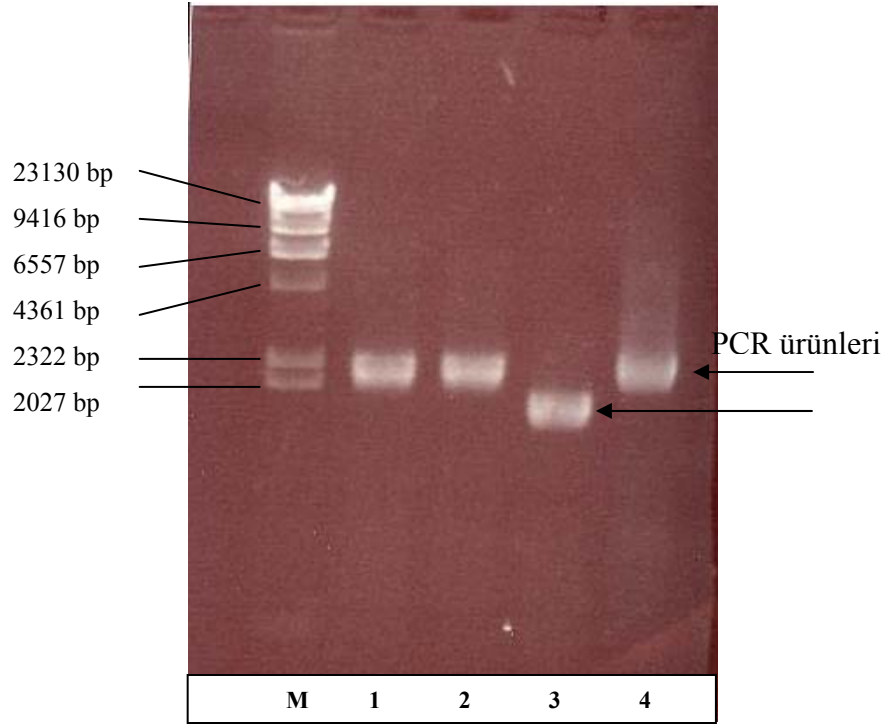
3.3.2. İzolatların Moleküler İdentifikasyonu

3.3.2.1. 16S rRNA geni Amplifikasyonu İçin İzolatlardan DNA Ekstraksiyonu

Çalışmada su örneklerinden izole edilen Siyanobakterilerin 16S rRNA geni amplifikasyonu için daha önce 2.2.4.2’de belirtilen yöntemin DNA ekstraksiyonu için uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

3.3.2.2. 16S rRNA + ITS + 5’ 23S rRNA’nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) İle Amplifikasyonu

Su örneklerinden elde edilen Siyanobakterilerin genomik DNA’sından 16S rRNA gen + ITS ve 5’ 23S ucunun PCR amplifikasyonu 2.2.4.2’de belirtilen PCR koşullarında CYA 359F (5’-ggggaattttccgcaatggg-3’) ve 23S30R (5’-cttcgcctctgtgtgcctaggt-3’) primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR sonrası elde edilen amplifikasyon ürünleri %1,5’luk agaroz jelde yürütülmüştür. Şekil 3.3.’de elde edilen amplifikasyon ürünlerinden bazı örnekler verilmiştir. 16S rRNA + ITS + 5’ 23S rRNA’nın yaklaşık olarak 1500-2000 baz büyüklüğünde bir ürün olması gerektiğinden, elde edilen ürünün büyüklüğü, kullanılan Lambda DNA/HindIII Marker’ın bant profili ile karşılaştırılarak doğrulanmıştır. Ayrıca şekilde görüldüğü gibi, oluşan PCR ürünlerinin büyüklüğündeki ufak farklılıklar, filamentöz ve tek hücreli Siyanobakterilerin sahip oldukları ITS bölgesinin farklı büyüklüklerde olmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 3.3. 16S rRNA + ITS + 5' 23S rRNA geni amplifikasyon ürünleri: (~2000-2500 bp)

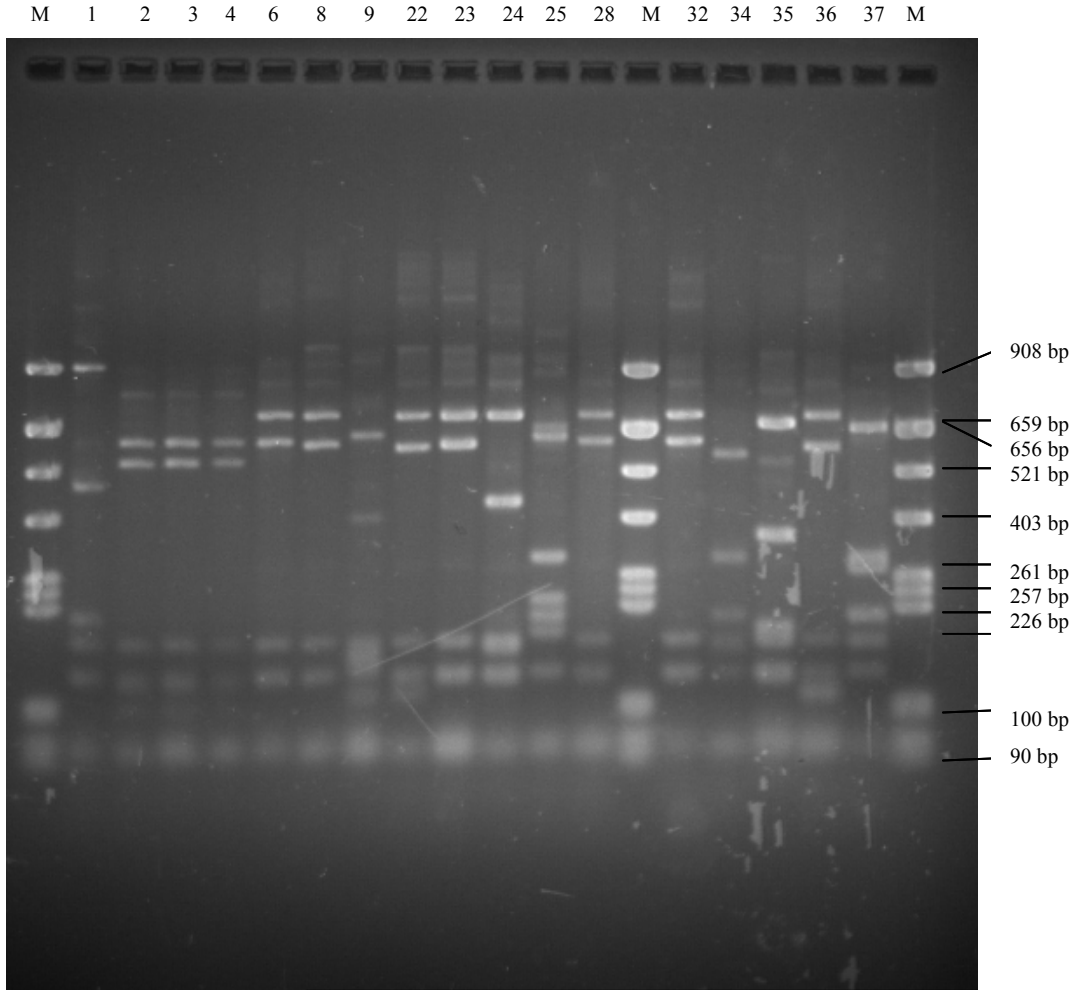
(1: 131, 2: 132, 3: 133, 4: 134, 5:135, 6: 136, 7: 137, 8: 138, 9: 140, +: Arthrospira sp. DNA'sı, -: DNA içermeyen PCR karışımı, M: Lambda DNA/HindIII markır).

Şekil 3.3’de elde edilen PCR ürünlerinin büyüklüğü markır ile karşılaştırıldığında, 2000 baz büyüklüğündeki fragmentin hizasına karşılık geldiği görülmektedir. Elde edilen PCR ürünlerinin az çok farklı hizada olmasının nedeni, filamentöz ve tek hücreli türlerde ITS bölgesinin farklı büyüklükte olması şeklinde açıklanabilir.

3.3.2.3. Elde edilen İzolatların 16S rRNA + ITS + 5’ 23S rRNA’nın Amplified Ribosomal DNA Restriction Analizi (ARDRA)

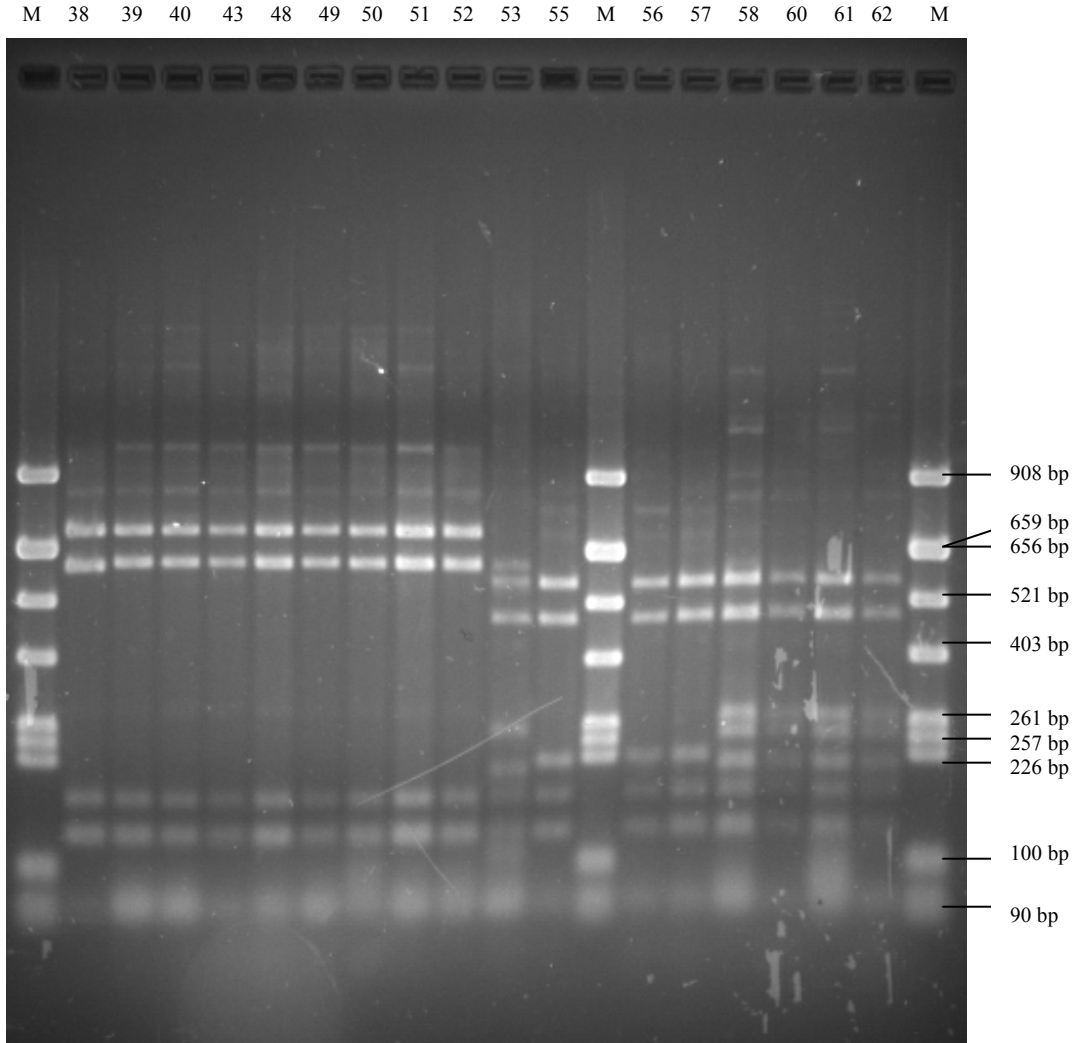
İzolatlardan elde edilen PCR ürünlerinin, ARDRA analizleri için kalıp olarak, amplifiye edilen 16S rRNA + ITS + 5’ 23S rRNA bölgesi kullanılmıştır. PCR reaksiyonu daha önce belirtilen koşullarda CYA 359F (5’-ggggaattttccgcaatggg-3’) ve 23S30R (5’-cttcgcctctgtgcctaggt-3’) primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzolatlardan elde edilen PCR ürünlerinin kesimi için *MspI* restriksiyon endonukleaz (MBI Fermentas) kullanılmıştır.

Aşağıdaki şekillerde agaroz jel elektroforezi ile elde edilen restriksiyon fragmentlerinden bazıları Şekil 3.4.a, 3.4.b ve 3.4.c’de örneklenmiştir.



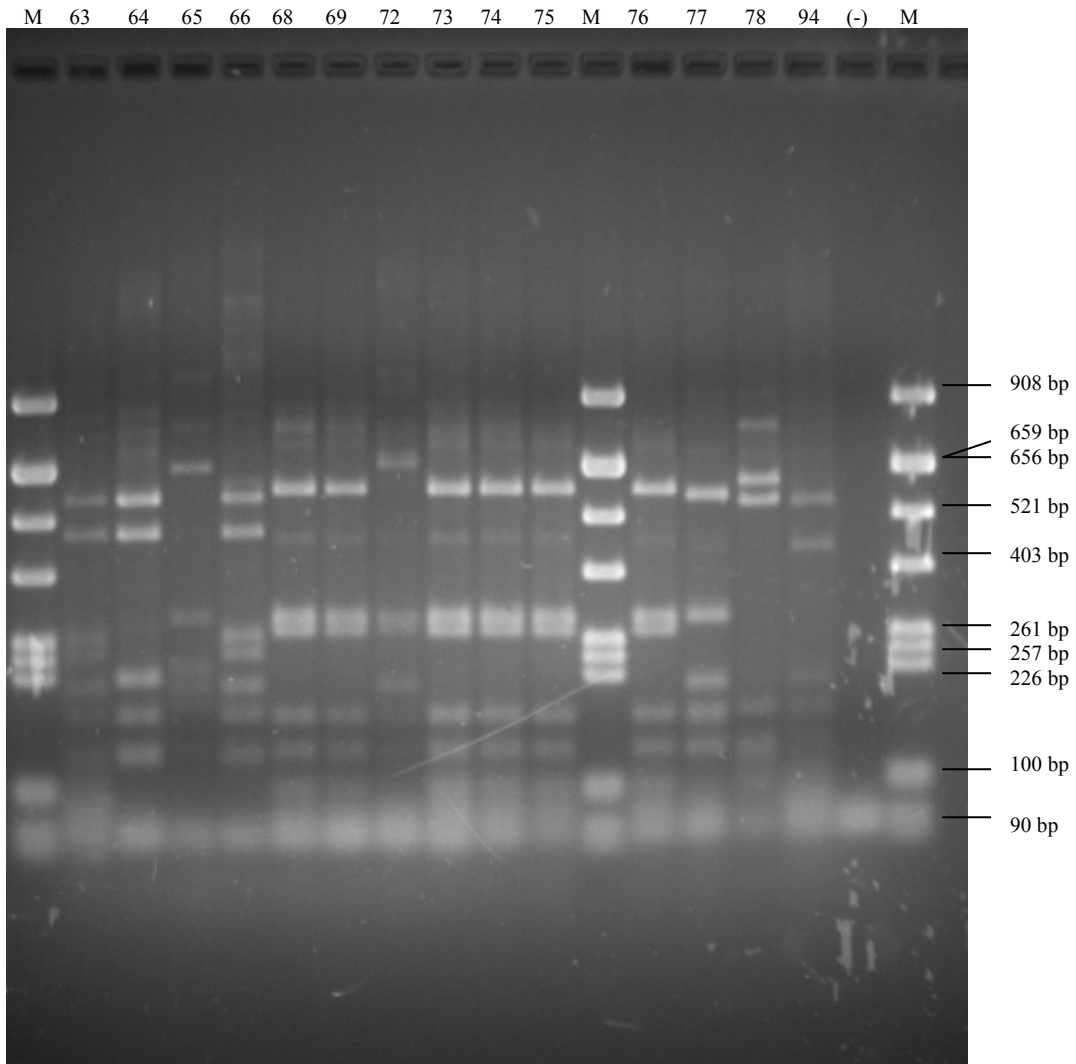
Şekil 3.4.a. Elde edilen izolatların ARDRA jeli (1) (*MspI*)

Şekil 3.4.a'da örnek olarak 2, 3, 4, no'lu izolatlara ait olan 16S rRNA gen bölgesi restriksiyon profillerinin aynı olduğu, 6, 8, 28, ve 32 no'lu izolatlara ait olan 16S rRNA gen bölgesi restriksiyon profillerinin de aynı olduğu görülmektedir. Aynı restriksiyon profiline sahip olan bu izolatlar aynı grup içerisinde toplanmıştır.



Şekil 3.4.b. Elde edilen izolatların ARDRA jeli (2) (*MspI*)

Şekil 3.4.b’de örnek olarak, 38, 39, 40, 43, 48, 49, 50, 51, 52 no’lu izolatlara ait olan 16S rRNA gen bölgesi restriksiyon profillerinin aynı, 55, 56, 57, no’lu izolatlara ait olan 16S rRNA gen bölgesi restriksiyon profillerinin ve yine 60, 61 ve 62 no’lu izolatlara ait olan 16S rRNA gen bölgesi restriksiyon profilinin de aynı olduğu görülmektedir. Aynı restriksiyon profiline sahip olan bu izolatlar aynı grup içerisinde toplanmıştır.



Şekil 3.4.c Elde edilen izolatların ARDRA jeli (3) (*MspI*)

Şekil 3.4.a.b.c). Elde edilen izolatların 16S PCR ürünlerinin Amplified Ribosomal DNA Restriction Analizi (ARDRA) ni göstermektedir. PCR ürünleri *MspI* ile kesilmiştir. Elektroforez %2'lik agaroz jel hazırlanarak TAE tamponu içerisinde 90V'da 180 dk süre ile gerçekleştirilmiştir. Moleküler markır (M)-PBR322/*AluI* (Fermentas). numaralar izolatlara verilen numaraları belirtmektedir.

Şekil 3.4.c'de örnek olarak 68, 69, 73, 74, 75, 76 no'lu izolatlara ait olan 16S rRNA gen bölgesi restriksiyon profillerinin aynı olduğu görülmektedir.

Şekil 3.4.a, 3.4.b ve 3.4.c’de görüldüğü gibi, elde edilen PCR ürünlerinin farklı restriksiyon profilleri görünmektedir. Aynı restriksiyon profiline sahip olan izolatlar aynı grup adı altında toplanmıştır. Gruplamalar yapılırken, her bir izolata ait olan bant sayıları ve bu bantların kullanılan PBR322/*AluI* (Fermentas) markırına göre pozisyonları kriter alınmıştır. Örnek olarak verildiği gibi, jel (a) daki 2, 3, 4 olarak isimlendirilmiş izolatlara ait bant profili bir grup oluşturmakta, 6, 8, 28, 32 olarak isimlendirilmiş izolatlara ait bant profili diğer bir grubu oluşturmaktadır. Örneklerde de verildiği gibi, tüm fragment profilleri, kullanılan markıra göre analiz edilmiş ve elde edilen 141 adet izolata toplam 24 farklı restriksiyon profil grubu elde edilmiştir. İzolatların ait oldukları profil grupları Çizelge 3.2.’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. İzolatların ARDRA profil grup numaraları

<i>Grup No</i>	<i>İzolat No</i>
<i>Grup 1</i>	<i>Porsuk Çayı:</i> M58, M60, M61, M62, M63, M66, M131, M132, M134, M136, M137, M138, S26, M140, M5, M54
<i>Grup 2</i>	<i>Porsuk Çayı:</i> M55, M56, M57, M64, M87, M88, M89, M94, M20, M21, M77
<i>Grup 3</i>	<i>Seydisuyu:</i> M37 <i>Porsuk Çayı:</i> M85
<i>Grup 4</i>	<i>Seydisuyu:</i> M108 <i>Porsuk Çayı:</i> M30, M68, M69, M73, M74, M75, M76, M81, M82, M83, M90, M91, M92, M97, M98, M99, M100, M114, M115, M118, M121, M125, M41, M67, M79
<i>Grup 5</i>	<i>Seydisuyu:</i> M10, M17, M109 <i>Porsuk Çayı:</i> M34, M77, M101, M110
<i>Grup 6</i>	<i>Seydisuyu:</i> M2, M4, M13, M14, M18, M111, M117, M127 <i>Porsuk Çayı:</i> M3, M78, M86, M122, M135, M104
<i>Grup 7</i>	<i>Seydisuyu:</i> M8, M12, M22, M23, M28, M32, M36, M38 <i>Porsuk Çayı:</i> M6, M11, M19 <i>Bor havuzu:</i> B15, B39, B40, B42, B43, B44, B45, B46, B47, B48, B49, B50, B51, B52
<i>Grup 8</i>	<i>Porsuk Çayı:</i> M1
<i>Grup 9</i>	<i>Seydisuyu:</i> M6, M24 <i>Porsuk Çayı:</i> M126

Grup 10	Porsuk Çayı: M25, M65, M72, M80
Grup 11	Seydisuyu: M35, M123
Grup 12	Porsuk Çayı: M95, M102
Grup 13	Porsuk Çayı: M93, M133
Grup 14	Porsuk Çayı: M53, M119, M124, M105, M59
Grup 15	Seydisuyu: M9, M116 Porsuk Çayı: M26, M31, M70, M106
Grup 16	Porsuk Çayı: M107
Grup 17	Porsuk Çayı: M96
Grup 18	Porsuk Çayı: M103, M128, M84
Grup 19	Porsuk Çayı: M112
Grup 20	Seydisuyu: M129 Porsuk Çayı: M15, M27, M29
Grup 21	Porsuk Çayı: M130
Grup 22	Seydisuyu: M7 Porsuk Çayı: M33, M113, M71
Grup 23	Porsuk Çayı: M120
Grup 24	Porsuk Çayı: M16

Çizelge 3.2.de görüldüğü gibi, Grup1, Grup 4, Grup 6 ve Grup 7 nin en fazla sayıda üye içeren gruplar olduğu, Grup 8, Grup 16, Grup 17, Grup 19, Grup 21, Grup 23 ve Grup 24'ün ise tek üyeye sahip oldukları görülmüştür. Seydisuyu'na ait olan örnekler Grup 3, Grup 4, Grup 5, Grup 6, Grup 7, Grup 9, Grup 11, Grup 15, Grup 20, Grup 22 içerisinde toplanmıştır. Ayrıca bor havuzuna ait olan örneklerin sadece Grup 7 içerisinde toplandığı görülmüştür. Seydisuyu'ndaki en fazla olan 8 üye sayısının, Grup 6 ve Grup 7 içerisinde

toplandığı, diğer grupların ise 1, 2 yada 3 üye sayısına sahip olduğu görülmüştür. Porsuk Çayındaki en fazla üye sayısını ise Grup 1 ve Grup 4 içermiştir.

Her bir gruba ait olan temsili 1 izolat seçilerek bu izolatın, 16S rRNA + ITS + 5' 23S rRNA gen bölgesi amplifikasyon ürününün (yaklaşık 2000-2500 bp) kısmi DNA dizi analizi yapılmıştır. Elde edilen dizi analizi sonuçları Blast (Basic Local Alignment Search Tools) algorithm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ile analiz edilmiştir. The BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) software programı otomatize Clustal W alignment temeline bağlı olarak sekans alignment için kullanılmıştır. Sonuçlar Çizelge 3.3'de gösterilmiştir.

Sonuç olarak, Porsuk Çayı'ndan *Synechococcus*, *Cyanobium*, *Anabaenopsis*, *Leptolyngbya*, *Microcoleus*, *Pseudanabaena*, *Synechocystis*, *Oscillatoria*, *Snowella*, *Nostoc*, *Phormidium* ve *Limnothrix* cinslerine ait izolatlar, Seydisuyu'ndan *Pseudanabaena*, *Anabaenopsis*, *Leptolyngbya*, *Phormidium*, *Synechocystis* ve *Nostoc* cinslerine ait izolatlar ve Bor havuzundan ise sadece *Leptolyngbya* cinsine ait izolatlar elde edilmiştir.

Çizelge 3.4.1'de analiz edilen izolatların morfolojik özellikleri, örnekleme tarihleri, örnekleme yapılan istasyon kodları ve ARDRA grup numaraları özetlenmiştir. Çizelge den de görüldüğü gibi 21 istasyonu bulunan Porsuk Çayı'ndan 98, 4 istasyonu bulunan Seydisuyu'ndan 29 ve bor havuzu'ndan 14 adet izolat elde edilmiştir. Porsuk Çayı'ndan elde edilen izolatların 35 tanesinin tek hücreli, 63 tanesinin filamentöz olduğu, Seydisuyu'ndan elde edilen izolatların 8 tanesinin tek hücreli ve 21 tanesinin filamentöz olduğu, bor elementi içeren atık su havuzundan elde edilen 14 adet izolatın ise filamentöz olduğu yapılan mikroskopik incelemeler ile anlaşılmıştır. Ayrıca Porsuk Çayı'ndan 24, Seydisuyu'ndan 10 ve Bor havuzu'ndan sadece bir farklı ARDRA grubu oluşturan izolatlar elde edilmiştir. Porsuk Çayı ve Seydisuyu'nun 9 ortak ARDRA grubu oluşturduğu da görülmektedir.

Çizelge 3.4.2.'de ise elde edilen izolatların her bir istasyona göre morfolojik dağılımları özetlenmiştir. Çizelgede de görüldüğü gibi Porsuk Çayı'ndaki en fazla çeşitlilik 010, 205 ve 100 no'lu istasyondan Seydisuyu'nda ise 137 no'lu istasyondan elde edilmiştir. Bor havuzundan elde edilen 14 filamentöz izolatın ise tek bir grupta toplandığı görülmüştür.

Çizelge 3.3. İzolatların 16S rRNA + ITS + 5' 23S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu ile elde edilen BLAST analiz sonuçları

Örnek	İstasyon kodu	Örnekleme tarihi	İsim	ARDRA Grup no	Tip	Amplifikasyon primeri	Sekans primeri	Sonuç	Benzerlik (%)	Gen bank numarası	Uzunluk (bp)
Bor havuzu		Ocak 2006	b15	7	izolat	359F/B23S	1092, 1494, 23S30R (contig)	Kültive edilmemiş Siyanobakteri klon R8-R56 Leptolyngbya sp. OBB30S02	%99 %97	DQ181691.1 AJ639892.1	1057
Bor havuzu		Ocak 2006	b15	7	izolat	359F/B23S	23S30R	Kültive edilmemiş Siyanobakteri klon R8-R56 Leptolyngbya sp. OBB19S12	%91 %99	DQ181761.1 AJ639895.1	706
Porsuk Çayı	205	Mart 2006	s26	1	izolat	359F/B23S	1092, 1494, 23S30R (contig)	Synechococcus PCC 7009	%100	AF216945	1068
Porsuk Çayı	205	Mart 2006	s26	1	izolat	359F/B23S	23S30R	Synechococcus sp. BGS171	%97	AF330246.1	658
Porsuk Çayı	O13	Mayıs 2006	M1	8	izolat	359F/B23S	1092	Cyanobium sp. LB03	%99	AY183115.1	607
Seydisuyu	137	Ağustos 2006	M9	15	izolat	359F/B23S	1092	Anabaenopsis circularis NIES21	%96	AF247595	649
Porsuk Çayı	18	Mayıs 2006	M16	24	izolat	359F/B23S	1092	Leptolyngbya frigida ANT.LH70	%96	AY493574.1	628
Seydisuyu	137	Nisan 2006	M24	9	izolat	359F/B23S	1092	Leptolyngbya sp. CNP1-Z1-C2	%99	AY239601.1	638
Seydisuyu	137	Nisan 2006	M28	7	izolat	359F/B23S	1092	Leptolyngbya antartica ANT. ACEV6.1	%99	AY493589.1	667
Seydisuyu	OO8	Ocak 2006	M35	11	izolat	359F/B23S	1092	Phormidium sp. MBIC10025	%97	AB183566.1	665
Porsuk Çayı	202	Mart 2006	M53	14	izolat	359F/B23S	1092	Synechococcus sp. 1 tu21s05	%100	AM259271.1	659
Porsuk Çayı	100	Mart 2006	M56	2	izolat	359F/B23S	1092	Leptolyngbya sp. OBB19S12	%99	AJ639895.1	664
Porsuk Çayı	203	Mart 2006	M60	1	izolat	359F/B23S	1092	Synechococcus sp. B9801	%99	DQ275599.1	652

Çizelge 3.3. Devamı

Porsuk Çayı	O11	Mart 2006	M65	10	izolat	359F/B23S	1092	Microcoleus vaginatus PCC 9802	%99	AF284803	666
Porsuk Çayı	238	Mayıs 2006	M68	4	izolat	359F/B23S	1092	Pseudanabaena sp. 1tu24s9	%99	AM259269.1	665
Porsuk Çayı	237	Mayıs 2006	M77	5	izolat	359F/B23S	1092	Kültive edilmemiş Siyanobakteri klon HAVO Leptolyngbya sp. PCC 9221	%94 %93	EF032786.1 AF317507.1	593
Porsuk Çayı	O10	Ocak 2006	M85	3	izolat	359F/B23S	1092	Pseudanabaena sp. PCC 6903	%99	AF132778.1	650
Porsuk Çayı	47	Haziran 2006	M86	6	izolat	359F/B23S	1092	Synechocystis sp. PCC 6803 DNA	%100	BA000022.2	667
Porsuk Çayı	239	Ağustos 2006	M93	13	izolat	359F/B23S	1092	Oscillatoria sp. 0H25	%93	AF317508	638
Porsuk Çayı	236	Mayıs 2006	M95	12	izolat	359F/B23S	1092	Synechococcus sp. 1 tu21s05	%100	AM259271.1	654
Porsuk Çayı	O17	Mayıs 2006	M96	17	izolat	359F/B23S	1092	Kültive edilmemiş Siyanobakteri klon RD010 Pseudoanabaena sp. PCC 6903	%99 %98	DQ181672.1 AF132778.1	615
Porsuk Çayı	O15	Ağustos 2006	M103	18	izolat	359F/B23S	1092	Synechococcus sp. 1 MW99B6	%99	AY151247.1	658
Porsuk Çayı	238	Mayıs 2006	M107	16	izolat	359F/B23S	1092	Snowella litoralis 1LT47S05	%99	AJ781041.1	669
Porsuk Çayı	O15	Ağustos 2006	M112	19	izolat	359F/B23S	1092	Synechococcus sp. PCC 7009	%100	AM709628.1	665
Porsuk Çayı	O16	Ağustos 2006	M113	22	izolat	359F/B23S	1092	Nostoc calcicola VI partial 16S rRNA gene	%97	AJ630448.1	670
Porsuk Çayı	100	Haziran 2006	M120	23	izolat	359F/B23S	1092	Phormidium pseudopristleyi ANT.ACEV5.3	%99	AY493600.1	599
Seydisuyu	137	Ocak 2006	M129	20	izolat	359F/B23S	1092	Phormidium cf. terebriformis KR2003/25	%100	AY575936.1	654
Porsuk Çayı	O11	Haziran 2006	M130	21	izolat	359F/B23S	1092	Limnothrix sp. CENA 110	%98	EF088338.1	667

Çizelge 3.4.1. İzolat numaraları, izolatların tek hücreli (u) yada filamentöz (f) özellikleri, örnekleme yapılan tarihler, örnekleme bölgelerinin kodları ve ARDRA jel sonucunda elde edilen grup numaraları ve identifikasyon sonuçları

İzolat no	İzolatların morfolojik özellikleri (F; filamentöz, U; unicelüler, h; heterocystis)	Örnekleme tarihleri (2006)	İstasyon kodları [porsuk, seydisuyu (S) ve bor havuzu]	ARDRA analizi ve grup numarası	İdentifikasyon sonucu
M1	U	Mayıs	013	Grup 8	<i>Cyanobium</i>
M2	U	Nisan	136 (S)	Grup 6	<i>Synechocystis</i>
M3	U	Ağustos	018	Grup 6	<i>Synechocystis</i>
M4	U	Ocak	137 (S)	Grup 6	<i>Synechocystis</i>
M5	U	Haziran	202	Grup 1	<i>Synechococcus</i>
M6	F	Ağustos	136 (S)	Grup 9	<i>Leptolyngbya</i>
M7	F (h)	Haziran	136 (S)	Grup 22	<i>Nostoc</i>
M8	F	Ağustos	156 (S)	Grup 7	<i>Leptolyngbya</i>
M9	F (h)	Ağustos	137 (S)	Grup 15	<i>Anabaenopsis</i>
M10	F	Nisan	136 (S)	Grup 5	<i>Leptolyngbya</i>
M11	F	Mayıs	010	Grup 7	<i>Leptolyngbya</i>
M12	F	Ağustos	137 (S)	Grup 7	<i>Leptolyngbya</i>
M13	U	Nisan	008 (S)	Grup 6	<i>Synechocystis</i>
M14	U	Nisan	008 (S)	Grup 6	<i>Synechocystis</i>
M15	F	Haziran	012	Grup 20	<i>Phormidium</i>
M16	F	Mayıs	018	Grup 24	<i>Leptolyngbya</i>
M17	F	Nisan	008 (S)	Grup 5	<i>Leptolyngbya</i>
M18	U	Haziran	136 (S)	Grup 6	<i>Synechocystis</i>
M19	F	Haziran	205	Grup 7	<i>Leptolyngbya</i>
M20	F	Ocak	205	Grup 2	<i>Leptolyngbya</i>
M21	F	Ocak	100	Grup 2	<i>Leptolyngbya</i>
M22	F	Ocak	136 (S)	Grup 7	<i>Leptolyngbya</i>
M23	F	Haziran	137 (S)	Grup 7	<i>Leptolyngbya</i>
M24	F	Nisan	137 (S)	Grup 9	<i>Leptolyngbya</i>
M25	F	Ağustos	010	Grup 10	<i>Microcoleus</i>
M26	F (h)	Ağustos	072	Grup 15	<i>Anabaenopsis</i>
M27	F	Ağustos	072	Grup 20	<i>Phormidium</i>
M28	F	Nisan	137 (S)	Grup 7	<i>Leptolyngbya</i>
M29	F	Mayıs	019	Grup 20	<i>Phormidium</i>
M30	F	Mayıs	072	Grup 4	<i>Pseudoanabaena</i>
M31	F (h)	Haziran	205	Grup 15	<i>Anabaenopsis</i>
M32	F	Ağustos	136 (S)	Grup 7	<i>Leptolyngbya</i>
M33	F (h)	Mart	205	Grup 22	<i>Nostoc</i>
M34	F	Ağustos	017	Grup 5	<i>Leptolyngbya</i>
M35	F	Ocak	008 (S)	Grup 11	<i>Phormidium</i>
M36	F	Ocak	136 (S)	Grup 7	<i>Leptolyngbya</i>
M37	F	Ocak	008 (S)	Grup 3	<i>Pseudoanabaena</i>
M38	F	Ağustos	156 (S)	Grup 7	<i>Leptolyngbya</i>
B39	F	Ocak	Bor havuz	Grup 7	<i>Leptolyngbya</i>
B40	F	Ocak	Bor havuz	Grup 7	<i>Leptolyngbya</i>
M41	F	Mayıs	019	Grup 4	<i>Pseudoanabaena</i>
B42	F	Nisan	Bor havuz	Grup 7	<i>Leptolyngbya</i>
B43	F	Nisan	Bor havuz	Grup 7	<i>Leptolyngbya</i>

B44	F	Ağustos	Bor havuz	Grup 7	<i>Leptolyngbya</i>
B45	F	Haziran	Bor havuz	Grup 7	<i>Leptolyngbya</i>
B46	F	Haziran	Bor havuz	Grup 7	<i>Leptolyngbya</i>
B47	F	Ağustos	Bor havuz	Grup 7	<i>Leptolyngbya</i>
B48	F	Nisan	Bor havuz	Grup 7	<i>Leptolyngbya</i>
B49	F	Nisan	Bor havuz	Grup 7	<i>Leptolyngbya</i>
B50	F	Ağustos	Bor havuz	Grup 7	<i>Leptolyngbya</i>
B51	F	Ocak	Bor havuz	Grup 7	<i>Leptolyngbya</i>
B52	F	Haziran	Bor havuz	Grup 7	<i>Leptolyngbya</i>
M53	U	Mart	202	Grup 14	<i>Synechococcus</i>
M54	U	Haziran	100	Grup 1	<i>Synechococcus</i>
M55	F	Mart	206	Grup 2	<i>Leptolyngbya</i>
M56	F	Mart	100	Grup 2	<i>Leptolyngbya</i>
M57	F	Mart	205	Grup 2	<i>Leptolyngbya</i>
M58	U	Mart	100	Grup 1	<i>Synechococcus</i>
M59	U	Ağustos	010	Grup 14	<i>Synechococcus</i>
M60	U	Mart	203	Grup 1	<i>Synechococcus</i>
M61	U	Mart	203	Grup 1	<i>Synechococcus</i>
M62	U	Mart	047	Grup 1	<i>Synechococcus</i>
M63	U	Haziran	202	Grup 1	<i>Synechococcus</i>
M64	F	Mart	012	Grup 2	<i>Leptolyngbya</i>
M65	F	Mart	011	Grup 10	<i>Microcoleus</i>
M66	U	Mart	094	Grup 1	<i>Synechococcus</i>
M67	F	Ağustos	016	Grup 4	<i>Pseudoanabaena</i>
M68	F	Mayıs	238	Grup 4	<i>Pseudoanabaena</i>
M69	F	Mayıs	239	Grup 4	<i>Pseudoanabaena</i>
M70	F (h)	Ocak	100	Grup 15	<i>Anabaenopsis</i>
M71	F (h)	Mart	011	Grup 22	<i>Nostoc</i>
M72	F	Haziran	094	Grup 10	<i>Microcoleus</i>
M73	F	Mayıs	237	Grup 4	<i>Pseudoanabaena</i>
M74	F	Ağustos	010	Grup 4	<i>Pseudoanabaena</i>
M75	F	Ağustos	013	Grup 4	<i>Pseudoanabaena</i>
M76	F	Haziran	100	Grup 4	<i>Pseudoanabaena</i>
M77	F	Mayıs	237	Grup 2	<i>Leptolyngbya</i>
M78	U	Haziran	205	Grup 6	<i>Synechocystis</i>
M79	F	Ağustos	013	Grup 4	<i>Pseudoanabaena</i>
M80	F	Haziran	203	Grup 10	<i>Microcoleus</i>
M81	F	Mayıs	013	Grup 4	<i>Pseudoanabaena</i>
M82	F	Ağustos	013	Grup 4	<i>Pseudoanabaena</i>
M83	F	Ağustos	013	Grup 4	<i>Pseudoanabaena</i>
M84	U	Ağustos	236	Grup 18	<i>Synechococcus</i>
M85	F	Ocak	010	Grup 3	<i>Pseudoanabaena</i>
M86	U	Haziran	047	Grup 6	<i>Synechocystis</i>
M87	F	Haziran	012	Grup 2	<i>Leptolyngbya</i>
M88	F	Haziran	100	Grup 2	<i>Leptolyngbya</i>
M89	F	Haziran	011	Grup 2	<i>Leptolyngbya</i>
M90	F	Mayıs	019	Grup 4	<i>Pseudoanabaena</i>
M91	F	Ağustos	237	Grup 4	<i>Pseudoanabaena</i>
M92	F	Ağustos	237	Grup 4	<i>Pseudoanabaena</i>
M93	F	Ağustos	239	Grup 13	<i>Oscillatoria</i>
M94	F	Haziran	100	Grup 2	<i>Leptolyngbya</i>
M95	U	Mayıs	236	Grup 12	<i>Synechococcus</i>
M96	F	Mayıs	017	Grup 17	<i>Pseudoanabaena</i>
M97	F	Mayıs	018	Grup 4	<i>Pseudoanabaena</i>

M98	F	Mayıs	016	Grup 4	<i>Pseudoanabaena</i>
M99	F	Ağustos	017	Grup 4	<i>Pseudoanabaena</i>
M100	F	Mayıs	016	Grup 4	<i>Pseudoanabaena</i>
M101	F	Ocak	100	Grup 5	<i>Leptolyngbya</i>
M102	U	Mart	047	Grup 12	<i>Synechococcus</i>
M103	U	Ağustos	015	Grup 18	<i>Synechococcus</i>
M104	U	Mart	011	Grup 6	<i>Synechocystis</i>
M105	U	Mayıs	010	Grup 14	<i>Synechococcus</i>
M106	F (h)	Mayıs	010	Grup 15	<i>Anabaenopsis</i>
M107	U	Mayıs	238	Grup 16	<i>Snowella</i>
M108	F	Haziran	137 (S)	Grup 4	<i>Pseudoanabaena</i>
M109	F	Ağustos	136 (S)	Grup 5	<i>Leptolyngbya</i>
M110	F	Ağustos	238	Grup 5	<i>Leptolyngbya</i>
M111	U	Ağustos	137 (S)	Grup 6	<i>Synechocystis</i>
M112	U	Ağustos	015	Grup 19	<i>Synechococcus</i>
M113	F (h)	Ağustos	016	Grup 22	<i>Nostoc</i>
M114	F	Ağustos	019	Grup 4	<i>Pseudoanabaena</i>
M115	F	Mayıs	010	Grup 4	<i>Pseudoanabaena</i>
M116	F (h)	Haziran	137 (S)	Grup 15	<i>Anabaenopsis</i>
M117	U	Ağustos	156 (S)	Grup 6	<i>Synechocystis</i>
M118	F	Mayıs	015	Grup 4	<i>Pseudoanabaena</i>
M119	U	Mayıs	072	Grup 14	<i>Synechococcus</i>
M120	F	Haziran	100	Grup 23	<i>Phormidium</i>
M121	F	Ağustos	016	Grup 4	<i>Pseudoanabaena</i>
M122	U	Haziran	206	Grup 6	<i>Synechocystis</i>
M123	F	Nisan	008 (S)	Grup 11	<i>Phormidium</i>
M124	U	Ağustos	072	Grup 14	<i>Synechococcus</i>
M125	F	Ağustos	018	Grup 4	<i>Pseudoanabaena</i>
M126	F	Ağustos	019	Grup 9	<i>Leptolyngbya</i>
M127	U	Haziran	156 (S)	Grup 6	<i>Synechocystis</i>
M128	U	Mayıs	015	Grup 18	<i>Synechococcus</i>
M129	F	Ocak	137 (S)	Grup 20	<i>Phormidium</i>
M130	F	Haziran	011	Grup 21	<i>Limnothrix</i>
M131	U	Haziran	202	Grup 1	<i>Synechococcus</i>
M132	U	Ağustos	239	Grup 1	<i>Synechococcus</i>
M133	F	Mart	047	Grup 13	<i>Oscillatoria</i>
M134	U	Haziran	203	Grup 1	<i>Synechococcus</i>
M135	U	Mayıs	236	Grup 6	<i>Synechocystis</i>
M136	U	Mayıs	017	Grup 1	<i>Synechococcus</i>
M137	U	Ağustos	010	Grup 1	<i>Synechococcus</i>
M138	U	Mayıs	017	Grup 1	<i>Synechococcus</i>
S26 (139)	U	Mart	205	Grup 1	<i>Synechococcus</i>
M140	U	Ağustos	010	Grup 1	<i>Synechococcus</i>
B15 (141)	F	Ocak	Bor havuz	Grup 7	<i>Leptolyngbya</i>

Çizelge 3.4.1.'den de görüldüğü gibi izolatların en çok ARDRA grup 4 (*Pseudoanabaena*) ve 7 (*Leptolyngbya*)'ye ait olduğu sonucuna varılmıştır. Sonuçları % olarak değerlendirecek olursak eğer Porsuk Çayı'na ait izolatların %16'sı Grup 1, %2'si Grup 12, %5'i Grup 14, %3'ü Grup 18, %1'i Grup 19' a ait olan ve BLAST sonucu *Synechococcus* cinsine karşılık gelen

izolatlardır. Yine Porsuk Çayı'nda *Leptolyngbya* cinsine karşılık gelen izolatların %11'i Grup 2, %4'ü Grup 5, %3'ü Grup 7, %1'i Grup 9, %1'inin Grup 24 içerisinde toplandığı, *Pseudoanabaena* cinsine karşılık gelen izolatların %1'inin Grup 3, %25'inin Grup 4, %1'inin Grup 17 içerisinde toplandığı sonucuna varılmıştır. *Synechocystis* cinsine karşılık gelen izolatların %6'sının Grup 6 içerisinde, *Cyanobium* cinsine karşılık gelen izolatların %1'inin Grup 8 içerisinde toplandığı, *Microcoleus* cinsine ait izolatların %4 oranında Grup 10 içerisinde, *Phormidium* cinsine ait izolatların %3 oranında Grup 20, %1 oranında Grup 23 içerisinde toplandığı, yine aynı şekilde *Oscillatoria* cinsine ait izolatların %2 oranında Grup 13 içerisinde toplandığı, *Anabaenopsis* cinsine ait izolatların %4 oranında Grup 15'e karşılık geldiği anlaşılmıştır. *Snowella* cinsine ait olan izolatlar %1 oranında Grup 16'ya, *Limnothrix* cinsine ait olan izolatlar %1 oranında Grup 21 içerisinde ve yine *Nostoc* cinsine karşılık gelen izolatların %3 oranında Grup 22 içerisinde toplandığı sonucuna varılmıştır.

Özetlenecek olursa, Porsuk Çayı'na ait olan izolatların; %27'si *Synechococcus*, %20'si *Leptolyngbya*, %27'si *Pseudoanabaena*, %6'sı *Synechocystis*, %1'i *Cyanobium*, %4'ü *Microcoleus*, %4'ü *Phormidium*, %2'si *Oscillatoria*, %4'ünün *Anabaenopsis*, %1'inin *Snowella*, %1'inin *Limnothrix*, %3'ünün ise *Nostoc* cinslerine karşılık geldiği anlaşılmıştır.

Seydisuyundaki izolatların % olarak değerleri incelendiğinde, %3,44'ünün *Pseudoanabaena* cinsine karşılık gelen Grup 3 içerisinde yine %3,44'ünün *Pseudoanabaena* cinsine karşılık gelen Grup 4 içerisinde toplandığı, %10,3'ünün *Leptolyngbya* cinsine karşılık gelen Grup 5, %27,5'inin *Synechocystis* cinsine karşılık gelen Grup 6 yine %27,5'inin *Leptolyngbya* cinsine karşılık gelen Grup 7, %6,8'inin *Leptolyngbya* cinsine karşılık gelen Grup 9 içerisinde toplandığı, %6,8'inin *Phormidium* cinsine karşılık gelen Grup 11, %6,8'inin *Anabaenopsis* cinsine karşılık gelen Grup 15, %3,4'ünün *Phormidium* cinsine karşılık gelen Grup 20 ve %3,4'ünün *Nostoc* cinsine karşılık gelen Grup 22 içerisinde toplandığı sonucuna varılmıştır.

Aynı şekilde özetlenecek olursa, Seydisuyu'na ait olan izolatların %7'sinin *Pseudoanabaena*, %45'inin *Leptolyngbya*, %27,5'inin *Synechocystis*, %10'unun

Phormidium, %6,8'inin *Anabaenopsis*, %3,4'ünün *Nostoc* cinsine ait izolatlar olduğu ortaya konulmuştur.

Bor havuzundan elde edilmiş olan izolatların ise %100'ünün *Leptolyngbya* cinsine karşılık gelen Grup 7 içerisinde toplandığı sonucuna varılmıştır.

Çizelge 3.4.2. Elde edilen izolatların istasyonlara göre morfolojik dağılımları

Bölge	İstasyon	Hücre Morfolojisi	ARDRA grupları
Porsuk	(010)	6 filamentöz (<i>M11, M25, M74, M85, M106, M115</i>) 4 tek hücreli (<i>M59, M105, M137, M140</i>)	(7, 10, 4, 3, 15, 4) (14, 14, 1, 1)
Porsuk	(202)	4 tek hücreli (<i>M5, M53, M63, M131</i>)	(1, 14, 1, 1)
Porsuk	(203)	1 filamentöz (<i>M80</i>) 3 tek hücreli (<i>M60, M61, M134</i>)	(10) (1, 1, 1)
Porsuk	(205)	5 filamentöz (<i>M19, M20, M31, M33, M57</i>) 2 tek hücreli (<i>M78, S26</i>)	(7, 2, 15, 22) (6, 1)
Porsuk	(206)	1 filamentöz (<i>M55</i>) 1 tek hücreli (<i>M122</i>)	(2) (6)
Porsuk	(011)	4 filamentöz (<i>M65, M71, M89, M130</i>) 1 tek hücreli (<i>M104</i>)	(10, 22, 2, 21) (6)
Porsuk	(012)	3 filamentöz (<i>M15, M64, M87</i>)	(20, 2, 2)
Porsuk	(094)	1 filamentöz (<i>M72</i>) 1 tek hücreli (<i>M66</i>)	(10) (1)
Porsuk	(047)	1 filamentöz (<i>M133</i>) 3 tek hücreli (<i>M62, M86, M102</i>)	(13) (1, 6, 12)
Porsuk	(100)	10 filamentöz (<i>M21, M56, M70, M76, M88, M94, M101, M120</i>) 2 tek hücreli (<i>M54, M58</i>)	(2, 2, 15, 4, 2, 2, 5, 23) (1, 1)
Porsuk	(013)	5 filamentöz (<i>M75, M79, M81, M82, M83</i>) 1 tek hücreli (<i>M1</i>)	(4, 4, 4, 4, 4) (8)
Porsuk	(236)	3 tek hücreli (<i>M84, M95, M135</i>)	(18, 12, 6)
Porsuk	(238)	2 filamentöz (<i>M68, M110</i>) 1 tek hücreli (<i>M107</i>)	(4, 5) (16)
Porsuk	(239)	2 filamentöz (<i>M69, M93</i>) 1 tek hücreli (<i>M132</i>)	(4, 13) (1)
Porsuk	(237)	4 filamentöz (<i>M73, M77, M91, M92</i>)	(4, 2, 4, 4)
Porsuk	(015)	1 filamentöz (<i>M118</i>) 3 tek hücreli (<i>M103, M112, M128</i>)	(4) (18, 19, 18)
Porsuk	(072)	3 filamentöz (<i>M26, M27, M30</i>) 2 tek hücreli (<i>M119, M124</i>)	(15, 20, 4) (14, 14)

Porsuk	(016)	5 filamentöz (M67, M98, M100, M113, M121)	(4, 4, 4, 22, 4)
Porsuk	(017)	3 filamentöz (M34, M96, M99) 2 tek hücreli (M136, M138)	(5, 17, 4) (1, 1)
Porsuk	(018)	3 filamentöz (M16, M97, M125) 1 tek hücreli (M3)	(24, 4, 4) (6)
Porsuk	(019)	5 filamentöz (M29, M41, M90, M114, M126)	(20, 4, 4, 4, 9)
Seydisuyu	(136)	7 filamentöz (M6, M7, M10, M22, M32, M36, M109) 2 tek hücreli (M2, M18)	(9, 22, 5, 7, 7, 7, 5) (6, 6)
Seydisuyu	(137)	8 filamentöz (M9, M12, M23, M24, M28, M108, M116, M129) 2 tek hücreli (M4, M111)	(15, 7, 7, 9, 7, 4, 15, (20) (6, 6)
Seydisuyu	(008)	4 filamentöz (M17, M35, M37, M123) 2 tek hücreli (M13, M14)	(5, 11, 3, 11) (6, 6)
Seydisuyu	(156)	2 filamentöz (M8, M38) 2 tek hücreli (M117, M127)	(7, 7) (6, 6)
Bor havuzu		14 filamentöz (B15, B39, B40, B42, B43, B44, B45, B46, B47, B48, B49, B50, B51, B52)	(7, 7, 7, 7, 7, 7, 7, 7, 7, 7, 7, 7, 7, 7)

3.4. Siyanobakteriyel Kommünite Analizleri

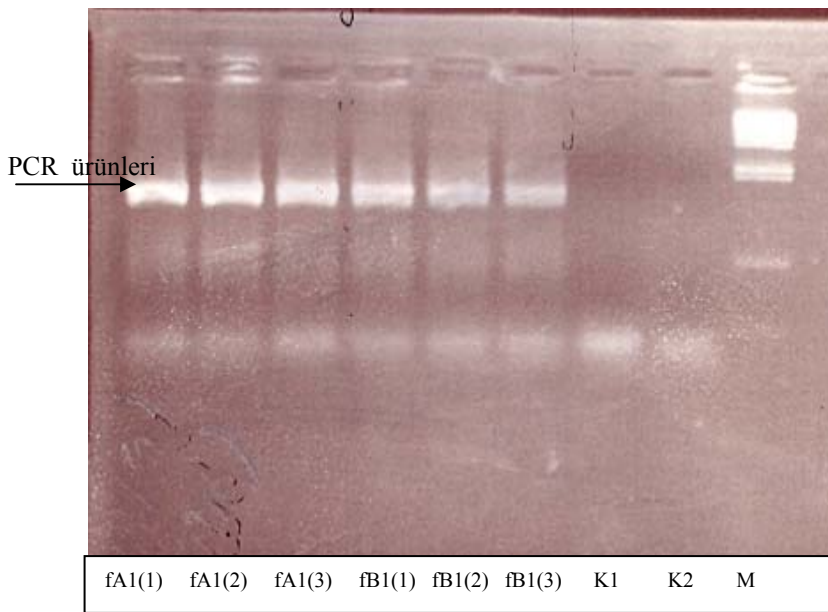
3.4.1. Su Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu

Su örneklerinden DNA ekstraksiyonu, Ekim 2006'da toplanan örneklerden 2.2.5.1'de belirtildiği şekilde yapılmıştır. Çizelge 2.2.'de gösterildiği şekilde, 4 farklı bölgeden alınan su örneklerinin her biri 2 farklı filtreden geçirilmiş ve böylece, 4 farklı bölgeye ait olan toplam 8 adet filtreden DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. DNA ekstraksiyonundan sonra, saflaştırma Wizard DNA Clean-Up System (Promega) kiti kullanılarak daha önce belirtilen şekilde yapılmıştır.

3.4.2. Klon Kütüphanesi Oluşturulması (Ribozomal DNA'nın Klonlanması, Klonların Seçimi ve Klonlardan Dizi Analizleri)

fA1 ve fB1 olarak isimlendirilen filtrelerden elde edilen DNA örnekleri ribozomal DNA'nın klonlanması için kullanılmıştır. Bu amaçla, öncelikle her bir filtreden elde edilen DNA örneklerinden, 16S rRNA + ITS + 5' 23S rRNA'nın amplifikasyonu daha önce belirtildiği şekilde 3 x 50µl'lik bir reaksiyon

karışımında gerçekleştirilmiştir. CYA 359F (5'-ggggaattttccgcaatggg-3') ve 23S30R (5'-cttcgcctctgtgtgcctaggt-3') primer setleri kullanılmıştır. fA1 ve fB1 filtrelerinden, 50µl'lik 3 ayrı PCR reaksiyonu hazırlanmıştır. Sonuç olarak, filtrelere ait toplam 6 PCR reaksiyonu, 1 adet su örneği geçirilmeden DNA izolasyonu için kullanılmış olan filtre örneğine ait PCR reaksiyonu ve bir de DNA içermeyen negatif kontrol, %1,5'luk agaroz jele yüklenmiş ve 110V'da yürütülmüştür. fA1 ve fB1 filtrelerinden elde edilen PCR ürünleri Şekil 3.5'de gösterilmiştir.

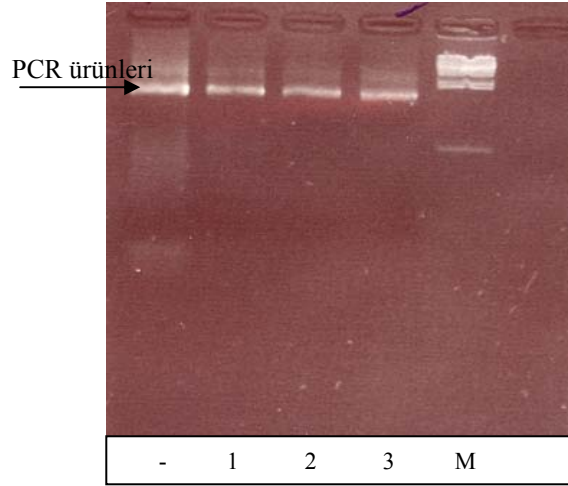


Şekil 3.5. fA1 ve fB1 filtrelere ait olan PCR ürünleri (~2000-2500 bp) (**K1:** - DNA kontrolü, **K2:** - PCR kontrolü, **M:** Lambda DNA/HindIII markır).

Şekilde 3.5'de de görüldüğü gibi elde edilen PCR ürünlerinin büyüklüğü markır ile karşılaştırıldığında yaklaşık olarak 2000 baz büyüklüğündeki fragmente karşılık gelmektedir.

PCR ürünleri doğrulandıktan sonra, her bir filtre örneğine ait olan 3 PCR reaksiyonu karışımı birleştirilmiş ve daha önce belirtildiği şekilde Quantum Prep® PCR Kleen Spin Columns (Bio-Rad) ile ard arda üç kez saflaştırma işlemi, PCR ürününün klonlama için uygun olup olmadığının anlaşılması için yapılmıştır.

Her bir basamakta saflaştırılan PCR ürünleri %1,5'luk agaroz jele yüklenmiş ve en uygun PCR ürününe karar verilmiştir. fB1 örneği ile elde edilen saflaştırılmış PCR reaksiyonlarının elektroforez sonucu Şekil 3.6'da gösterilmiştir.



Şekil 3.6. fB1 örneğinden klonlama için elde edilen PCR ürünlerinin ardışık saflaştırmaları (~2000-2500 bp) (-: saflaştırma yapılmamış olan PCR ürünü, **1**: birinci saflaştırılmış PCR ürünü, **2**: ikinci saflaştırılmış PCR ürünü, **3**: üçüncü saflaştırılmış PCR ürünü, **M**: Lambda DNA/HindIII markır).

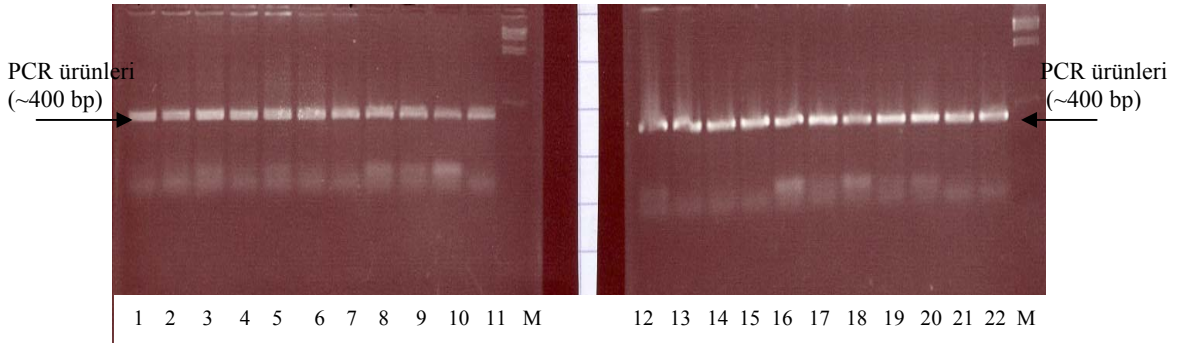
Şekil 3.6.'da görülen saflaştırma basamaklarından üçüncüsü en temiz arka zemine sahip olduğundan ve de birinci ve ikinci saflaştırılmış olan PCR ürünlerine göre aynı parlaklıkta olduğundan dolayı klonlama için seçilmiştir.

PCR Ürününün 3' Ucuna Tek Deoxyadenosine (A)'nın eklenmesi, ligasyon reaksiyonu, komponent *E.coli* hücrelerine transformasyon, elde edilen transformantların saflaştırılması ve insert DNA'nın taranması basamakları 2.2.5.1'de belirtildiği şekilde yapılmıştır. LB petrilerinde fA1 ve fB1 örneklerinden elde edilen 16S rRNA geni için yapılmış olan PCR 'dan gelen gen ürünlerini taşıyan beyaz ve mavi kolonilerin sayısı Çizelge 3.5'de belirtildiği şekildedir.

Çizelge 3.5. fA1 ve fB1 örneklerinden elde edilen beyaz ve mavi kolonilerin sayısı

petri	Elde edilen kolonilerin sayısı		
	beyaz	mavi	Toplam sayı
fA1 (50µl)	202	33	235
fB1 (50µl)	216	42	258

Şekil 3.7.'de fA1'den elde edilen insert büyüklüklerinin tespiti için yapılan PCR'lar sonrasında elde edilen jel fotoğraflarından bazıları gösterilmiştir. Elde edilen ürünün büyüklüğü yaklaşık olarak 400 bp olması gerekmektedir. Bu büyüklüğün kontrolü kullanılan Lambda DNA/HindIII markır ile kontrol edilmiştir.



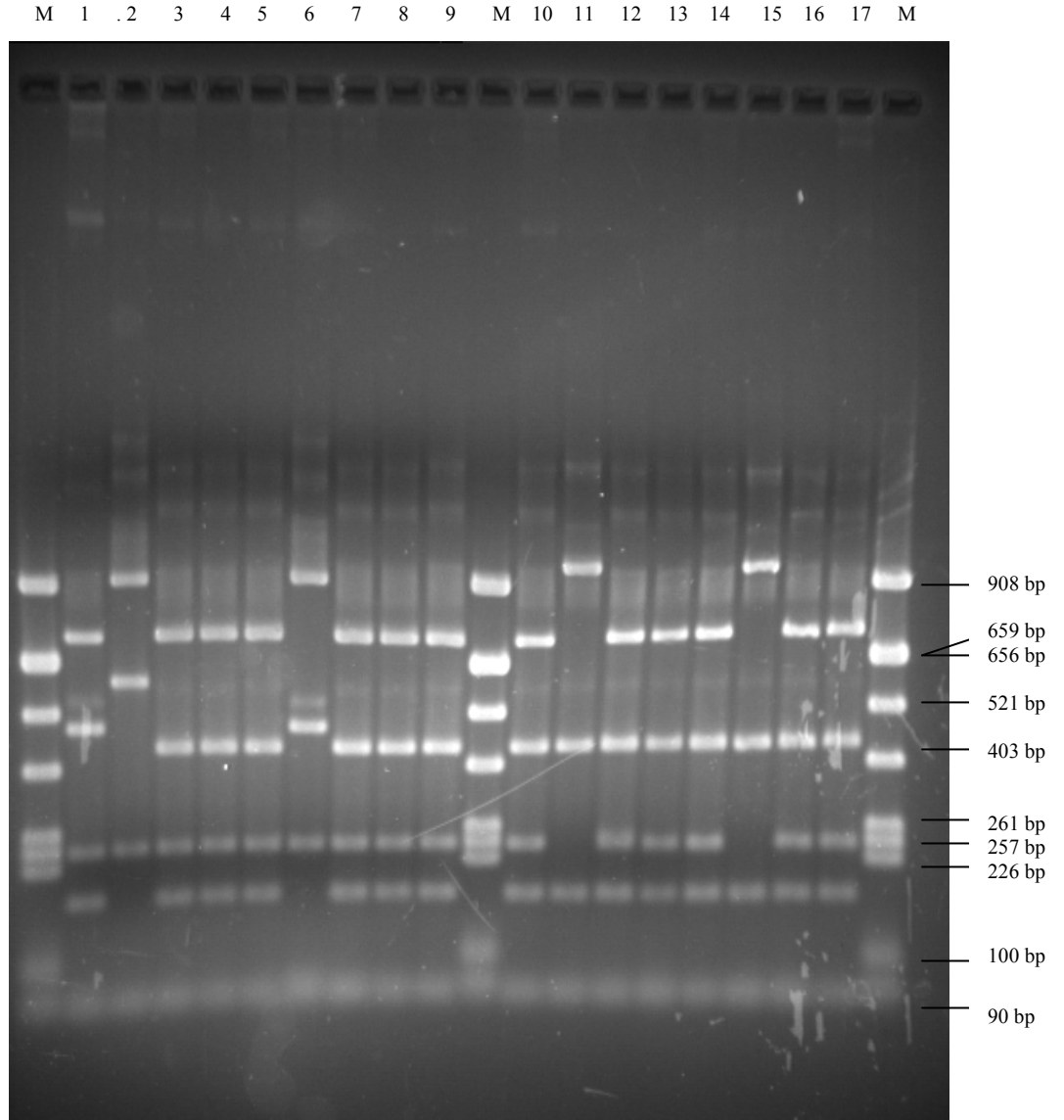
Şekil 3.7. fA1'den elde edilen klonların seçimi için insert büyüklüklerinin kontrolü amacıyla yapılan PCR sonrası elde edilen jeller (numaralar klon numaralarını belirtmektedir, M: lambda DNA/HindIII markır).

Şekildeki fotoğraftan da görüldüğü gibi beyaz renkli kolonilerden yapılan PCR reaksiyonu ile insert büyüklüklerinin doğruluğu kontrol edilmiş ve klonların tümünün doğru büyüklükteki inserti içerip içermediği belirlenmiştir. Bu nedenle istenilen büyüklükteki inserti içeren klonların tespit edilmesi amacıyla kolonilerden PCR işlemine devam edilmiştir. fA1 ve fB1 örneklerinin her birinden toplam 50 adet beyaz koloni seçilmiş ve bu kolonilerden PCR işlemi

yapılmıştır. fA1 örneğinden 49 adet doğru inserti içeren klon, fB1 örneğinden ise 48 adet doğru inserti içeren klon elde edilmiştir.

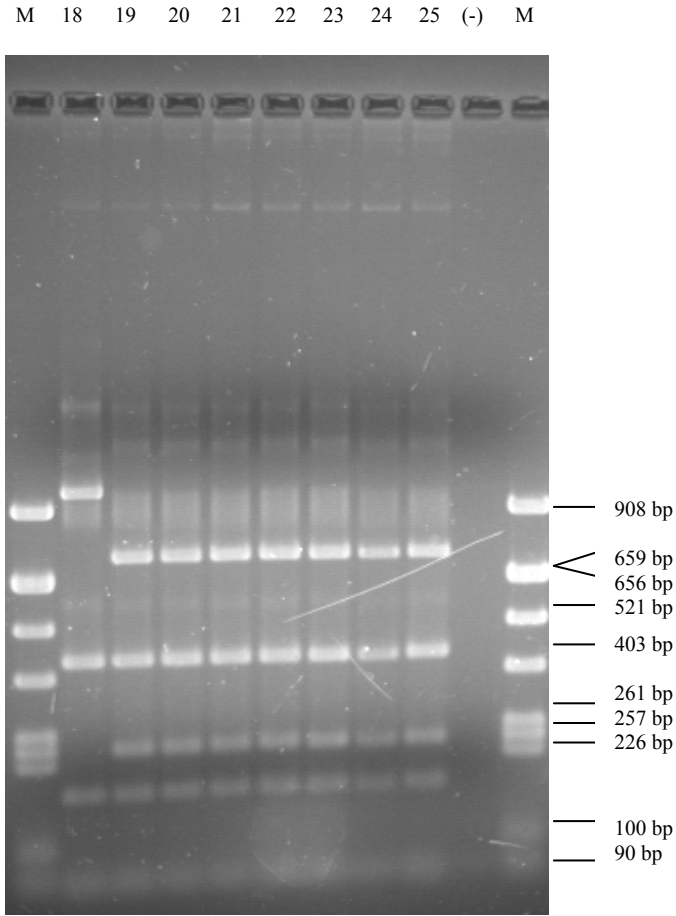
İnsert içeren klonlar tespit edildikten sonra, gliserol stoku içerisinde -20°C’de saklanmıştır. İnsert içeren *E.coli* hücreleri 3 ml sıvı LB besiyerinde 37°C’de 12 saat süre ile inkübe edilmiştir. 3 ml’lik aktiveleştirilmiş olan kültür plazmit DNA izolasyonu için kullanılmıştır. Plazmit DNA izolasyonu, daha önce anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Bu basamaktan sonra elde edilen klonların Amplified Ribosomal DNA Restriction Analizi (ARDRA) yapılmıştır. Kalıp olarak plazmit DNA kullanılmıştır. PCR reaksiyonu, daha önce, izolatlerden elde edilen 16S rRNA + ITS + 5’ 23S rRNA’nın Amplified Ribosomal DNA Restriction Analizi (ARDRA)’nde belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiştir. Aşağıdaki şekillerde, elde edilen klonların restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra elde edilen agaroz jel elektroforezlerinden bazıları Şekil 3.8’de gösterilmiştir.

Şekilde 3.8.a)’da görüldüğü gibi jele 17 örnek ve 3 adet markır yüklenmiştir. Restriksiyon grupları, oluşan fragment sayısı ve bu fragmentlerin markıra göre pozisyonları karşılaştırılarak oluşturulmuştur. Örneğin 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 16, ve 17 no’lu örneklerin fragment sayıları ve bu fragmentlerin markıra göre pozisyonlarına bakıldığında aynı grupta toplandıkları görülmüştür. Aynı şekilde 11 ve 15 no’lu örnekler de aynı grup altında toplanmıştır.



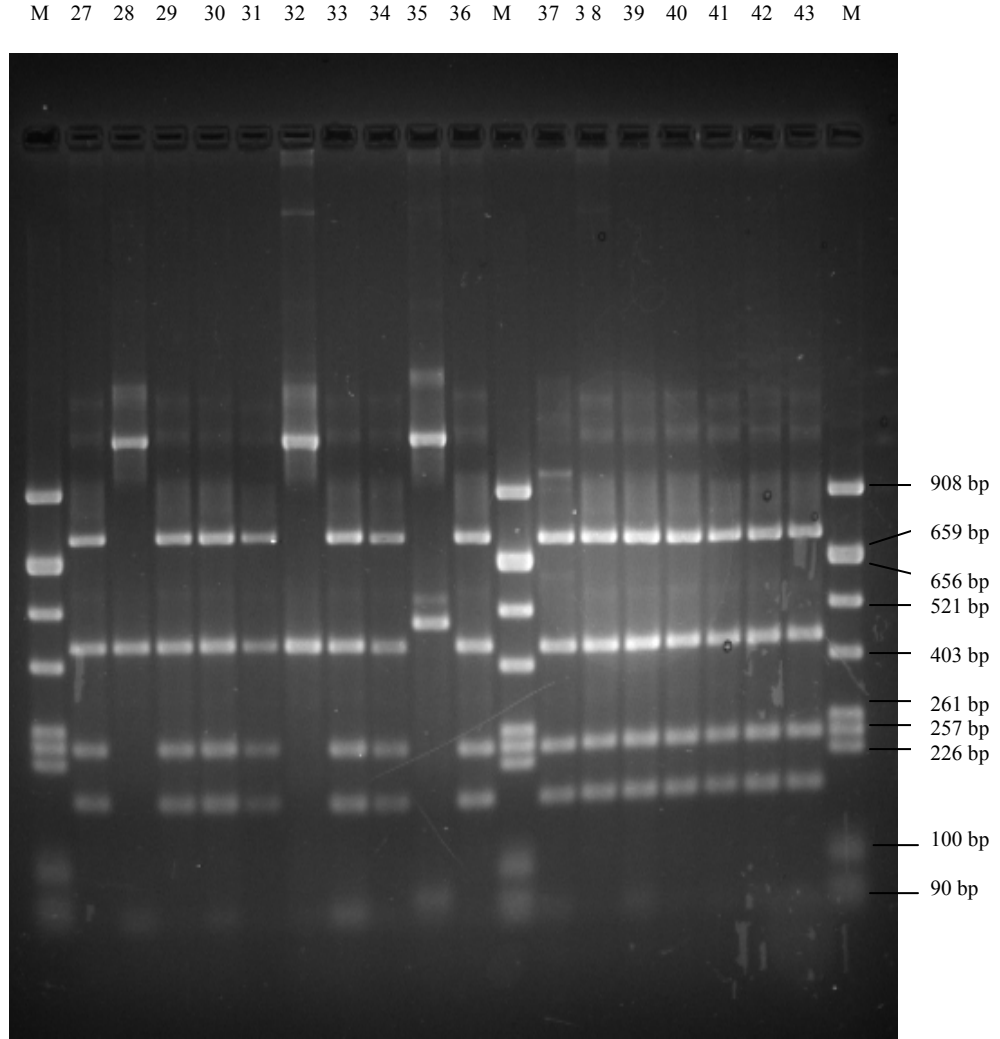
Şekil 3.8.a. fA1 klonlarının (1-17) *MboI* enzimi ile kesimi

Şekilde 3.8.b) de jele 8 örnek ve 2 markır yüklenmiştir. Elde edilen fragment profilleri markır ile karşılaştırıldığında 19, 20, 21, 22, 23, 24, ve 25 no'lu örneklerin aynı grupta toplandıkları görülmektedir. Elde edilen diğer jellerdeki gruplamalar bu prensip doğrultusunda yapılmıştır.

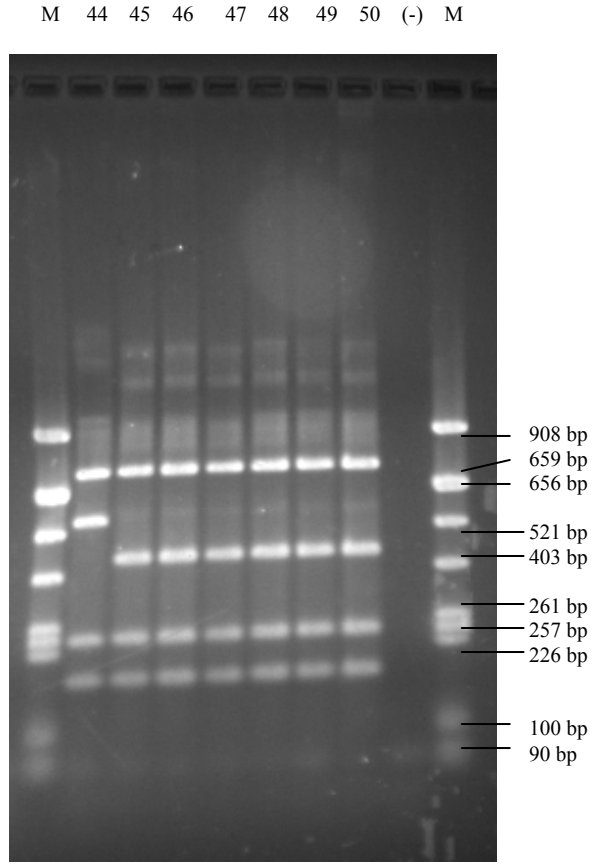


Şekil 3.8.b. fA1 klonlarının (18-26) *MboI* enzimi ile kesimi

Şekil 3.8.c) ve d) de görüldüğü gibi her iki jele toplam 24 örnek yüklenmiştir. Bu örneklerin gruplandırılmaları yine oluşan bantların markıra göre pozisyonları analiz edilerek yapılmıştır. Örnek olarak 29, 30, 31, 33, 34, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 no'lu örnekler aynı grup altında toplanmıştır.

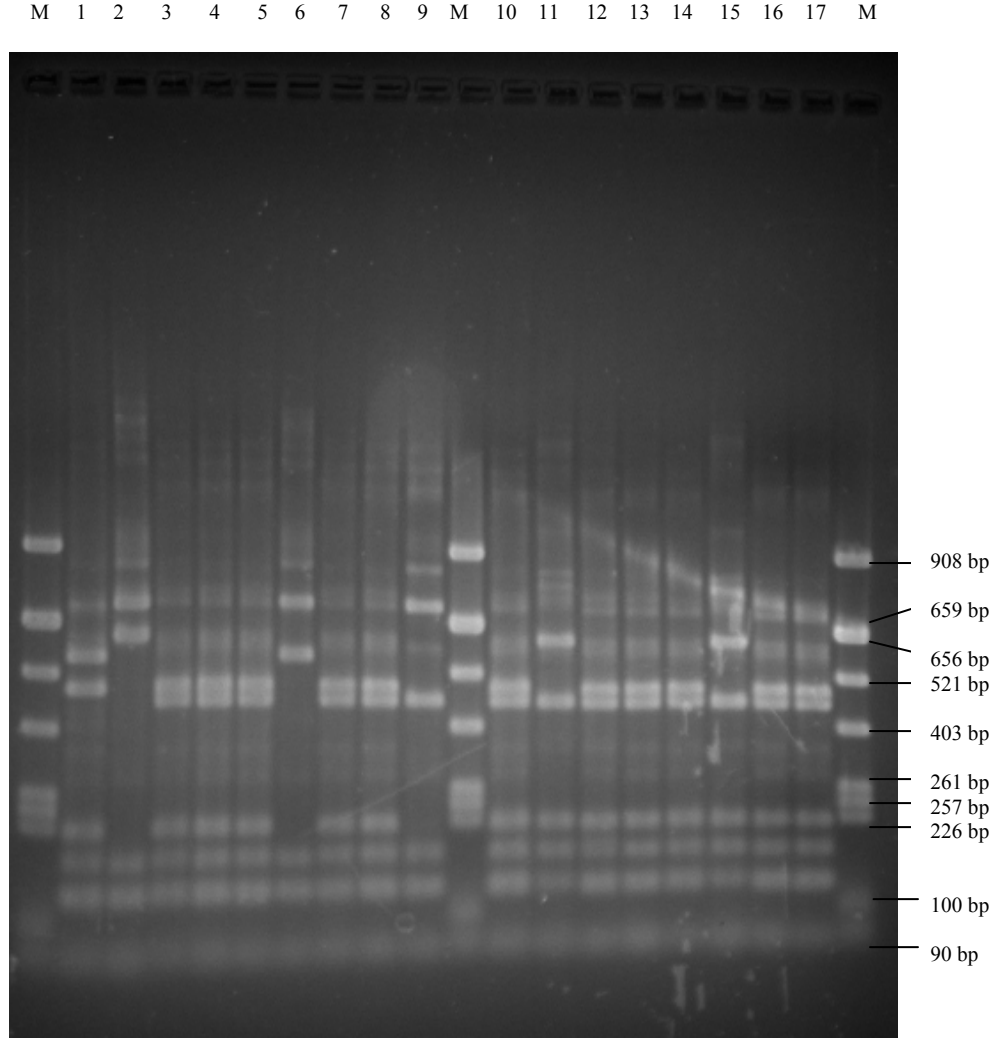


Şekil 3.8.c. fA1 klonlarının (27-43) *Mbo*I enzimi ile kesimi



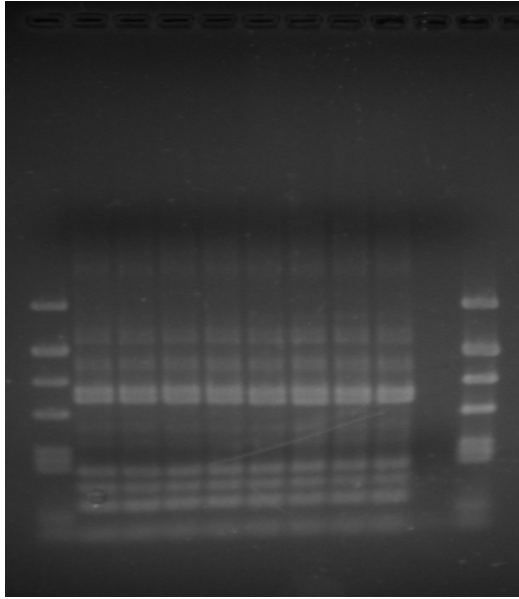
Şekil 3.8.d. fA1 klonlarının (44-50) *MboI* enzimi ile kesimi

Şekil 3.8.e)'de jele 17 örnek ve 3 markır yüklenmiştir. Burada da, örnek olarak, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 16, ve 17 no lu örneklerin aynı grup altında toplandıkları görülmektedir.



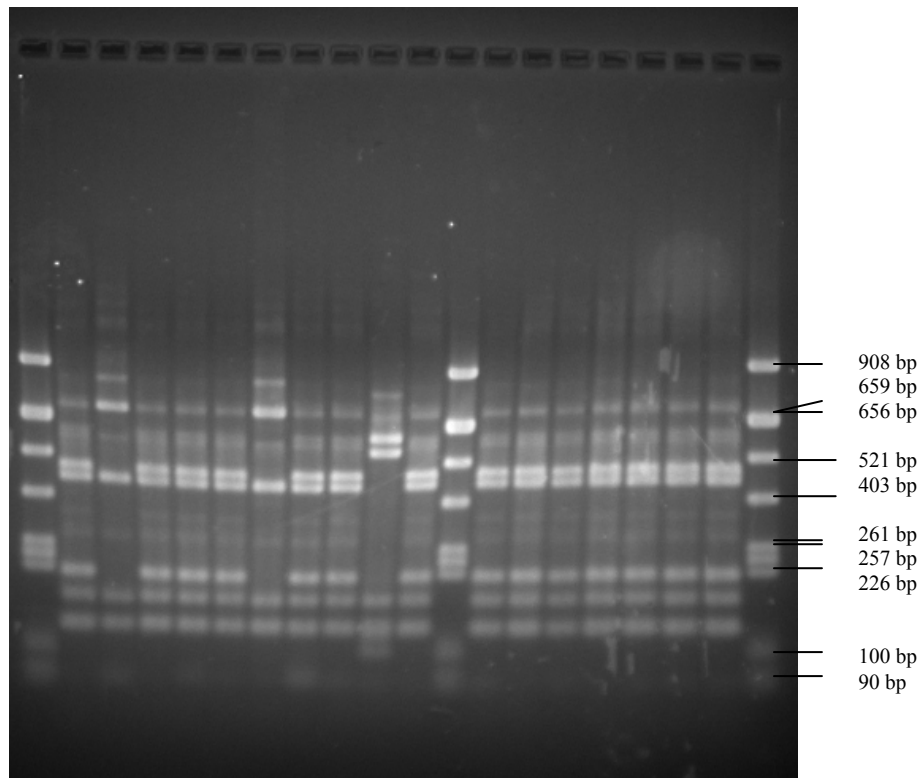
Şekil 3.8.e. fA1 klonlarının (1-17) *MspI* enzimi ile kesimi

M 18 19 20 21 22 23 24 26 (-) M

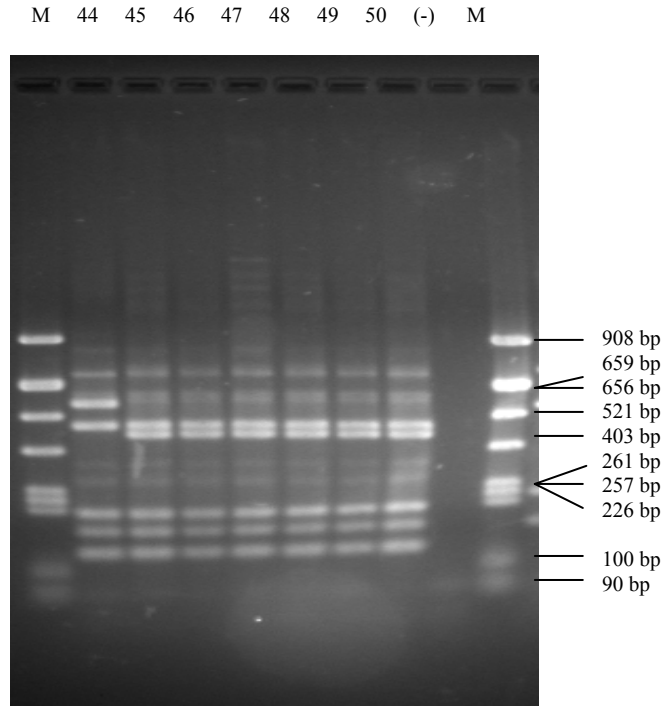


Şekil 3.8.f. fA1 *MspI* (18-26)

M 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 M 37 38 39 40 41 42 43 M



Şekil 3.8.g. fA1 *MspI* (27-43)



Şekil 3.8.h. fA1 *MspI* (44-50)

Şekil 3.8. fA1'den elde edilen klonların Amplified Ribosomal DNA Restriction Analizi (ARDRA) PCR ürünleri **a), b), c), d)**: *MboI* ile **e), f), g), h)**: PCR ürünleri *MspI* ile kesilmiştir. Elektroforez %2'lik agaroz jel hazırlanarak tae tamponu içerisinde 90v'da 180 dk süre ile gerçekleştirilmiştir. moleküler markır (M)-PBR322/*AluI* (Fermentas). 1-50: klon 1-klon 50 olarak numaralandırılmış klon numaralarını belirtmektedir.

Şekil 3.8.'de klonların, farklı restriksiyon profilleri analiz edilmiştir. Yapılan ARDRA profil analizinden sonra fA1 filtresi ile 11, fB1 filtresi ile 5 farklı profil grubu elde edilmiştir. fA1 ve fB1 filtrelerinden elde edilen profiller 2 ortak grup oluşturmuşlardır. Bu 2 ortak grup dışında, her bir filtre ile farklı profil grupları elde edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.6'da özetlenmiştir.

Çizelge 3.6 fA1 ve fB1 filtrelerinden elde edilen klonların ARDRA grup profil numaraları

Grup no	Klon No	
Grup 1	fA1	3, 4, 5, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26
	fB1	44, 47, 20, 23, 31, 9, 13, 16, 17
Grup 2	fA1	27, 29, 30, 31, 33, 34, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50
Grup 3	fB1	35, 39, 41, 42, 46, 19, 21, 22, 25, 26, 27, 29, 33, 34, 1, 2, 3, 5, 8, 10, 11, 12, 15
Grup 4	fB1	36, 37, 38, 40, 43, 45, 18, 28, 30, 32, 6, 7, 14, 4
Grup 5	fA1	2
Grup 6	fA1	6
Grup 7	fA1	9
Grup 8	fA1	11, 15
Grup 9	fA1	28, 32
Grup 10	fA1	35
Grup 11	fA1	44
Grup 12	fA1	1
	fB1	48
Grup 13	fB1	24
Grup 14	fA1	18

Çizelge 3.6.'dan da görüldüğü gibi, fA1 filtresi ile, fB1 filtresine göre daha fazla sayıda profil grubu elde edilmiştir. Diğer bir deyişle, fA1 filtresi ile daha fazla sayıda çeşitlilik elde edilmiştir. Ancak çizelgeden de görüldüğü gibi, fA1 filtresi ile elde edilen gruplardan sadece Grup 1 ve Grup 3 çok sayıda üye içermektedir. Diğer gruplar bir yada iki üye içermektedir. fB1 filtresi ile 5 farklı profil grubu elde edilmiş ve bu gruplardan Grup 1, Grup 3 ve Grup 4 çok sayıda üye içermekte, Grup 12 ve Grup 13'ün ise tek üye içerdikleri görülmektedir. Grup 1 ve Grup 12, fA1 ve fB1 filtrelerinden elde edilen ortak profil gruplarını göstermektedir. Elde edilen bu 14 farklı profil grubundan temsili örnekler seçilmiş

ve bu örneklerden DNA dizi analizi yapılmıştır. fA1 ve fB1 filtrelerinden elde edilen temsili olarak seçilmiş olan klonların BLAST sonuçları Çizelge 3.7.'de gösterilmiştir.

fA1_klon 2, fA1_klon 6, fA1_klon 35, fB1_klon 15, fB1_klon 18, fB1_klon 22, fB1_klon 36'ya ait olan BLAST sonuçları %97'nin üzerindedir. Çizelge 3.7.de de görüldüğü üzere bor havuzunda *Leptolynbya*, *Merismopedia* ve *Nostoc* cinslerine ait olan klonlar elde edilmiştir.

Çizelge 3.7. fA1 ve fB1 filtrelerinden elde edilen temsili olarak seçilmiş olan klonların BLAST sonuçları (%97 nin altındaki benzerlik oranları koyu olarak renklendirilmiştir)

Örnek bölgesi	Örnekleme tarihi	İsim	ARDRA Grup No	Tip	Amplifikasyon primeri	Sekans primeri	Sonuç	Genbank numarası	Benzerlik	Uzunluk
Bor havuzu (whatman filter, fA1)	Ekim 2006	fA1_cl 1	12	klon	359F/B23S	1092	Halomicronema sp. SCano39	DQ058860.1	% 89	677
Bor havuzu (whatman filter, fA1)	Ekim 2006	fA1_cl 1	12	klon	359F/B23S	23S30R	Synechocystis sp. PCC 6803 DNA, complete genome	BA000022.2	% 92	629
Bor havuzu (whatman filter, fA1)	Ekim 2006	fA1_cl 2	5	klon	359F/B23S	1092	Leptolyngbya sp.CNP1-Z1-C2 16S ribosomal RNA gene	AY239601	% 99	498
Bor havuzu (whatman filter, fA1)	Ekim 2006	fA1_cl 4	1	klon	359F/B23S	1092	Halomicronema sp. SCano39	DQ058860.1	% 89	567
Bor havuzu (whatman filter, fA1)	Ekim 2006	fA1_cl 6	6	klon	359F/B23S	1092	Leptolyngbya antarctica ANT. ACEV6.1	AY493589.1	% 99	487
Bor havuzu (whatman filter, fA1)	Ekim 2006	fA1_cl 8	1	klon	359F/B23S	1092	Halomicronema sp. SCano39	DQ058860.1	% 89	531
Bor havuzu (whatman filter, fA1)	Ekim 2006	fA1_cl 9	7	klon	359F/B23S	1092	Halomicronema sp. SCano39	DQ058860.1	% 89	680
Bor havuzu (whatman filter, fA1)	Ekim 2006	fA1_cl 10	1	klon	359F/B23S	1092	Halomicronema sp. SCano39	DQ058860.1	% 89	572
Bor havuzu (whatman filter, fA1)	Ekim 2006	fA1_cl 11	8	klon	359F/B23S	1092	Kültive edilmemiş Siyanobakteri klon TRK	AY874091.1	% 89	655
Bor havuzu (whatman filter, fA1)	Ekim 2006	fA1_cl 12	1	klon	359F/B23S	1092	Halomicronema sp. SCano39	DQ058860.1	% 90	534
Bor havuzu (whatman filter, fA1)	Ekim 2006	fA1_cl 14	1	klon	359F/B23S	1092	Halomicronema sp. SCano39	DQ058860.1	% 89	557
Bor havuzu (whatman filter, fA1)	Ekim 2006	fA1_cl 18	14	klon	359F/B23S	1092	Kültive edilmemiş Siyanobakteri klon TRK 07	AY874091.1	% 90	552
Bor havuzu (whatman filter, fA1)	Ekim 2006	fA1_cl 20	1	klon	359F/B23S	1092	Halomicronema sp. SCano39	DQ058860.1	% 89	512
Bor havuzu (whatman filter, fA1)	Ekim 2006	fA1_cl 27	2	klon	359F/B23S	1092	Halomicronema sp. SCano39	DQ058860.1	% 89	663
Bor havuzu (whatman filter, fA1)	Ekim 2006	fA1_cl 28	9	klon	359F/B23S	1092	Phormidium sp. AA partial 16S rRNA gene	AM398777.1	% 91	680

Bor havuzu (whatman filter, fA1)	Ekim 2006	fA1_cl35	10	klon	359F/B23S	1092	Merismopedia. glauca izolat B1448-1	X94705.1	% 98	793
Bor havuzu (Supor , Pall Life Science, fB1)	Ekim 2006	fB1_cl 15	3	klon	359F/B23S	1092	Nostoc sp. ANT. LH52B.1	AY493594.1	% 99	671
Bor havuzu (Supor , Pall Life Science, fB1)	Ekim 2006	fB1_cl 17	1	klon	359F/B23S	1092	Halomicronema sp. SCano39	DQ058860.1	% 89	610
Bor havuzu (Supor , Pall Life Science, fB1)	Ekim 2006	fB1_cl 18	4	klon	359F/B23S	1092	Nostoc sp. ANT. LH52B.1	AY493594.1	% 99	776
Bor havuzu (Supor , Pall Life Science, fB1)	Ekim 2006	fB1_cl 20	1	klon	359F/B23S	1092	Halomicronema sp. SCano39	DQ058860.1	% 89	729
Bor havuzu (Supor , Pall Life Science, fB1)	Ekim 2006	fB1_cl 22	3	klon	359F/B23S	1092	Nostoc sp. ANT. LH52B.1	AY493594.1	% 99	672
Bor havuzu (Supor , Pall Life Science, fB1)	Ekim 2006	fB1_cl 24	13	klon	359F/B23S	1092	Halomicronema sp. SCano39	DQ058860.1	% 89	608
Bor havuzu (Supor , Pall Life Science, fB1)	Ekim 2006	fB1_cl 36	4	klon	359F/B23S	1092	Nostoc sp. ANT. LH52B.1	AY493594.1	% 99	692

Çizelgede de görüldüğü gibi bazı klonların benzerlik oranı %97'den düşüktür. Bu sonuçların doğrulanması için sekans sonuçları iki parçaya bölünerek analiz edilmiştir. Aşağıdaki Çizelgede benzerlik oranı %97'den düşük olan klonların iki kısım halindeki sekans sonuçları gösterilmiştir.

Çizelge 3.8. Düşük benzerlik yüzdesine sahip olan klonların iki kısım halindeki BLAST sonuçları

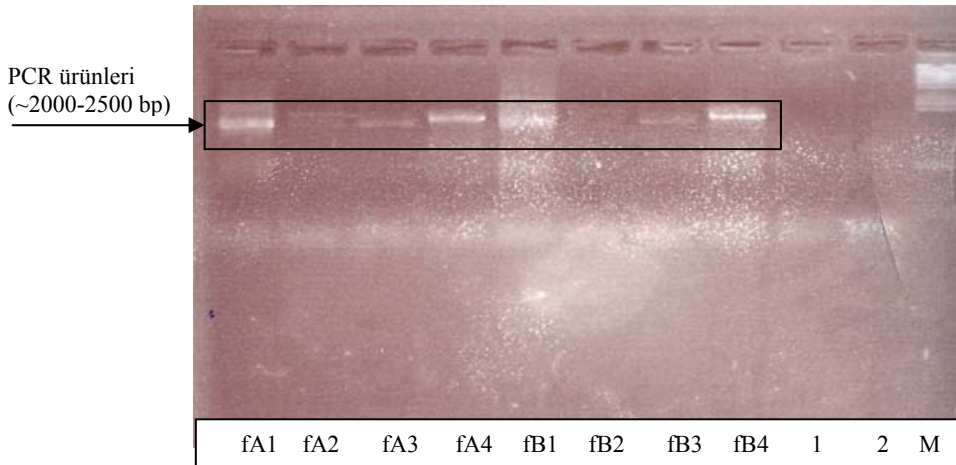
Örnekleme tarihi	İsim	ARDRA Grup no	Tip	Amplifikasyon primeri	Sekans primeri	Sonuç	Benzerlik	Gen bank numarası	Uzunluk
Ekim 2006	fA1_cl4	1	klon	359F/B23S	1092	Halomicronema sp. Goniastrea-1	% 94	AB257773.1	267
Ekim 2006	fA1_cl4	1	klon	359F/B23S	1092	Leptolyngbya sp.0BB30S02	% 89	AJ639892.1	300
Ekim 2006	fA1_cl8	1	klon	359F/B23S	1092	Kültive edilmemiş bakteri klon BU3ba3	% 90	DQ074681.1	240
Ekim 2006	fA1_cl8	1	klon	359F/B23S	1092	Halomicronema sp. Goniastrea-1	% 93	AB257773.1	291
Ekim 2006	fA1_cl10	1	klon	359F/B23S	1092	Leptolyngbya sp.0BB30S02	% 89	AJ639892.1	300
Ekim 2006	fA1_cl10	1	klon	359F/B23S	1092	Halomicronema sp. Goniastrea-1	% 93	AB257773.1	272
Ekim 2006	fA1_cl12	1	klon	359F/B23S	1092	Leptolyngbya sp.0BB30S02	% 90	AJ639892.1	300
Ekim 2006	fA1_cl12	1	klon	359F/B23S	1092	Halomicronema sp. Goniastrea-1	% 94	AB25773.1	234
Ekim 2006	fA1_cl14	1	klon	359F/B23S	1092	Leptolyngbya sp.0BB30S02	% 89	AJ639892.1	300
Ekim 2006	fA1_cl14	1	klon	359F/B23S	1092	Halomicronema sp. Goniastrea-1	% 95	AB25773.1	257
Ekim 2006	fA1_cl20	1	klon	359F/B23S	1092	Leptolyngbya sp.0BB30S02	% 89	AJ639892.1	300
Ekim 2006	fA1_cl20	1	klon	359F/B23S	1092	Halomicronema sp. Goniastrea-1	% 94	AB25773.1	212
Ekim 2006	fA1_cl 1	12	klon	359F/B23S	1092	Kültive edilmemiş eubakteri gene for 16SrRNA DGGE band NAB23	% 90	AB075801.1	360
Ekim 2006	fA1_cl 1	12	klon	359F/B23S	1092	Halomicronema sp. Goniastrea-1	% 93	AB25773.1	317
Ekim 2006	fA1_cl 9	7	klon	359F/B23S	1092	Kültive edilmemiş eubakteri gene for 16SrRNA DGGE band NAB23	% 90	AB075801.1	360
Ekim 2006	fA1_cl 9	7	klon	359F/B23S	1092	Halomicronema sp. Goniastrea-1	% 93	AB25773.1	320
Ekim 2006	fA1_cl 27	2	klon	359F/B23S	1092	Halomicronema sp. Goniastrea-1	% 93	AB25773.1	303
Ekim 2006	fA1_cl 27	2	klon	359F/B23S	1092	Kültive edilmemiş bakteri klon BSb13	% 90	DQ836850.1	360
Ekim 2006	fA1_cl 28	9	klon	359F/B23S	1092	Synechocystis sp. PCC 6803 DNA	% 93	BA000022.2	360
Ekim 2006	fA1_cl 28	9	klon	359F/B23S	1092	Leptolyngbya schmidlei klon 145-A3	% 93	AF355398.1	320
Ekim 2006	fB1_cl 24	13	klon	359F/B23S	1092	Leptolyngbya sp.	% 94	DQ264224.1	300
Ekim 2006	fB1_cl 24	13	klon	359F/B23S	1092	Leptolyngbya schmidlei klon 145-A3, Halomicronema sp. Goniastrea-1	% 93	AF355398.1	308

Çizelge 3.7. ve Çizelge 3.8.'deki sonuçlardan da görüldüğü gibi, BLAST benzerlik oranı %97 den düşük olan klonların dizi analizi sonuçları, iki kısım halinde tekrar BLAST'lanmış ve elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir. İki kısım halinde elde edilen BLAST sonuçlarına bakıldığında, elde edilen benzerlik oranlarının hala %97'den düşük olduğu görülmüştür.

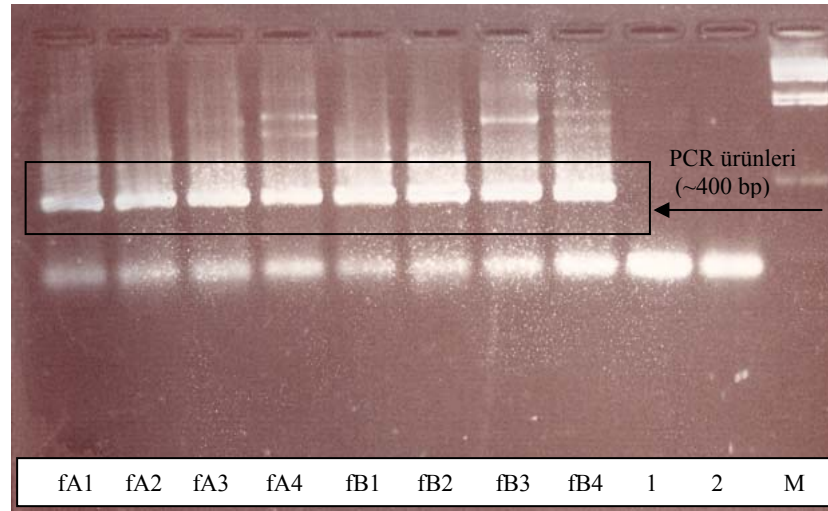
3.4.3. Denature Edici Gradient Jel Elektroforezi (DGGE)

DGGE analizi için semi-nested PCR kullanılmıştır. 16S rRNA fragmentleri ilk olarak CYA359F (5'-ggggaattttccgcaatggg-3') ve 23S30R (5'-cttcgcctctgtgtgcctaggt-3') primerleri ile amplifiye edilmiştir. İkinci PCR reaksiyonu CYA359F ve reverse primerin 5' uçları üzerinde GC etiketli CYA781R(a) ve/yada (b), (5'-cgcccgccgcgccccgcgcccgtcccgccgcccccgcc-3') primerler ile gerçekleştirilmiştir. Uygulanan tüm PCR reaksiyonları Çizelge 2.4.'de gösterilmiştir.

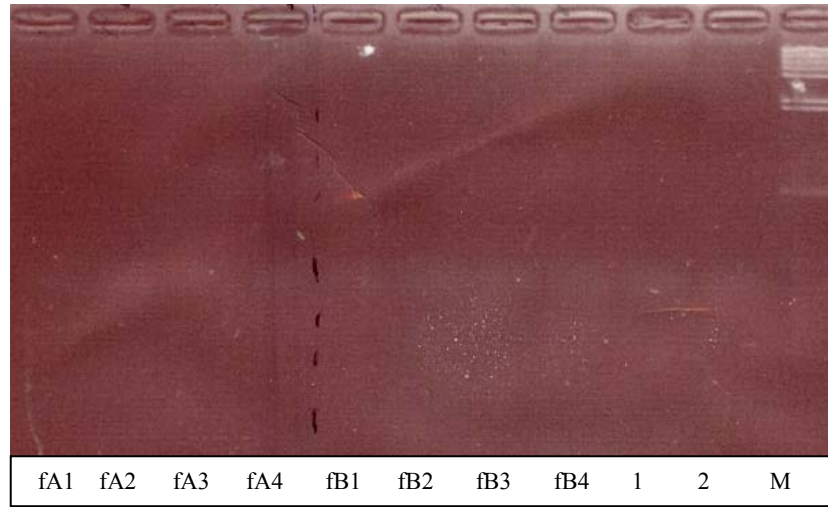
Elde edilen PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüleri Şekil 3.9.a.b.c.d'de gösterilmiştir.



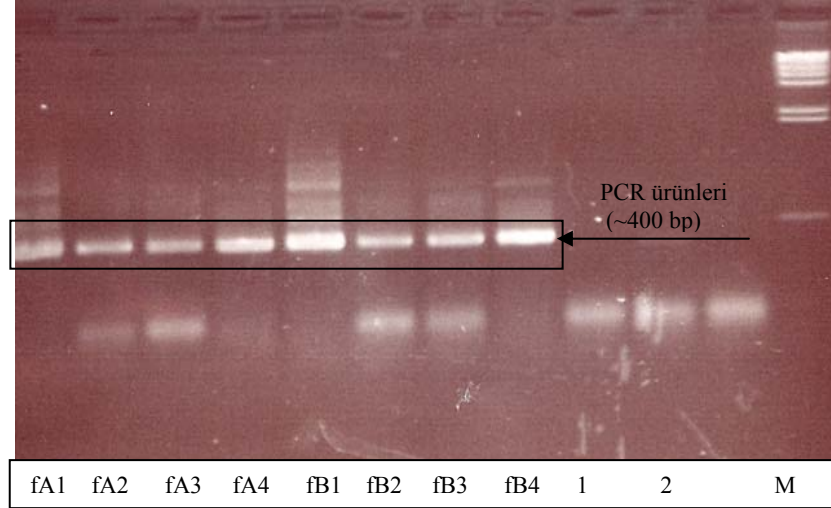
Şekil 3.9.a. DGGE (a1): 378 F_23S30R primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü (1: negatif ekstraksiyon kontrolü, 2: negatif PCR kontrolü, M: lambda DNA/HindIII markır)



Şekil 3.9.b. DGGE (a2): 378 F_781RGC (a2) primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü (**1**: negatif ekstraksiyon kontrolü, **2**: negatif PCR kontrolü, **M**: lambda DNA/HindIII markır)

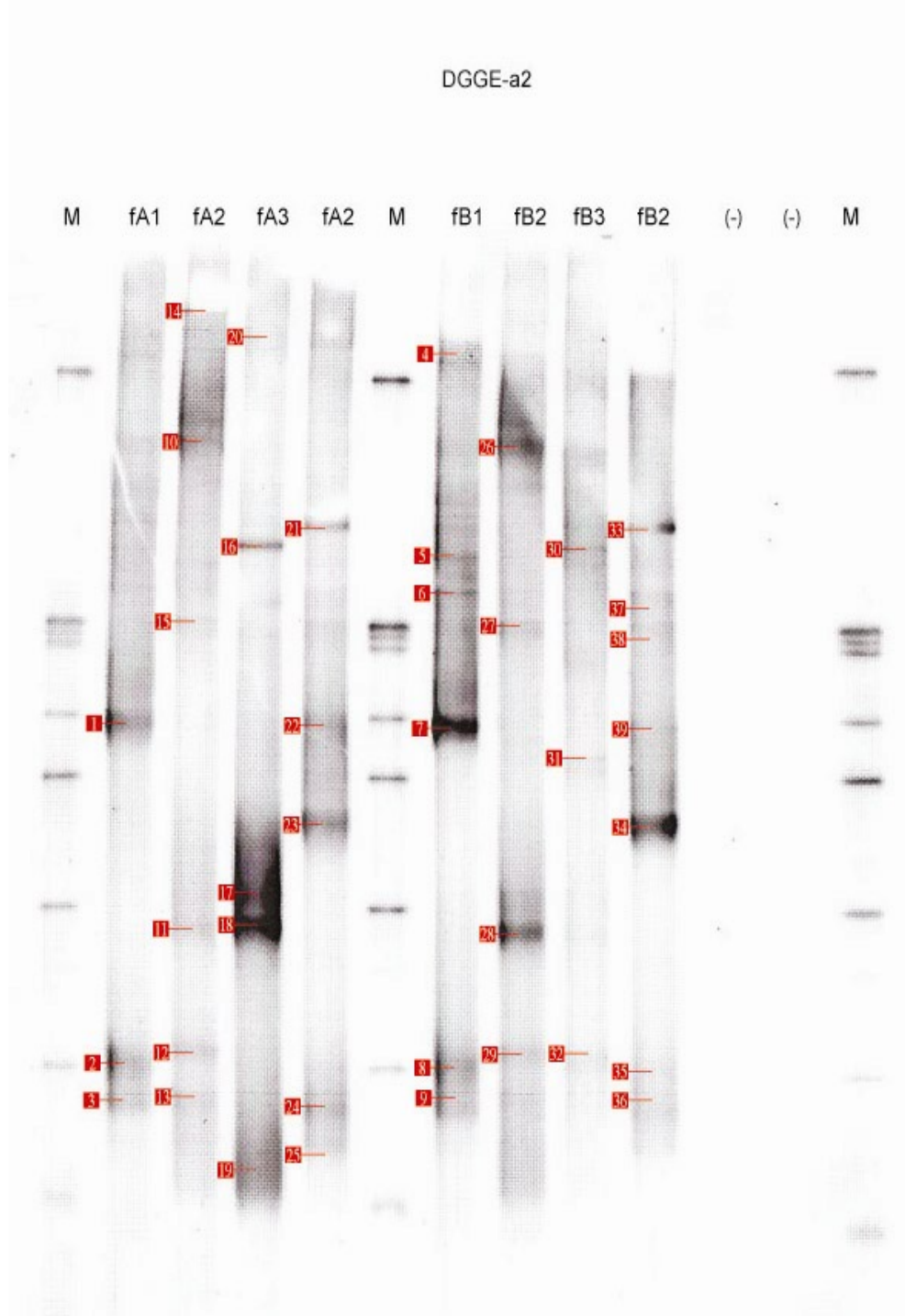


Şekil 3.9.c. DGGE (b1): 378 F_23S30R primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü (**1**: negatif ekstraksiyon kontrolü, **2**: negatif PCR kontrolü, **M**: lambda DNA/HindIII markır)

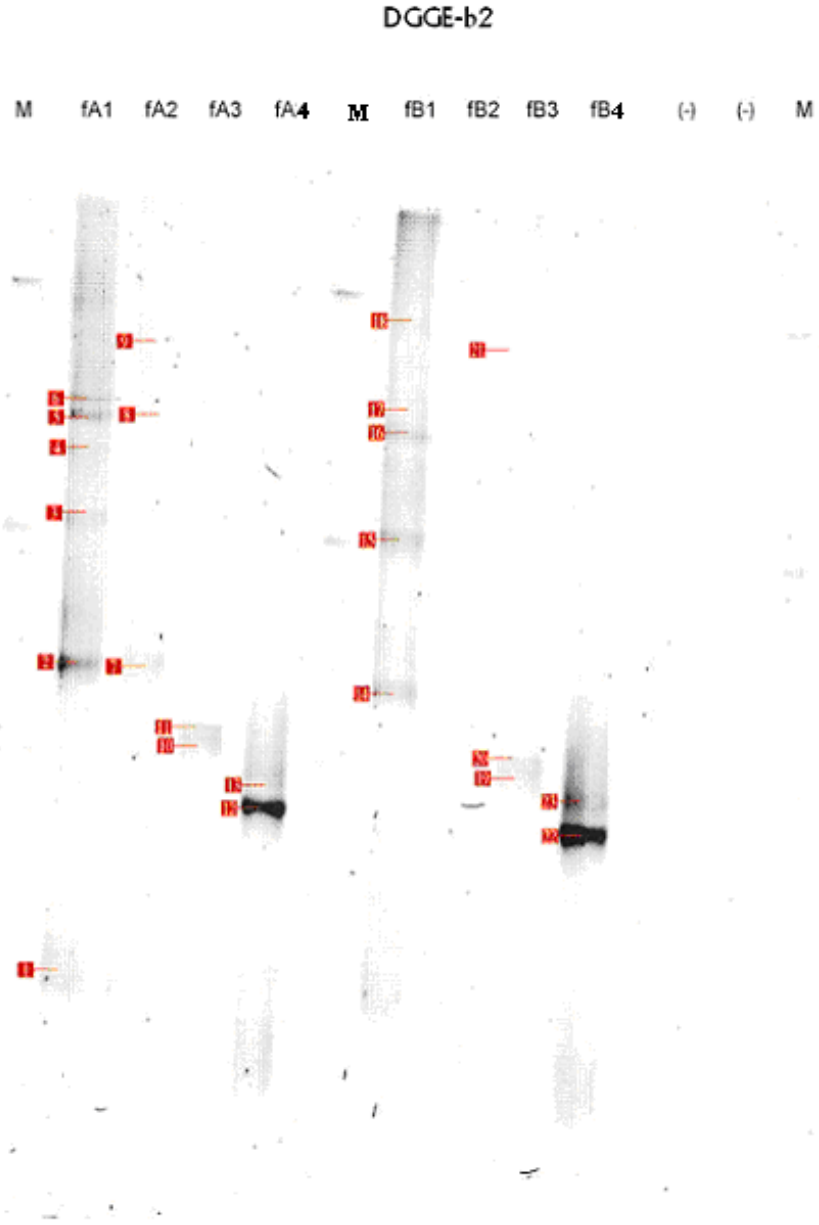


Şekil 3.9.d. DGGE (b2): 378 F_781RGC primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü (**1:** negatif ekstraksiyon kontrolü, **2:** negatif PCR kontrolü, **M:** lambda DNA/HindIII markır)

Şekil 3.9.'daki fotoğraflardan da görüldüğü gibi a2 ve b2 reaksiyonlarında hemen hemen tek bant elde edilmiştir. Elde edilen bu bantların doğruluğu belirlendikten sonra, bu PCR ürünleri daha önce belirtildiği şekilde hazırlanan DGGE jeline yüklenmiş ve elektroforez sistemi 16 saat süre için 75V a ayarlanmıştır. Elektroforez bittikten sonra jel GelStar® nucleic acid stain (BioWhittaker Molecular Applications) ile boyanmış ve elde edilen görüntü FluorImager (BioRad) GelDoc-IT Imaging System kullanılarak TIFF formatında kaydedilmiştir.

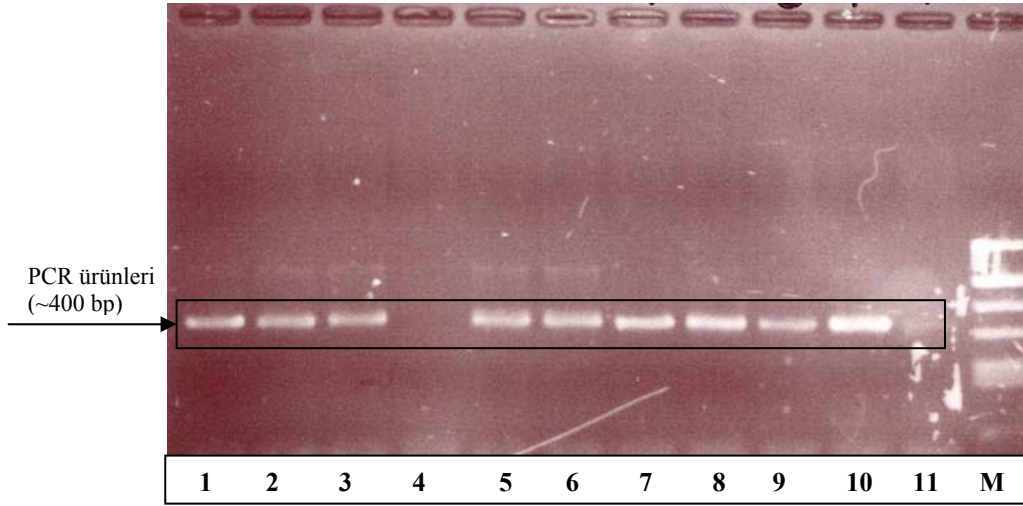


Şekil 3.10.a. DGGE a2 reaksiyonu ile elde edilen jel görüntüsü



Şekil 3.10.b. DGGE b2 reaksiyonu ile elde edilen jel görüntüsü

Şekil 3.10.a ve b’de işaretlenen bantlar jelden kesilmiş ve kesilen bantlar 359F ve 784R primerleri kullanılarak yeniden amplifiye edilmiştir. Toplam 8 adet filtreden yapılan DGGE (a2) jelinden 39, DGGE (b2) jelinden ise 23 bant kesilmiş ve amplifiye edilmiştir. Bu amplifikasyonlara ait elektroforez görüntülerinden bazıları aşağıda örneklenmiştir.



Şekil 3.11. DGGE jelinden kesilen bantların yeniden amplifikasyonu ile elde edilen agaroz jel görüntüsü (Numaralar DGGE jelindeki bant numaralarına karşılık gelmektedir. **M:** pBR322 DNA/Alu I Markır (Fermentas))

Şekilde 3.11.’de de görüldüğü gibi 4 numaralı banda ait amplifikasyon reaksiyonu negatif sonuç, diğer bantlar ise pozitif sonuç vermiştir. DGGE (a2) jelinden elde edilen 39 banda ait amplifikasyon reaksiyonlarından 21 tanesi, DGGE (b2) jelinden elde edilen 23 banda ait amplifikasyon reaksiyonlarından 15 tanesi pozitif amplifikasyon sonucu vermiştir. Elde edilen pozitif PCR ürünleri DNA dizi analizine gönderilmiştir. Elde edilen pozitif dizi analiz sonuçları Çizelge 3.9.’da gösterilmiştir.

Çizelge 3.9. DGGE bantlarına ait olan BLAST sonuçları

Örnek	Örnekleme tarihi	İsim	Amplifikasyon primeri	Sekans primeri	Sonuç	Benzerlik	Gen bank numarası	Uzunluk
Bor havuzu (whatman filter, fA1)	Ekim 2006	DGGE a1	359F/781R	781R	Kültive edilmemiş Siyanobakteri partial 16S rRNA gene, klon P3.4 Oscillatoria sp. Ant-SOS 16S rRNA gene	%90 %89	UCY248298 AF263342.1	323
Bor havuzu (whatman filter, fA1)	Ekim 2006	DGGE a2	359F/781R	781R	Nostoc sp. KVJF8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%97	EU022740.1	320
Bor havuzu (whatman filter, fA1)	Ekim 2006	DGGE a3	359F/781R	781R	Kültive edilmemiş Siyanobakteri klon H-D14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Phormidium pristleyi ANT.LH52.6 16S rRNA gene	%97 %96	DQ181732.1 AY493579.1	303
Bor havuzu (Supor, Pall Life Science, fB1)	Ekim 2006	DGGE a7	359F/781R	781R	Kültive edilmemiş Siyanobakteri partial 16S rRNA gene, klon P3.4 Oscillatoria sp. Ant-SOS 16S rRNA gene	%91 %90	UCY248298 AF263342.1	325
Bor havuzu (Supor, Pall Life Science, fB1)	Ekim 2006	DGGE a8	359F/781R	781R	Nostoc sp. KVJF8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%97	EU022740.1	322
Bor havuzu (Supor, Pall Life Science, fB1)	Ekim 2006	DGGE a9	359F/781R	781R	Kültive edilmemiş Siyanobakteri klon H-D14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Phormidium pristleyi ANT.LH52.6 16S rRNA gene	%97 %96	DQ181732.1 AY493579.1	300
Seydisuyu (whatman filter, fA2)	Ekim 2006	DGGE a10	359F/781R	781R	Siyanobakteri sp. IW11 partial 16S rRNA gene	%99	LSP565868	319
Seydisuyu (whatman filter, fA2)	Ekim 2006	DGGE a11	359F/781R	781R	Lyngbya majuscula CCAP 1446/4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%99	AY768394.1	315
Seydisuyu (whatman filter, fA2)	Ekim 2006	DGGE a12	359F/781R	781R	Nostoc sp. KVJF8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%97	EU022740.1	321
Seydisuyu (whatman filter, fA2)	Ekim 2006	DGGE a13	359F/781R	781R	Kültive edilmemiş Siyanobakteri klon H-D14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Phormidium pristleyi ANT.LH52.6 16S rRNA gene	%97 %96	DQ181732.1 AY493579.1	301
PorsukÇayı (whatman filter, fA3)	Ekim 2006	DGGE a16	359F/781R	781R	Arthrospira maxima FACHB438 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	%100	EF564663.1	318

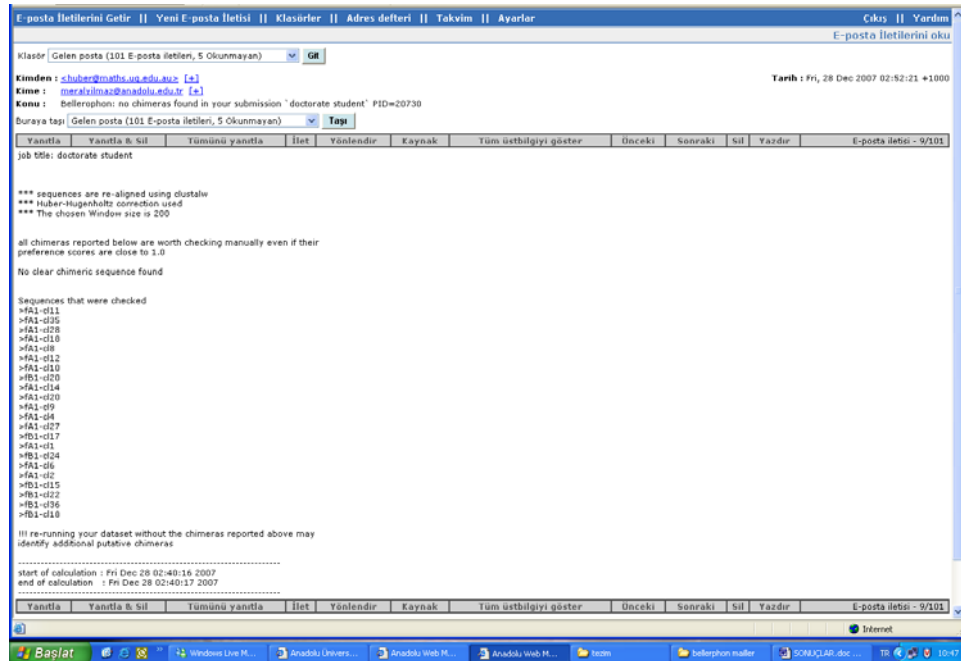
Porsuk Çayı (whatman filter, fA3)	Ekim 2006	DGGE a18	359F/781R	781R	Lyngbya majuscula CCAP 1446/4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%99	AY768394.1	316
Porsuk Çayı (whatman filter, fA3)	Ekim 2006	DGGE a19	359F/781R	781R	Kültive edilmemiş Siyanobakteri klon ZB126 Planktothricoides raciborskii 16S rRNA gene partial sequence	%99 %98	AY327203.1 AB045964.1	315
Bor havuzu (whatman filter, fA4)	Ekim 2006	DGGE a21	359F/781R	781R	Arthrospira fusiformis izolat AICB 670 16S ribosomal RNA gene partial sequence	%97	AY672725.1	306
Bor havuzu (whatman filter, fA4)	Ekim 2006	DGGE a22	359F/781R	781R	Kültive edilmemiş Siyanobakterium partial 16S rRNA gene, klon P3.4 Oscillatoria sp. Ant-SOS 16S rRNA gene	%90 %90	UCY248298 AF263342.1	325
Bor havuzu (whatman filter, fA4)	Ekim 2006	DGGE a24	359F/781R	781R	Kültive edilmemiş Siyanobakteri klon H-D14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Phormidium pristleyi ANT.LH52.6 16S rRNA gene	%97 %97	DQ181732.1 AY493579.1	304
Bor havuzu (whatman filter, fA4)	Ekim 2006	DGGE a25	359F/781R	781R	Kültive edilmemiş Siyanobakteri klon ZB126 Planktothricoides raciborskii 16S rRNA gene partial sequence	%99 %98	AY327203.1 AB045964.1	315
Seydisuyu (Supor, Pall Life Science, fB2)	Ekim 2006	DGGE a26	359F/781R	781R	Siyanobakteri sp. IW11 partial 16S rRNA gene	%99	AJ565868.2	323
Seydisuyu (Supor, Pall Life Science, fB2)	Ekim 2006	DGGE a28	359F/781R	781R	Lyngbya majuscula CCAP 1446/4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	%99	AY768394.1	315
Porsuk Çayı (Supor, Pall Life Science, fB3)	Ekim 2006	DGGE a30	359F/781R	781R	Arthrospira maxima FACHB438 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	%100	EF564663.1	316
Bor havuzu (Supor, Pall Life Science, fB4)	Ekim 2006	DGGE a33	359F/781R	781R	Arthrospira fusiformis izolat AICB 670 16S ribosomal RNA gene partial sequence	%97	AY672725.1	309
Bor havuzu (whatman filter, fA1)	Ekim 2006	DGGE b1	359F/781R	781R	Kültive edilmemiş bakteri klon BSb13 Aphanothece sacrum genes for 16S ribosomal RNA,	%90 %90	DQ836850.1 AB116658.2	327
Bor havuzu (whatman filter, fA1)	Ekim 2006	DGGE b2	359F/781R	781R	Leptolyngbya sp. 0BB30S02 partial 16S rRNA gene	%89	AJ639892.1	372
Bor havuzu (whatman filter, fA1)	Ekim 2006	DGGE b3	359F/781R	781R	Kültive edilmemiş bakteri klon BSb13 Aphanothece sacrum genes for 16S ribosomal RNA	%91 %91	DQ836850.1 AB116658.2	359
Bor havuzu (whatman filter, fA1)	Ekim 2006	DGGE b5	359F/781R	781R	Kültive edilmemiş bakteri klon BSb13 Aphanothece sacrum genes for 16S ribosomal RNA	%90 %90	DQ836850.1 AB116658.2	316
Bor havuzu (whatman filter, fA1)	Ekim 2006	DGGE b6	359F/781R	781R	Kültive edilmemiş bakteri klon BSb13 Aphanothece sacrum genes for 16S ribosomal RNA	%90 %90	DQ836850.1 AB116658.2	322
Bor havuzu (whatman filter, fA2)	Ekim 2006	DGGE b7	359F/781R	781R	Kültive edilmemiş Siyanobakteri klon RD017 16S ribosomal complete sequence Leptolyngbya sp.CNP1-B1-4 16S ribosomal RNA	%91 %91	DQ181674.1 AY239603.1	359

Porsuk Çayı (whatman filter, fA3)	Ekim 2006	DGGE b10	359F/781R	781R	Microcystis sp. Itu31s06 partial 16S rRNA gene; Microcystis aeruginosa izolat SPC 777 16S ribosomal RNA gene	%100	AM259270.1 EF121241.1	324
Porsuk Çayı (whatman filter, fA3)	Ekim 2006	DGGE b11	359F/781R	781R	Microcystis sp. Itu31s06 partial 16S rRNA gene; Microcystis aeruginosa izolat SPC 777 16S ribosomal RNA gene	%100	AM259270.1 EF121241.1	324
Bor havuzu (whatman filter, fA4)	Ekim 2006	DGGE b12	359F/781R	781R	Leptolyngbya sp.CNP1-Z1-C2 16S ribosomal RNA gene	%99	AY239601	326
Bor havuzu (whatman filter, fA4)	Ekim 2006	DGGE b13	359F/781R	781R	Leptolyngbya sp.CNP1-Z1-C2 16S ribosomal RNA gene	%99	AY239601	319
Porsuk Çayı (Supor, Pall Life Science, fB3)	Ekim 2006	DGGE b19	359F/781R	781R	Microcystis sp. Itu31s06 partial 16S rRNA gene	%100	AM259270.1	318
Bor havuzu (Supor, Pall Life Science, fB4)	Ekim 2006	DGGE b22	359F/781R	781R	Leptolyngbya sp.CNP1-Z1-C2 16S ribosomal RNA gene	%99	AY239601	319
Bor havuzu (Supor, Pall Life Science, fB4)	Ekim 2006	DGGE b23	359F/781R	781R	Leptolyngbya sp.CNP1-Z1-C2 16S ribosomal RNA gene	%99	AY239601	359

Çizelge 3.9 da da görüldüğü gibi yapılan DGGE analizi ile DGGE a jelinden 21, b jelinden ise 13 pozitif dizi analiz sonucu elde edilmiştir. a jelindeki 1, 7, 22 no'lu bantlar, 2, 8, 12 no'lu bantlar, 3, 9, 13, 24 no'lu bantlar, 10, 26 no'lu bantlar, 11, 18, 28 no'lu bantlar, 16, 30 no'lu bantlar, 19, 25 no'lu bantlar ve 21, 33 no'lu bantların BLAST sonuçlarının aynı gen bankası numarasına sahip olduğu görülmüştür. Aynı şekilde b jelindeki 3, 5, 6 no'lu bantlar, 10, 11, 19 no'lu bantlar ve 12, 13, 22, 23 no'lu bantların BLAST sonuçları da aynı gen bankası numarasına karşılık gelmiştir.

3.4.4. “Chimera” Analiz Sonuçları

Chimeric DNA analizi, daha önce de belirtildiği gibi Ribosomal DataBase Project II ve Bellerophon web sitesinde var olan Chimera Check ile olası “chimer” lerin varlığı analiz edilmiştir. Bellerophon analizi, mail ile çalışan bir sistemdir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.12’de gösterilmiştir.



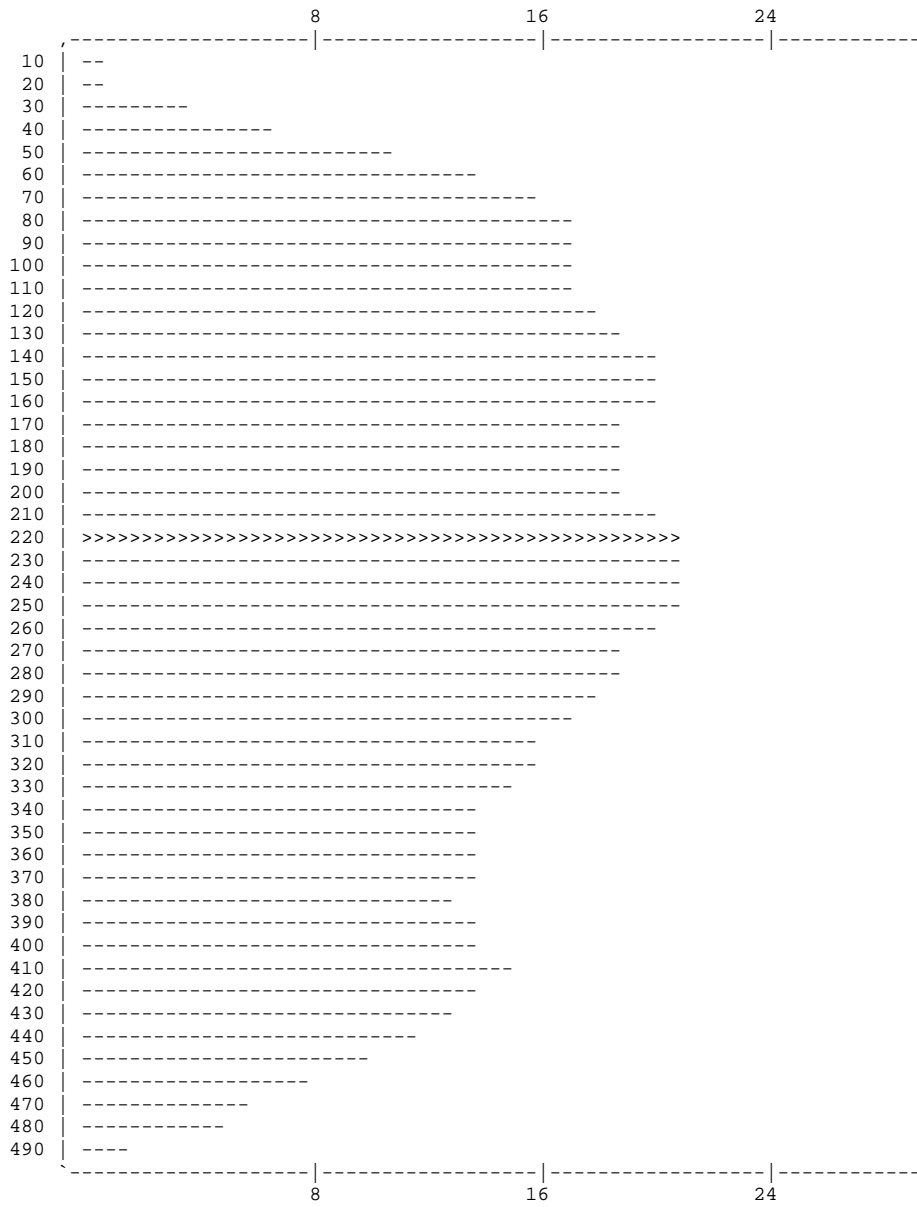
Şekil 3.12. Bellerophon Analiz Sonucu

Bellerophon analizine göre analiz edilen sekanslarda chimeric sekans bulunmadığı anlaşılmıştır. Chimeric sekans olmadığının emin olunması için ayrıca diğer bir analiz programı olan Ribosomal DataBase Project II web sayfasında var olan Pintail programı da kullanılmıştır. Aşağıda elde edilen Pintail analiz sonuçlarına 1 örnek verilmiştir.

CHIMERA_CHECK version 2.7 written by [Niels Larsen](#).

Short-ID	:	fA1 c11 10
Full name	:	fA1 c11 1092r, 510 bases, FEADA2FF checksum.
RDP data	:	Small Subunit rRNAs
Comments	:	A minimum of 100 unique oligos required
	:	A total of 167 sequences were excluded
	:	34381 sequences were included in the search
	:	The screening was based on 7-base oligomers
Date	:	Thu Dec 6 03:28:52 2007
CPU time	:	1.33 seconds

[Caution] This service does not decide if your sequence is chimeric, it merely supports your own decision. To understand the output below and what the program is doing with your data, please consult the [method description](#).



FRAGMENT 1, approximate sequence positions 1 to 220:

Short-ID	S ab	Olis	Full name
fA1_cl1_10	-	216	fA1_cl1_1092r, 510 bases, FEADA2FF checksum.
Cynp.par_C	0.713	1414	Cyanophora paradoxa (colorless flagellate alga) -- cyanelle.
Cynp.pa4_C	0.713	1414	Cyanophora paradoxa (colorless flagellate alga) -- cyanelle.
Cynp.pa3_C	0.713	1414	Cyanophora paradoxa (colorless flagellate alga) -- cyanelle.
AF132793	0.708	1328	"Plectonema boryanum" UTEX 485.
Llb.foveol	0.708	1368	Leptolyngbya foveolarum str. Komarek 1964/112.
AF132771	0.708	1314	Cyanothece ATCC51142 ATCC 51142.
Glcc.nos_C	0.704	1375	Glauocystis nostochinearum str. SAG 45.88 (blue green alga)
U70723	0.690	1405	Unidentified eukaryote OM270 16S ribosomal RNA gene, partial
Gloc.wit_C	0.690	1375	Gloeochaete wittrockiana str. SAG B 46.84 (blue green alga)
Anbn.cyli2	0.690	1422	"Anabaena cylindrica" str. NIES19 PCC 7122.

FRAGMENT 2, approximate sequence positions 221 to 504:

Short-ID	S ab	Olis	Full name
fA1_cl1_10	-	281	fA1_cl1_1092r, 510 bases, FEADA2FF checksum.
AF132792	0.562	1335	Prochlorothrix hollandica.
AJ007866	0.559	1326	klon LD16.
AJ007907	0.555	1329	Prochlorothrix hollandica.
env.OS_J	0.530	1035	Octopus Spring microbial mat DNA from Yellowstone NP klon Type J.
Syn.elonga	0.530	1363	Synechococcus elongatus.
AF132772	0.527	1332	Synechococcus ATCC700243 str. C1 ATCC 700243.
AB003168	0.527	1367	"Oscillatoria neglecta" str. M-82.
Psan.bicep	0.498	1324	Pseudoanabaena biceps PCC 7367.
AF091110	0.498	1344	"Plectonema F3" str. F3.
D88288	0.498	1301	Synechococcus sp. PCC 7942.

FULL LENGTH SEQUENCE, from position 1 to 504:

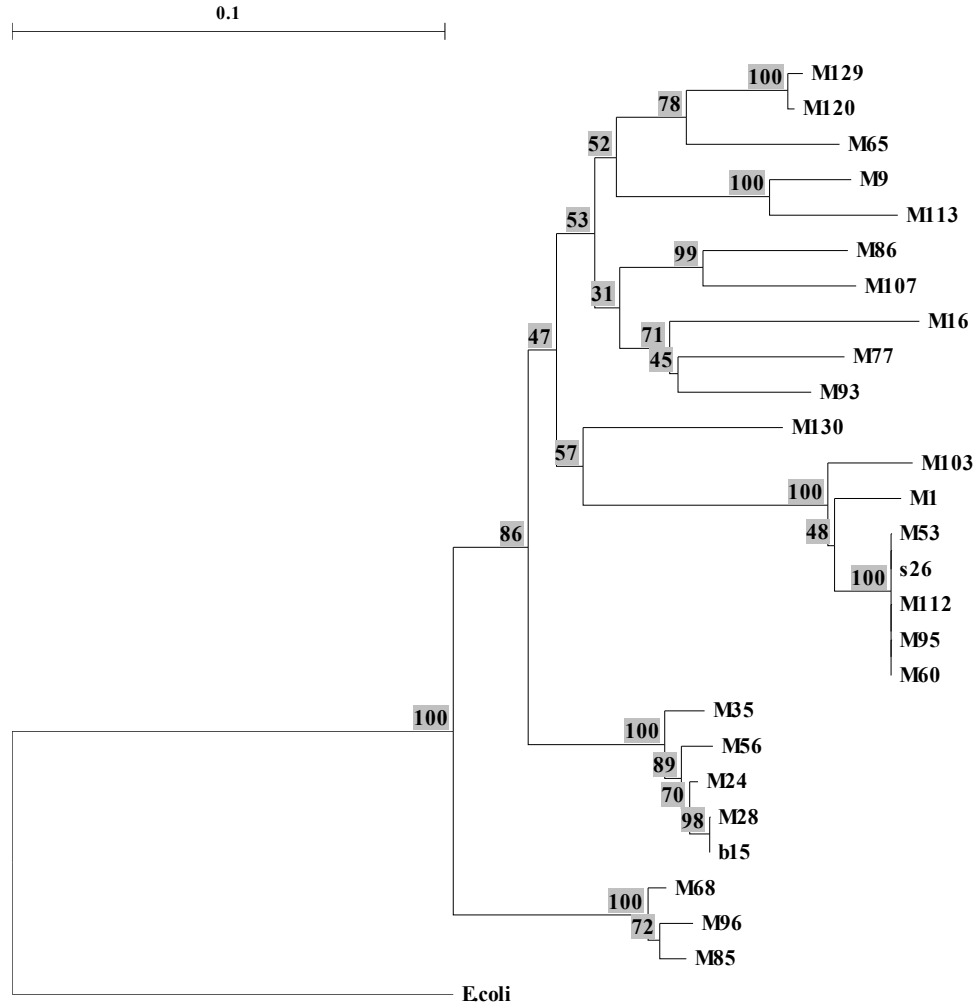
Short-ID	S_ab	Olis	Full name
fA1_cl1_10	-	486	fA1_cl1_1092r, 510 bases, FEADA2FF checksum.
Syn.elonga	0.580	1363	<i>Synechococcus elongatus</i> .
AF132772	0.580	1332	<i>Synechococcus</i> ATCC700243 str. C1 ATCC 700243.
AB003168	0.572	1367	" <i>Oscillatoria neglecta</i> " str. M-82.
AF091110	0.572	1344	" <i>Plectonema F3</i> " str. F3.
env.OS_J	0.570	1035	Octopus Spring microbial mat DNA from Yellowstone NP klon Type J.
AJ007908	0.568	1343	" <i>Oscillatoria limnetica</i> " str. MR1.
AF132771	0.564	1314	<i>Cyanothece</i> ATCC51142 ATCC 51142.
AF132793	0.558	1328	" <i>Plectonema boryanum</i> " UTEX 485.
Llb.foveol	0.558	1368	<i>Leptolyngbya foveolarum</i> str. Komarek 1964/112.
AB003165	0.556	1370	<i>Phormidium mucicola</i> str. M-221.
AF132774	0.556	1295	<i>Synechococcus</i> ATCC700245 str. P1 ATCC 700245.
AF132775	0.556	1295	<i>Synechococcus</i> ATCC700246 str. P2 ATCC 700246.
Llb.borya2	0.551	1239	<i>Leptolyngbya boryanum</i> PCC 73110.
D90916	0.549	1406	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.
Sncy.6803B	0.549	1406	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.
Sncy.6803A	0.549	1406	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.
Sncy.6803	0.549	1406	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.
AB003163	0.545	1348	" <i>Oscillatoria</i> " sp. str. M-117.
AB003167	0.543	1368	<i>Phormidium ambiguum</i> str. M-71.
AF132783	0.541	1333	<i>Xenococcus</i> PCC7305 PCC 7305.

Elde edilen sonuçlara bakıldığında, programın metot tanımında da anlatıldığı gibi, gerçek bir chimerik dizi ile elde edilen grafikte, kırılma noktasına kadar düzgün bir artan eğri ve kırılma noktasından sonra da düzgün bir azalan eğri elde edilmesi gerekmektedir. fA1_cl1 örneği ile elde edilen sonuca bakıldığında, kırılma noktası öncesi ve kırılma noktası sonrasında düzgün bir grafik elde edilmediği görülmektedir. Ayrıca gerçek chimerik bir dizide olması gereken diğer ikinci bir kriter ise, kırılma noktasına kadar elde edilen fragment 1 ve kırılma noktasından sonra elde edilen fragment 2 nin “benzerlik score” değeri birebir aynı (1,0) olması gerekmektedir. fA1_cl1 örneği ile elde edilen sonuca bakıldığında, kırılma noktası olan 220 noktasına kadar fragment 1 ile elde edilen benzerlik skoru en yüksek 0,713, fragment 2 ile elde edilen benzerlik skoru ise 0,562 dir. Elde edilen bu ikinci sonuç sorgulanan dizinin chimerik olmadığını göstermektedir. Gerçek bir chimerik dizide olması gereken üçüncü parametre ise “FULL LENGTH SEQUENCE” ile elde edilen en yüksek benzerlik skorunun, fragment 1 ve fragment 2 ile elde edilen en yüksek benzerlik skorlarından belirgin şekilde düşük olmasıdır. fA1_cl1 örneği ile elde edilen sonuca bakıldığında 0,580 değerinin, fragment 1 ile elde edilen 0,713 ve fragment 2 ile elde edilen 0,562 değerinden belirgin şekilde düşük olmadığı anlaşılmıştır.

Program metot tanımında belirtilen bu kriterler göz önünde tutularak yapılan incelemeler sonucunda, sorgulanan olası chimerik dizilerden hiçbirinin belirtilen tanımlara uymadığı ve chimerik dizi elde edilmediği sonucuna varılmıştır.

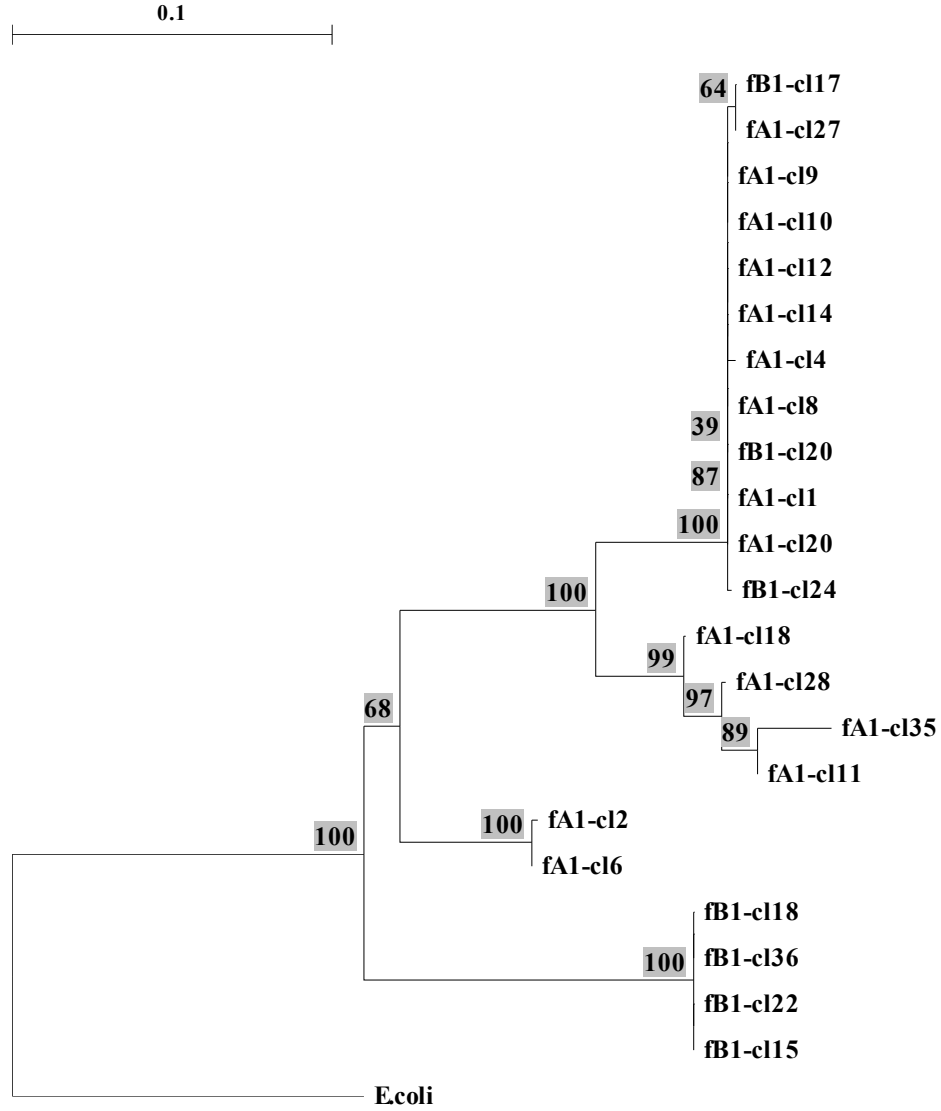
3.4.5. Filogenetik Ağacın Elde Edilmesi

Filogenetik ağaç “TREECON for Windows (version 1.3b)” programı kullanılarak, Neighbour-Joining metoduna göre elde edilmiştir. Oluşan dalların istatistiksel olarak doğruluğu “bootstrap” analizi ile 500 kez örnekleme yapılarak belirlenmiştir. 4 filogenetik ağaç elde edilmiştir. Birincisi elde edilen izolatların (Şekil 3.13.a), ikincisi elde edilen klonların (Şekil 3.13.b), üçüncüsü elde edilen DGGE bantlarının (Şekil 3.13.c) ve dördüncüsü ise, bu üç havuz ve gen bankasından seçilen en yakın ilişkili sekansların tümünün birlikte oluşturduğu filogenetik ağaçtır (Şekil 3.13.d).



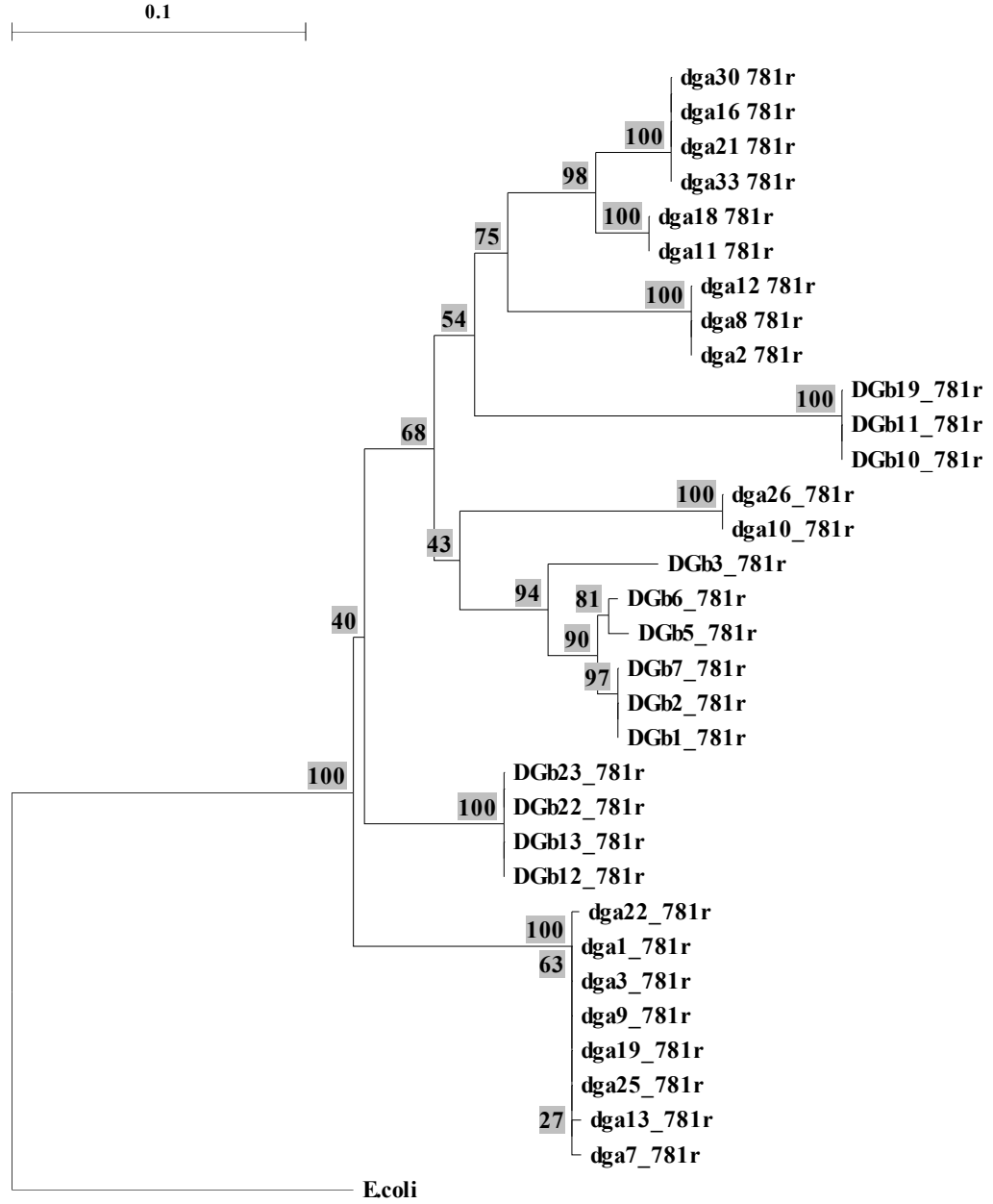
Şekil 3.13.a. Elde edilen izolatların filogenetik ilişkisi

Şekil 3.13.a’da görüldüğü gibi elde edilen izolatların 16S rRNA gen tabanında birbirleri ile olan evrimsel ilişki ele alınmıştır. Ağacın istatistiksel güvenilirliği incelendiğinde “bootstrap” değerlerinin genel olarak %50’nin üzerinde olduğu ve bu nedenle güvenilir bir ağaç topolojisi elde edildiği anlaşılmıştır. M53, S26, M112, M95 ve M60 izolatlarının %100 aynı küme içerisinde toplandığı görülmektedir. BLAST ile elde edilen sonuçlar ağacın topolojisini desteklemektedir.



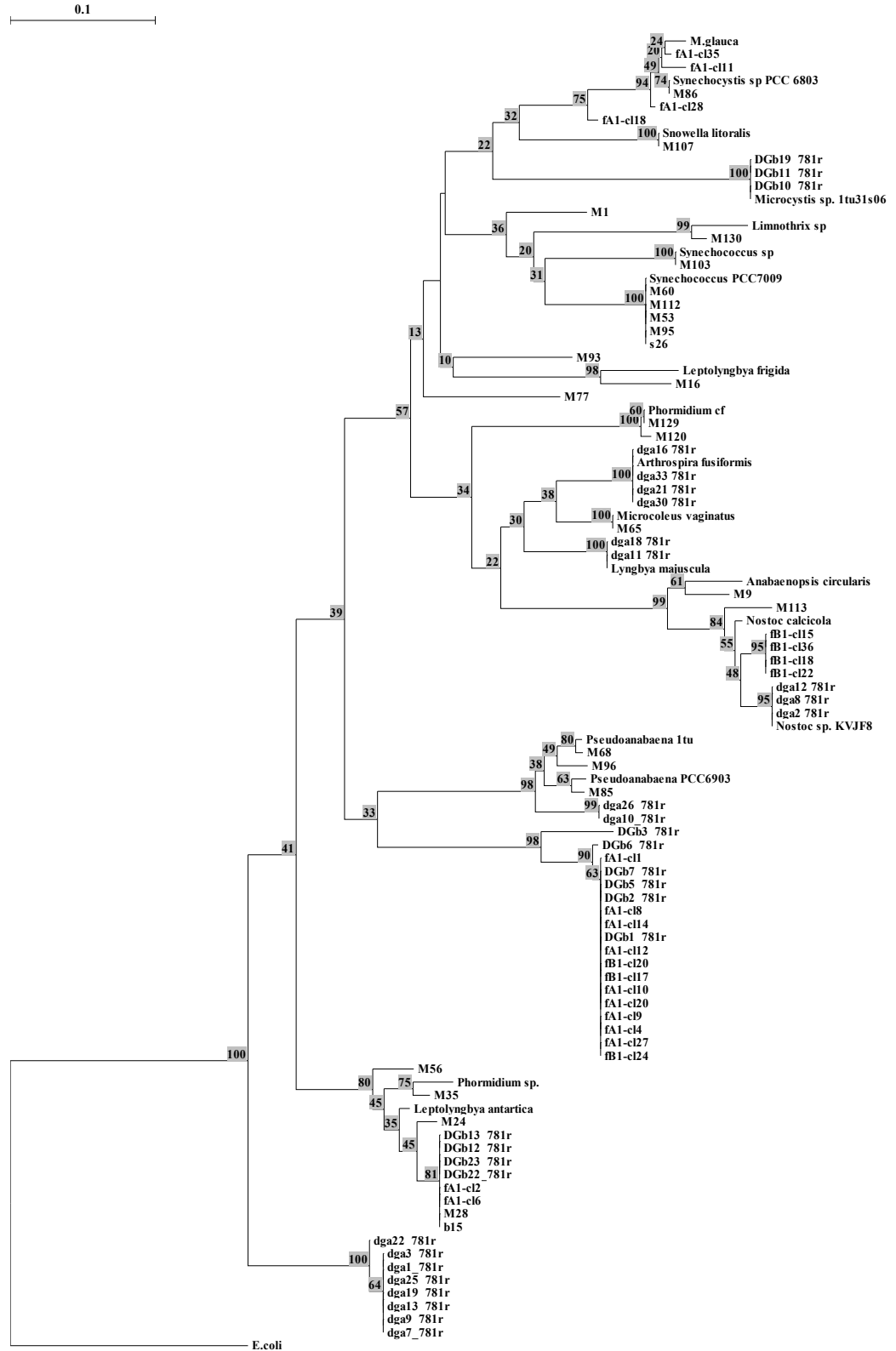
Şekil 3.13.b. Elde edilen klonların filogenetik ilişkisi

Şekil 3.13.b’de bor havuzundan elde edilen klonların 16S rRNA gen tabanında birbirleri ile olan evrimsel ilişki ele alınmıştır. Ağacın istatistiksel güvenilirliği incelendiğinde “bootstrap” değerlerinin genel olarak %60’ın üzerinde olduğu ve bu nedenle güvenilir bir ağaç topolojisi elde edildiği anlaşılmıştır. Ağaç topolojisine bakıldığında genellikle alt dallanmaların ana dallanmalara göre daha güvenilir olduğu ortaya çıkmaktadır. fB1 cl18, fB1 cl36, fB1 cl22, fB1 cl15’in %100 aynı grupta olduğu görülmektedir. BLAST sonuçları ağaç topolojisini desteklemektedir.



Şekil 3.13.c. Elde edilen DGGE bantlarının filogenetik ilişkisi

Şekil 3.13.c’de 1. Bor havuzu, Seydisuyu, Porsuk Çayı 100 no’lu istasyon ve 2. Bor havuzu’ndan elde edilen DGGE bantlarının 16S rRNA gen tabanında birbirleri ile olan evrimsel ilişki ele alınmıştır. Ağacın istatistiksel güvenilirliği incelendiğinde “bootstrap” değerlerinin genel olarak %27, %40 ve %43 değerleri dışında topolojisinin güvenilir olduğu görülmektedir.



Şekil 3.13.d Elde edilen izolatlar, klonlar, DGGE bantları ve gen bankasından seçilen en yakın ilişkili sekansların filogenetik analizi

Şekil 3.13.d’de izolatlar, klonlar, DGGE bantları ile elde edilen tüm gen havuzunun, gen bankasından seçilen en yakın ilişkili izolatlar ile birlikte oluşturdukları filogenetik ağacın topolojisi görünmektedir. DGGE b10, b11 ve b19 kümesi, M103 kümesi, M107 kümesi, M60, M112, M53, M95, S26 kümesi, dga16, dga33, dga21, dga30 kümesi, M65 kümesi, dga18, dga11 kümesi’nin ilişkili oldukları en yakın türlerin sonuçları %100 dür ve bu sonuçlar BLAST sonuçlarını desteklemektedir. Ağacın diğer dallarındaki “bootstrap” değerlerinin bazıları çok yüksek olmasa da 500 kez yapılan örnekleme sonucu oluşturulmuş en güvenilir ağacı temsil etmektedir.

4. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

Siyanobakteriler okyanuslar, tatlı sular, çıplak kayalar ve toprak gibi hemen hemen bütün habitatlarda yer almaktadırlar. Çoğu tatlı sularda, daha az bir kısmı ise deniz, nemli topraklar ve hatta çöllerde bulunmaktadır. Bazıları ise likenler, bitkiler, çeşitli protistler ya da süngerler ile endosimbiyont olup konukçuya enerji sağlamaktadırlar.

Prokaryotik ve fototrofik yapılarından dolayı Siyanobakteriler başlangıçta prokaryotik algler içerisinde gruplandırılmışlardır. Siyanobakterilerin geleneksel metotlara göre sınıflandırılması morfolojik ve sitolojik özelliklerine bağlı olmuştur (Anagnostidis ve Komarek 1989). Daha sonraları mavi-yeşil alglerin kloroplast ve membran ile çevrili nukleuslarının olmadığına anlaşılması, Siyanobakterilerin yeşil alglerden çok bakteriler ile yakın ilişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır. Siyanobakterilerin farklı taksalar arasındaki taksonomik farklılaşması morfolojik farklılıklarına dayanmaktadır. Siyanobakteriler morfolojilerine göre 5 bölümde sınıflandırılırlar. Bunlar; Chroococcales, Pleurocapsales, Oscillatoriales, Nostocales ve Stigonematales dir. Klasik taksonomik ayırımlarda hücre morfolojisi ve hücrelerin bölünme düzlemi kriter olarak kullanılmıştır.

Çalışmamızda 2006 yılı boyunca Porsuk Çayı, Seydisuyu ve Bor Havuzundan alınmış olan su örneklerinin kimyasal analiz sonuçlarına bakıldığında, Porsuk Çayı'ndaki her bir istasyona ait kimyasal parametrenin oldukça farklı olduğu görülmektedir. Porsuk Çayı'na Kütahya'dan başlayarak Kütahya Belediyesi Mezbahası, Kütahya Belediyesi Kanalizasyon Atıkları, Kütahya Şeker Fabrikası, Güral Porselen Sanayi, Kütahya Tügsaş Gübre Fabrikası, Kütahya Porselen Sanayi, Kümaş Magnezit Fabrikası, Kütahya Seyitömer Termik Santrali yıkama suları (Felent Çayı ile), Kütahya Harlek Ilıcısı evsel atık suları, tarımsal faaliyetler sonucu oluşan kirlenmiş sular verilmektedir. Eskişehir İlinden Porsuk Çayına Ford Otosan İnönü Tesisleri, Yurtbay Seramik, Efes Seramik, Kükürer Gıda San. Tic. Ltd.Şti, Sarar Basma San. ve Tic. A.Ş., Tülomsaş Lokomotif ve Motor San. A.Ş., Tusaş Motor San. A.Ş., Organize Sanayi Bölgesinin evsel ve endüstriyel atık suları, Şeker Fabrikası A.Ş., Hava İkmal Bakım Merkezi-Dersan Deri Sanayi San. Ltd. Şti., Güven Süt A.Ş.,

Danonesa Gıda San. A.Ş., Alpu ve Beylikova İlçeleri kısmi evsel atıkları verilmektedir. Porsuk Çayı'na, belirtilen bu evsel ve endüstriyel atıkların verildiği göz önünde tutulduğunda her bir istasyona ait olan kimyasal parametrenin farklı olması da beklenen bir durum olarak ortaya çıkmaktadır.

Eskişehir-Seyitgazi sulama şebekesinin başlıca su kaynağı olan Seydisuyu ve Seydisuyu'nun iki ayrı kolu üzerinde, DSİ' nin inşa etmiş olduğu sulama amaçlı Kunduzlar ve Çatören Barajları yer almaktadır. Seydisu Etibor Kırka Boraks İşletmesi'nin atıkları ve tarımsal faaliyetler ile kirlenmektedir. Seydisuyu üzerindeki 4 istasyondan alınan su örneklerinin ortalama kimyasal parametrelerinin de farklılık gösterdiği ayrıca Porsuk Çayı, Seydisuyu ve Bor havuzu'ndaki suların kimyasal yönden birbirlerinden oldukça farklı oldukları görülmektedir.

Porsuk Çayı, Seydisuyu ve Bor havuzundaki bor miktarlarına bakıldığında bor havuzundaki bor içeriğinden (4,98 mg/l) sonra en yüksek bor içeriğinin Seydisuyu üzerindeki 137 no'lu istasyona (4,18 mg/l) aittir. Porsuk Çayı'ndaki tüm istasyonlara ait bor içeriklerinin ise bu bölgelere oranla oldukça düşük olduğu ortaya çıkmıştır. Her üç bölgeye ait olan su örneklerindeki pH değerlerine bakıldığında tüm su örneklerinin bazik özellikte olduğu dikkati çekmektedir.

Aldığımız su örnekleri mikroskopik olarak incelendiğinde en fazla morfolojik çeşitliliğin Porsuk Çayı'nda olduğu ve en az morfolojik çeşitliliğinde bor havuzundan alınan su örneğine ait olduğu belirlenmiştir. Bor havuzu'ndan alınan su örneklerinde genellikle tek tip ince filamentli *Oscillatoria* benzeri Siyanobakteri hücreleri görülmüştür.

Çalışmamızda elde edilen izolatların 98 tanesi Porsuk Çayı'ndan, 29 tanesi Seydisuyu'ndan ve 14 tanesi bor elementi içeren atık su havuzundan izole edilmiştir. Porsuk Çayı'ndan elde edilen izolatların 35 tanesinin tek hücreli, 63 tanesinin filamentöz olduğu, Seydisuyu'ndan elde edilen izolatların 6 tanesinin tek hücreli ve 23 tanesinin filamentöz olduğu, bor elementi içeren atık su havuzundan elde edilen 14 adet izolatın ise filamentöz olduğu yapılan mikroskopik incelemeler ile anlaşılmıştır.

Porsuk Çayı, Seydisuyu ve Bor havuzu'ndan elde edilen Siyanobakterilerin morfolojik özelliğine bakıldığında filamentöz Siyanobakterilerin her üç bölgede

de sayıca ve çeşitlilik olarak tek hücreli olanlardan daha fazla olduğu bulunmuştur. Filamentöz izolatların ağırlıklı olarak *Leptolyngbya* ya da *Oscillatoria* cinsine ait olduğu, tek hücreli izolatların ise *Synechococcus* cinsine ait olabileceği mikroskobik olarak tespit edilmiştir.

Çalışmamıza benzer bir çalışma olarak Siyanobakteri izolasyonu ve tanımlanması ile ilgili Türkiye’de yapılan bir çalışmada, Mogan Gölü (Ankara-Türkiye) sivrisine beslenme alanlarındaki Siyanobakteri cinsleri ve yoğunluklarının Ağustos-Eylül döneminde (özellikle *Chroococcus* sp. miktarının) arttığı belirlenmiştir. Alınan su örneklerinden altı adet tek hücreli Siyanobakteri izole edilmiş ve bunların kültürleri hazırlanmıştır. İzole edilen Siyanobakterilerin morfolojik analizlerine göre *Synechococcus*, *Gleocapsa* ve *Synechocystis* cinslerine ait oldukları tespit edilmiştir (Çetinkaya-Dönmez ve ark. 1999). Bu çalışma dışında ülkemizde belli bir ortamdaki Siyanobakteriyel çeşitliliği ortaya koymak amacıyla yapılmış detaylı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Canlı hücre sayımı ya da en muhtemel sayı teknikleri, çevresel örneklerdeki aktif hücrelerin sayısının belirlenmesi için sıklıkla kullanılan yöntemlerdir ancak bu metotlar belirli organizmaları seçtikleri için yetersizdirler. Oligotrofikten mesotrofik habitatlara kadar, direk mikroskobik sayımlar canlı hücre sayısının çok çok üzerindedir. Bu durum sediment ve toprak için de geçerli olmaktadır (Amann ve ark. 1995). Çizelge 4.1.’de kültüre alınabilen bakterilerin toplam hücre sayısı ile karşılaştırması % olarak verilmiştir.

Çizelge 4.1. Kültüre alınabilen bakterilerin toplam hücre sayısı ile karşılaştırması

Habitat	Kültüre alınabilirlik (%) ^a
Deniz suyu	0,001-0,1
Tatlı su	0,25
Mesotrofik göl	0,1-1
Kirlenmemiş haliç suları	0,1-3
Aktif çamur	1-15
Sedimentler	0,25
Toprak	0,3

^aKültüre alınabilen bakterilerin CFU olarak değeri (Amann ve ark. 1995).

Çizelgeden de görüldüğü üzere tüm habitatlar için kültüre alınabilirlik oranı ile gerçek sayı arasında oldukça yüksek bir fark vardır. Bu nedenle yeni moleküler yaklaşımlar, kültüre akınmayan gerçek mikrobiyal çeşitliliğin ortaya konmasını sağlamaktadır. Son yirmi yıldır bilim adamları mikroorganizmaların filogenisi ve populasyon çeşitliliği ile ilgili sorulara cevap olarak moleküler teknikleri geliştirmeye çalışmışlardır. Kültürden bağımsız çalışmalar, doğal komünitelerdeki mikroorganizmaların çeşitliliğini incelemek için yararlı araçlar sağlamaktadır. Belirtilen bu nedenlerden dolayı bir ortamdaki mikrobiyal çeşitliliğin kesin olarak ortaya konması için kültürel yöntemlerin moleküler yöntemlerle desteklenmesi gereği ortaya çıkmıştır ve çalışmamızda kültüre alma ve mikroskobik inceleme çalışmalarının yanında Porsuk Çayı, Seydisuyu ve Bor havuzu'ndaki Siyanobakteriyel çeşitliliğin belirlenmesi için moleküler yöntemlerden de yararlanılmıştır.

Evrimsel ilişkileri incelemek için 16S rRNA sekans benzerlik analizi, prokaryot ve ökaryotlar için oldukça geçerli bir yöntemdir. Çevresel örnekleri rRNA çalışarak karakterize etmek için ilk girişimler yaklaşık 20 yıl önce başlamıştır. Diğer moleküler tekniklerle birlikte rRNA yaklaşımı, mikrobiyal çeşitliliğinin analizi konusunda büyük bir potansiyel doğurmuştur ve rRNA yaklaşımı yeni mikroorganizmaların identifikasyonu için kültürden bağımsız olarak geliştirilmiş tekniklere bir alternatif sağlamaktadır. 16S rRNA PCR temelli yaklaşımlar Siyanobakteriyel komünite yapısını ortaya koymak için kullanılmaktadır. Mikrobiyal çeşitliliğin çalışılmasında uygulanacak yöntemin seçilmesi amaca ve analiz edilecek örneğe göre değişebilmektedir. 16S rRNA gen bölgesinin evrimsel süreçte oldukça korunmuş bir bölge olması ve mikroorganizmaların identifikasyonu için oldukça güvenilir sonuçlar vermesi nedeniyle bu gen bölgesinin analizi çalışmamızda hem elde edilen izolatların tanımlanması hem de kültüre almadan Siyanobakteriyel çeşitliliğin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır (Amann ve ark. 1995).

Çalışmamızda elde edilen izolatların mikroskobik incelemesi yanında bu izolatlardan elde edilmiş olan genomik DNA ekstraksiyonu sonrasında 16S rRNA PCR amplifikasyonu yapılmıştır. Aynı restriksiyon profillerine sahip olan izolatlar aynı ya da çok benzer 16S rRNA sekansına sahip olacaklarından dolayı elde

edilen PCR ürünleri sekanslama basamağından önce restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Böylece sekanslanacak olan sayı sınırlandırılmıştır (Sjoling ve Cowan 2003; Taton ve ark. 2003).

Porsuk Çayı'ndan elde edilen 98 adet izolatın 24 farklı grupta, Seydisuyu'ndan elde edilen 29 adet izolatın 10 farklı grupta ve bor elementi içeren atık su havuzundan elde edilen 14 adet izolatın ise tek bir grupta toplandığı görülmüştür. Çizelge 3.2. de gösterildiği gibi Grup 3, Grup 4, Grup 5, Grup 6, Grup 7, Grup 9, Grup 15, Grup 20, Grup 22'nin, Porsuk Çayı ve Seydisuyu için ortak olduğu, Grup 7'nin, Porsuk Çayı, Seydisuyu ve bor elementi içeren atık su havuzu için ortak grupları oluşturduğu ve geriye kalan grupların Porsuk Çayı ve Seydisuyu için tek bir grup oluşturduğu anlaşılmıştır.

Çizelge 3.2 deki sonuçlara bakıldığında, 24 gruptaki üye sayısının homojen olmadığı sonucuna varılmıştır. Grup 1, Grup 4 ve Grup 7'nin en fazla sayıda üye içerdiği, Grup 3, Grup 8, Grup 9, Grup 11, Grup 12, Grup 13, Grup 16, Grup 17, Grup 19, Grup 21, Grup 23 ve Grup 24'ün bir ya da iki üye içerdiği görülmüştür.

Elde edilen ARDRA gruplandırılmasından sonra, her bir gruptan temsili bir ya da 2 adet izolat seçilmiş ve bu izolata ait 16S rRNA sekans analizi yapılmıştır. Grup 1' den M60 ve S26, Grup 2' den M56, Grup 3' den M85, Grup 4' den M68, Grup 5' den M77, Grup 6' dan M86, Grup 7' den M28 ve B15, Grup 8' den M1, Grup 9' dan M24, Grup 10' dan M65, Grup 11' den M35, Grup 12' den M95, Grup 13' den M93, Grup 14' den M53, Grup 15' den M9, Grup 16' dan M107, Grup 17' den M96, Grup 18' den M103, Grup 2' den M112, Grup 20' den M129, Grup 21' den M130, Grup 22' den M113, Grup 23' den M120, Grup 24' den M16 izolatları seçilerek dizi analizi yapılmıştır.

Çizelge 3.3. de gösterilen 16S rRNA sekanslarına ait BLAST sonuçlarına bakıldığında Grup 2, 5, 7, 9 ve 24'ün *Leptolyngbya*, Grup 1, 12, 14, 18 ve 19'un *Synechococcus*, Grup 8'in *Cyanobium*, Grup15'in *Anabaenopsis*, Grup 11, 20 ve 23'ün *Phormidium*, Grup 10'un *Microcoleus*, Grup 3, 4 ve 17'nin *Pseudanabaena*, Grup 6'nın *Synechocystis*, Grup 13'ün *Oscillatoria*, Grup 16'nın *Snowella*, Grup 22'nin *Nostoc* ve Grup 21'in *Limnothrix* cinslerine ait olduğu görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlardan *Leptolyngbya*, *Synechococcus* ve

Pseudanabaena cinslerinin daha fazla ARDRA grubunu temsil ettiği ve ayrıca bu cinslerin sayı olarak en fazla üyeyi temsil ettiği de anlaşılmıştır.

Porsuk Çayı'ndan elde edilen 98 izolatın 21 istasyona göre morfolojik dağılımları ve bu izolatlardan elde edilen genomik DNA'nın 16S rRNA bölgesinin restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra elde edilmiş olan ARDRA gruplarının sonuçları değerlendirildiğinde Porsuk Çayı'ndaki en fazla çeşitlilik 010, 205 ve 100 no'lu istasyonlardan elde edilmiştir. 010 no'lu istasyondan elde edilen 10 izolat içerisinde, filamentöz izolatlar 5 farklı grup (1 *Leptolyngbya* grubu, 1 *Microcoleus* grubu, 2 *Pseudanabaena* grubu, 1 *Anabaenopsis* grubu) tek hücreli izolatlar ise 2 farklı grupta (2 farklı *Synechococcus* grubu) toplanmış, 205 no'lu istasyondan elde edilen 7 izolat içerisinde, filamentöz izolatlar 4 farklı grupta (2 *Leptolyngbya* grubu, 1 *Anabaenopsis* grubu ve 1 *Nostoc* grubu), tek hücreli olanlar 2 farklı grupta (1 *Synechococcus*, 1 *Synechocystis* grubu) toplanmış, 100 no'lu istasyonda ise elde edilen 12 izolat içerisinde, filamentöz izolatların 5 farklı grupta (2 *Leptolyngbya* grubu, 1 *Pseudoanabaena* grubu, 1 *Anabaenopsis* grubu ve 1 *Phormidium* grubu), tek hücreli olanların ise tek grupta (1 *Synechococcus* grubu) toplandığı ortaya çıkmıştır. Her üç istasyonda da filamentöz *Leptolyngbya* ve *Anabaenopsis* cinslerinin ve tek hücreli *Synechococcus* cinslerinin ortak olduğu ortaya çıkmıştır.

206 ve 094 no'lu istasyonların ise hem sayı hem de çeşitlilik olarak en az Siyanobakteriyel çeşitliliğe sahip oldukları gözlenmiştir. 206 no'lu istasyondan *Leptolyngbya* ve *Synechocystis* cinsine ait olan birer izolat, 094 no'lu istasyondan ise *Microcoleus* ve *Synechococcus* cinslerine ait olan birer izolat elde edilmiştir.

Porsuk Çayı'nda en fazla çeşitliliğe sahip olan 010, 205 ve 100 no'lu istasyonlara ait su örneklerinin kimyasal analiz sonuçlarına bakıldığında, 010 no'lu istasyonda ki klorür miktarının (8,8 mg/ml) Porsuk Çayı'ndaki diğer istasyonlarla karşılaştırıldığında en düşük değere sahip olduğu ve yine 205 ve 100 no'lu istasyonlara ait olan klorür değerlerinin de (sırasıyla 18 mg/ml ve 13,3 mg/ml) yine Porsuk Çayı'ndaki çoğu istasyona göre düşük olduğu görülmektedir. Her üç istasyona ait olan kimyasal parametreler göz önüne alındığında 205 no'lu istasyonda organik madde miktarının diğer iki istasyona göre oldukça fazla olduğu sonucu ortaya çıkmıştır. Her üç istasyondaki amonyak azotu değerine

bakıldığında, 205 no'lu istasyona ait olan değerin (3,776 mg/ml) 010 ve 100 no'lu istasyondaki değerlere göre (0,111 mg/ml ve 0,197 mg/ml) oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Her üç istasyon için belirtilen bu parametreler dışındaki değerlerde Porsuk Çayı'ndaki diğer istasyonlarla çok fazla farklılık olmadığı sonucuna varılmıştır.

Porsuk Çayı'ndaki en az çeşitliliğe sahip olan 206 ve 094 no'lu istasyonlara ait olan su örneklerinin kimyasal analiz sonuçları incelendiğinde, en fazla çeşitliliğe sahip olan 010, 205 ve 100 no'lu istasyonların kimyasal parametrelerine yakın değerlerde olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak, her bir istasyonun sahip olduğu kimyasal parametre ile içerdiği Siyanobakteriyel çeşitlilik açısından direk bir ilişki elde edilememiştir.

Seydisuyu'ndaki çeşitliliğe bakılacak olursa 156 no'lu istasyonda elde edilen 2 filamentöz izolatın 1 grupta (*Leptolyngbya*) ve 2 adet tek hücreli izolatın tek grupta (*Synechocystis*) toplandığı, 008 no'lu istasyondan elde edilen 4 adet filamentöz izolatın 3 farklı grupta (*Pseudoanabaena*, *Leptolyngbya*, *Phormidium*), 2 adet tek hücreli izolatın ise tek grupta (*Synechocystis*) toplandığı belirlenmiştir. 137 no'lu istasyondan elde edilen 8 adet filamentöz izolatın 5 farklı grupta (2 *Leptolyngbya*, 1 *Anabaenopsis*, 1 *Pseudoanabaena* ve 1 *Phormidium*), 2 izolatın ise tek grupta (*Synechocystis*) toplandığı, aynı şekilde 136 no'lu istasyondan elde edilen 7 filamentöz izolatın 4 grup (3 *Leptolyngbya*, 1 *Nostoc*), ve 2 tek hücreli izolatın tek grupta (*Synechocystis*) toplandığı belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar değerlendirildiğinde filamentöz *Leptolyngbya* cinsinin ve tek hücreli *Synechocystis* cinsinin Seydisuyu'ndaki dört istasyonunda da ortak cinsler olduğu belirlenmiştir.

Yüksek düzeyde bor elementi içeren atık su havuzunda ise elde edilen 14 adet filamentöz izolatın tek grupta (*Leptolyngbya*) toplanmasıyla bu bölgede morfolojik olarak çeşitliğinin olmadığı anlaşılmış ayrıca tek hücreli izolat elde edilememiştir.

Sonuç olarak kültürel yöntemler ile Porsuk Çayı'ndan *Synechococcus*, *Cyanobium*, *Anabaenopsis*, *Leptolyngbya*, *Microcoleus*, *Pseudanabaena*, *Synechocystis*, *Oscillatoria*, *Snowella*, *Nostoc*, *Phormidium* ve *Limnothrix* cinslerine ait izolatlar, Seydisuyu'ndan *Pseudanabaena*, *Anabaenopsis*,

Leptolyngbya, *Phormidium*, *Synechocystis* ve *Nostoc* cinslerine ait izolatlar Bor havuzundan ise sadece *Leptolyngbya* cinsine ait izolatlar elde edilmiştir. *Leptolyngbya* nın her üç örnekleme bölgesinde de bulunduğu ortaya çıkmıştır.

Çalışmamızın diğer bir kısmında kültürden bağımsız çalışma olarak Siyanobakteriyel çeşitliliğin belirlenmesinde klonlama ve Denature Edici Gradient Jel Elektroforezi (DGGE) analizleri 16S rRNA gen bölgesini temel alarak uygulanmıştır.

Klonlama yöntemi fA1 ve fB1 olarak isimlendirilen bor elementi içeren atık su havuzundan alınan örnekten gerçekleştirilmiştir. Daha önce de anlatıldığı şekilde, alınan su örneği iki aşamalı olarak filtre edilmiştir. Bunun nedeni alınan su örnekleri direkt olarak ikinci filtre olan Supor filter ile filtre edildiğinde filtrenin daha ilk 20 ml örnek geçirildiğinde tıkanmış olmasından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle alınan 500 ml su örneği öncelikle Whatman kağıdı ile kaba olarak süzölmüş ve ardından bu süzöntü ikinci filtre ile filtre edilmiştir. Bu yöntem literatürde daha önce rastlanmamıştır. Bu yöntem birinci filtrasyon işlemi olan Whatman filtrenin DNA ekstraksiyonu işlem basamaklarında kullanılabilirliğini ve kullanılan ikinci filtre (Supor filter) ile biyoçeşitlilik bakımından farklılık gösterip göstermeyeceğinin ortaya konması bakımından önemli bir bilgi sağlamaktadır.

Daha önce anlatıldığı gibi su örneğinin filtrasyon işlemlerinden sonra filtreden DNA ekstraksiyon basamağı uygulanmış ve ardından 16S rRNA bölgesinin PCR ile amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. PCR ürünlerinin elektroforez ile belirlenmesi, bize Whatman filtrenin DNA ekstraksiyonunda kullanılabileceğini göstermiştir. Elde edilen PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonucu Çizelge 3.6.'da gösterilen sonuçlar elde edilmiştir. Birinci filtre olan Whatman kağıdı ve ikinci filtre olan Supor filtreden elde edilen ARDRA gruplarından bazılarının ortak olduğu fakat her iki filtrenin kendi başına farklı ARDRA grupları da oluşturduğu görölmüştür. Whatman filtre ile 11 farklı ARDRA grubu, Supor filter ile 5 farklı ARDRA grubu elde edilmiş, bunlardan sadece iki grubun ortak olduğu görölmüştür. Elde edilen bu sonuçlar değerlendirildiğinde Whatman kağıdı ile aslında daha fazla çeşitlilik elde edildiği sonucuna varılabilmektedir ancak ikinci filtre ile farklı grupların ortaya çıkması

aslında her iki filtrenin de kullanılması gerektiğini ortaya koymaktadır. Elde edilen ARDRA gruplarından en fazla üye sayısı Grup 1, 2, 3 ve 4'e aittir. Diğer gruplar bir ya da iki üye sayısına sahiptirler. Daha önce izolatlar ile elde edilen ARDRA gruplarında olduğu gibi klonlar içinde aynı yöntem uygulanmış ve her bir grubu temsilen sekans analizi için bir klon seçilmiştir. Sekans işleminden sonra sonuçlar yorumlandığında, klonlara ait olan sekans dizilerinin BLASTlanması ile elde edilen benzerlik oranlarından bazılarının %97'nin altında olduğu görülmüştür. Bu klonlar Çizelge 3.7.de de görüldüğü gibi fA1 klon 1, fA1 klon 4, fA1 klon 8, fA1 klon 9, fA1 klon 10, fA1 klon 11, fA1 klon 12, fA1 klon 14, fA1 klon 18, fA1 klon 20, fA1 klon 27, fB1 klon 17, fB1 klon 20, fB1 klon 24'dür. Bu klonların benzerlik yüzdelerinin düşük olması, acaba bu sekanslar bir "chimer" mi? Sorusunu akla getirmiştir. Chimeric diziler daha önce de belirtildiği gibi PCR sırasında meydana gelen hatalardan dolayı farklı atasal dizilerin bir karışımını içeren yapay dizilerdir. Eğer sekans bir chimer ise, bunu belirlemek için çeşitli yöntemler uygulanabilmektedir. Bunlardan birincisi, kabaca bir fikir edinmek için ilk olarak kullanılabilir bir yöntemdir. Elde edilen dizi analizi sonucu ikiye bölünerek tekrar BLAST landığında her iki parça dizi ile elde edilen BLAST benzerlik değeri eğer %97 ve üzerinde ise bu dizinin bir chimer olabileceğini işaret etmektedir. Çizelge 3.8 de gösterildiği gibi, bizim elde ettiğimiz BLAST benzerlik değerleri hala %97 nin altındadır. Bu nedenle uygulanan birinci adım sonucuna göre, "bu diziler kesinlikle chimer değildir" denilebilmesi için daha başka analizlerin yapılmış olması gerekmektedir. Daha önce anlatıldığı gibi Chimeric DNA analizi, Ribosomal DataBase Project II ve Bellerophon web sitesinde var olan Chimera Check ile olası chimer lerin varlığı analiz edilmiştir.

Şekil 3.14.'de gösterilen Bellerophon analiz sonucuna göre, chimeric bir dizi elde edilmemiştir. Bunun yanında, diğer bir program olan "Chimera Check" ile de ikinci bir analiz yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara bakıldığında chimeric bir dizi olmadığı anlaşılmıştır. Gerçek bir chimeric dizide olması gereken özellikler daha önce bulgular bölümünde bahsedilmiştir. Chimeric dizi elde edilmediğinden yola çıkarak, BLAST benzerlik yüzdesi düşük olan dizilerin yeni türlere ait olabileceği düşünülmüştür. Ancak bunun doğrulanması için, aynı ortamlardan bu

türlerin izole edilerek detaylı genom analizlerinin yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak Bor havuzundan Çizelge 3.7.'de gösterildiği gibi klonlama yöntemi ile *Leptolyngbya*, *Merismopedia* ve *Nostoc* cinsine ait olan Siyanobakteriyel sekanslar ve kesin olarak tanımlamayan sekanslar elde edilmiştir.

Bor havuzunun içerdiği bor miktarı nedeniyle ekstrem bir çevre olduğunu düşünürsek, bu çalışmada elde edilen klonlar yeni ve henüz kültüre alınmamış mikrobiyal türleri de işaret edebileceği düşünülmektedir. Ancak 16S rDNA sekansı tek başına, tanımlanan organizmanın fizyolojik ve biyokimyasal potansiyeli konusunda bilgi sağlayamamaktadır. Ayrıca, bilinen diğer organizmalara yüksek derecede 16S rDNA farklılığı gösteren organizmaların keşfedilmesi, yeterli bir bilgi bankası eksikliğinden de kaynaklanabilmektedir. Diğer yandan bu durum, ekstrem koşullardaki hayata özelleşmiş, dar bir grup organizmanın varlığını da işaret edebilmektedir (Pearl ve ark. 2000).

Çalışmamıza benzer bir çalışma olarak Ward ve ark. (1990) tarafından yapılan çalışmada 55°C'de gelişen bir Siyanobakteri kümesini çalışmak için 16S rRNA gen bölgesini klonlamışlardır. Sekiz farklı sekans tipinin ayrımını gerçekleştirmişlerdir. Bu sekans tiplerinin hiç birisi, kültüre alınmış yaklaşık 1000 bakteriyel ve Archaeal türden türevlenen 16S rRNA databankasındaki sekanslar ile eşleşmemiştir ve belli bir ortamdaki toplam mikrobiyal popülasyona ait olan genomik DNA'dan yapılan PCR yönteminin chimerlerin oluşması bakımından problem yarattığı ortaya konmuştur. Bu nedenle de çalışmamızda belirtilen bu chimeric analizler yapılmıştır.

16S rRNA PCR-DGGE (Polimeraz Zincir Reaksiyonu Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi) mikrobiyal kominütelerin genetik çeşitliliğinin belirlenmesinde en çok kullanılan yöntemlerden birisidir. Bu metot aynı uzunluktaki fakat farklı sekanstaki küçük DNA fragmentlerinin (maksimum 1000 bp) farklı erime özelliklerine göre ayırımına izin veren bir tekniktir. Tek bir baz farklılığına sahip fragmentler bu teknikte ayrılabilirler. Çift iplikli fragmentlerin tamamen denaturasyonunu önlemek için bir GC etiketi forward primerin 5' ucuna eklenmektedir. DGGE bantlarının pozisyonu ve yoğunluğu doğal örnekteki çeşitliliğin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Myers ve ark. 1985;

Muyzer 1999; Nollau ve Wagener 1997; Garcia-Pichel ve ark. 2003; Lyautey ve ark. 2005; Song ve ark. 2005).

Bu yöntem aslında insan genomik DNA'sındaki nokta mutasyonları belirlemek için geliştirilmiştir (Sheffield ve ark. 1989). Nübel ve ark. (1997) bu yöntemi Siyanobakteriyel biyoçeşitliliğin belirlenmesi amacıyla yönelik olarak geliştirmişlerdir. 379 bp'lık 16S rRNA gen sekansı için CYA359F (forward), CYA781R(a) ve CYA781R(b) (reverse) Siyanobakteriyel primerlerini tasarlamışlardır. CYA781R(a) ve CYA781R(b), 5'-3' yönünde pozisyon 7 ve 23 de iki polimorfik baz ile farklılık göstermektedir. V3 ve V4 bölgelerine karşılık gelen bu primerler filogenetik değerlendirme için önemli bilgi içermektedirler (Yu ve Morrison 2004).

DGGE yöntemi ile yapılan çalışmamızda, birinci bor havuzu, Seydisuyu, Porsuk Çayı ve ikinci bor havuzundan alınan su örnekleri Siyanobakteriyel çeşitliliği belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Daha önce anlatıldığı gibi, yapılan semi-nested PCR sonrasında DGGE a ve DGGE b jelleri elde edilmiştir.

DGGE a jelinden elde edilen bant profillerine bakıldığında, DGGE a1, DGGE a2, DGGE a3 bantları birinci bor havuzundan elde edilmiş birinci filtre olan fA1, DGGE a7, DGGE a8, DGGE a9 bantları ise ikinci filtre olan fB1 filtrelerine aittir. Her iki filtre ile elde edilen bant profillerinin pozisyonunun benzer olduğu görülmüştür. Benzer bant profillerinin BLAST sonuçlarının aynı olduğu görülmüştür. fB1 filtresi ile fA1 filtresine ilave olarak elde edilen DGGE a5 ve DGGE a6 bantlarının dizi analizi sonucu elde edilememiştir. Bu sonuç, bu bantların gerçekten Siyanobakterilere ait olmadığını ya da bu bantların saf olmaması gibi ihtimallerle açıklanabilmektedir. DGGE a1 ve DGGE a7 bantlarına ait BLAST benzerlik yüzdesinin düşük olduğu (% 89, *Oscillatoria*) görülmektedir. Klonlama yönteminde olduğu gibi DGGE yönteminde de düşük BLAST benzerlik yüzdesi olan sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar bor havuzundan yeni türlerin elde edilebileceği sonucunu desteklemektedir. Birinci bor havuzundan DGGE yöntemi ile *Nostoc* ve *Phormidium* cinslerine karşılık gelen tür sonuçları elde edilmiştir. Bor havuzundan elde edilen izolatlar daha önce belirtildiği gibi sadece *Leptolyngbya* cinsine karşılık gelmiştir. Birinci bor havuzundan yapılan klonlama sonucu *Leptolyngbya*, *Merismopedia* ve *Nostoc* cinslerine ait olan klonlar elde

edilmiştir. Buradan yola çıkarak, bor havuzundan sadece *Leptolyngbya* cinsine karşılık gelen türlerin izole edilebildiği, DGGE yöntemi ile elde edilen *Nostoc* ve *Phormidium* a ait olan türler ve klonlama ile elde edilen *Merismopedia* ve *Nostoc* cinslerine ait türlerin elde edilemediği ortaya çıkmıştır. Bu sonuçlardan birinci bor havuzundan *Leptolyngbya* cinsinin kültürel yöntemler ve klonlama ile, *Nostoc* cinsinin ise hem klonlama hem de DGGE yöntemi ile elde edildiği belirlenmiştir. Ayrıca yapılmış olan klonlama ve DGGE yöntemleri ile elde edilmiş olan cins sonuçlarında farklılık olduğu da ortaya çıkmıştır. Çalışmamızda elde edilen bu veriler yapılan çalışmalar ile paralellik göstermektedir (Boutte ve ark. 2005; Calusinka 2005).

İkinci bor havuzuna ait olan DGGE a jelindeki fA4 ve fB4 filtrelerine ait olan bant profillerine bakıldığında DGGE a21, DGGE a22 pozitif bantları birinci filtre olan fA4'den, DGGE a33 numaralı pozitif bant ise ikinci filtre olan fB4'den elde edilmiştir. Aynı pozisyona karşılık gelen DGGE a21 ve DGGE a33 bantları *Arthrospira* cinsine karşılık gelmiştir. DGGE a22 batına ait olan BLAST benzerlik yüzdesinin birinci bor havuzundan elde edilen DGGE a1 ve DGGE a7 bantları gibi düşük BLAST benzerlik oranına (%90, *Oscillatoria*) sahip olduğu görülmüştür. DGGE a1, DGGE a7 ve DGGE a22 bantlarının jeldeki pozisyonlarının benzer olması elde edilen bu belirsiz cins sonucunu desteklemektedir. 2. kez elde edilen bu DGGE sonuçları ile klonlama sonuçlarına paralel olarak bu bölgedeki olası yeni türlerin varlığı desteklenmiştir. İkinci bor havuzundan DGGE yöntemi ile *Arthrospira*, *Phormidium*, *Planktothricoides* cinslerine ait olan sekanslar kesin olarak tanımlanmıştır.

Seydisuyuna ait olan DGGE a jelindeki fA2 ve fB2 bant profillerine bakıldığında, yine benzer bant profillerinin elde edildiği görülmektedir. fA2 filtresi ile *Cyanobacterium*, *Lyngbya*, *Nostoc* ve *Phormidium* cinslerine karşılık gelen sonuçlar, fB2 filtresi ile yine *Cyanobacterium* ve *Lyngbya* cinslerine karşılık gelen sonuçlar elde edilmiştir. Seydisuyu'ndan elde edilen izolatların karşılık geldiği cinsler daha önce belirtildiği gibi *Pseudoanabaena*, *Leptolyngbya*, *Synechocystis*, *Phormidium*, *Anabaenopsis* ve *Nostoc*'dur. Seydisuyu'ndan DGGE yöntemi ile farklı olarak *Cyanobacterium* cinsine ait sonuçlar elde edilmiştir.

Porsuk Çayı 100 no'lu istasyona ait olan DGGE a jelindeki fA3 ve fB3 bant profillerine bakıldığında fA3 filtresi ile daha fazla bant profilinin elde edildiği görülmektedir. fA3 filtresi ile *Arthrospira*, *Lyngbya* ve *Planktothricoides* cinsleri, fB3 filtresi ile sadece *Arthrospira* cinsine karşılık gelen sonuçlar elde edilmiştir. Porsuk Çayı 100 no'lu istasyondan elde edilen izolatların daha önce de belirtildiği gibi *Leptolyngbya*, *Anabaenopsis*, *Pseudanabaena*, *Phormidium* ve *Synechococcus* cinslerine ait oldukları bulunmuştur. Bu sonuçlardan da görüldüğü üzere kültüre alma yöntemi ve DGGE yöntemi ile *Lyngbya* dışında ortak cins elde edilememiştir.

DGGE a jeli ile elde edilen tüm sonuçlar değerlendirildiğinde 4 bölgede de birinci filtre ile daha fazla sayıda bant ve dolayısı ile daha fazla sayıda çeşitlilik elde edilmiştir. Jel üzerinde benzer bant pozisyonuna sahip olan bantların benzer BLAST sonucunu verdiği görülmüştür. Ayrıca DGGE a2 jelinde CYA781R(a) primeri kullanıldığı için filamentöz Siyanobakterilerin fazla olması beklenmektedir. Elde edilen bantların BLAST sonuçlarına bakıldığında bütün bantların filamentöz Siyanobakterilere ait olduğu görülmüş ve çalışmamız bu bakımdan literatürle paralellik göstermiştir (Boutte ve ark. 2005).

Tek hücreli Siyanobakterileri belirlemek amacıyla yapılan DGGE b jelinden elde edilen bant profiline bakıldığında, DGGE a jelinden sayı ve yoğunluk olarak daha az bant elde edildiği görülmüştür. Dolayısıyla bu ortamlardaki tek hücreli Siyanobakteri popülasyonunun çeşitlilik ve sayı olarak filamentöz olanlara göre daha az olduğu sonucuna varılmıştır.

Birinci bor havuzundan elde edilen fA1 filtresine ait olan 5 bandın BLAST benzerlik yüzdesinin %89-90 olduğu ve tam bir identifikasyon sonucunun elde edilemediği görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlar daha önce klonlar ve DGGE a jelinden elde edilen belirsiz identifikasyon sonuçları ile uyumaktadır. Dolayısıyla bu bantlara ait sekansların yeni türleri temsil etme olasılığı desteklenmiştir.

İkinci bor havuzuna ait olan DGGE b jelindeki fA4 ve fB4 filtrelerine ait olan bant profillerine bakıldığında DGGE b12, DGGE a13 pozitif bantları birinci filtre olan fA4'den, DGGE b22 ve DGGE b23 numaralı pozitif bantlar ise ikinci filtre olan fB4'den elde edilmiştir. İki filtreden elde edilen bu bantların pozisyonlarının benzer olduğu görülmüştür. Elde edilen bu 4 banda ait BLAST

sonucu *Leptolyngbya* cinsine karşılık gelmektedir. Bor havuzundan yapılmış olan kültürel çalışmalar ile de sadece *Leptolyngbya* cinsine ait olan izolatların elde edilmesi bu sonuçlar ile paralellik göstermiştir.

Seydisuyuna ait olan DGGE b jelindeki fA2 ve fB2 filtrelerine ait olan bant profillerine bakıldığında, fA2 filtresinden sadece 1 tane pozitif PCR reaksiyonu veren DGGE bandı elde edilmiştir. İkinci filtreyi temsil eden fB2’de hiçbir bant gözlenmemiştir. fA2 filtresinden elde edilen DGGE b7 bandına ait BLAST sonucu da %90 olup, tam bir identifikasyon sonucu vermemiştir. Bu sonuç, Seydisuyu’nda da Siyanobakterilere ait yeni türlerin olabilme olasılığını ortaya koymuştur.

Porsuk Çayı 100 no’lu istasyona ait olan DGGE b jelindeki fA3 ve fB3 bant profillerine bakıldığında fA3 filtresi ile DGGE b10 ve b11 bantları, fB3 filtresi ile DGGE b19 bantları elde edilmiştir. Elde edilen 3 banda ait BLAST sonucu *Microcystis* cinsine karşılık gelmektedir. Her iki filtredeki bant pozisyonları farklıdır. Porsuk Çayı 100 no’lu istasyondan elde edilen izolatlardan tek hücreli olanlar sadece *Synechococcus* cinsine karşılık gelmiştir. *Microcystis*’e ait izolat elde edilmemiştir.

Elde edilen tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde, bor havuzundan elde edilen klonların düşük BLAST oranına sahip olmaları gibi belirsiz sonuçlar, DGGE yönteminde de elde edilmiştir. DGGE yöntemi ile de benzer belirsiz sonuçların elde edilmesi ile bu bölgede yeni türlere ait olabilecek sekansların bulunduğu ortaya çıkmış ve bu sekansların ait olduğu Siyanobakteriyel hücrelerin çeşitli izolasyon teknikleri kullanılarak ve şartları optimum düzeyde sağlayarak izole edilmeleri gerekliliği ortaya çıkmıştır.

Klon kütüphanesi oluşturmanın oldukça zaman alıcı olduğunu ve çok sayıda sekansın belirlenmesini gerektirdiğini düşünürsek, DGGE yöntemi bu yönüyle klonlamaya göre üstün sayılmasına rağmen, incelenen örnekte var olan gerçek mikroorganizma çeşitliliğini daima yansıtmadığı bildirilmiştir. Denature Edici Gradient Jel Elektroforezi (DGGE) incelenen çevresel bir örnekteki mikrobiyal biyoçeşitliliğin hızlı bir şekilde taranması için uygun bir yöntemdir ve de aynı pozisyondaki bantların aynı türden türevlenmediğini de göstermektedir (Boutte ve ark. 2005; Boutte ve ark. 2006).

Biyoeçitliliğin belirlenmesi için kullanılan klonlama ve DGGE yöntemleri çeşitli araştırmacılar tarafından birbirlerine göre avantajlı ya da dezavantajlı yönleriyle ortaya konulmuştur. DGGE yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada araştırmacılar 16S rRNA sekanslarına dayanarak yapılan çeşitli doğal ve yapay ortamlardan Siyanobakteriyel rRNA gen fragmentlerinin seçici olarak eldesinde bir PCR yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemin DGGE yöntemi ile kombinasyonu, çevresel örneklerdeki Siyanobakteriyel 16S rRNA genlerinin çeşitliliğini ortaya koymada yarar sağlamıştır. Homojen bir popülasyona ait olan DNA moleküllerini içeren PCR ürünleri DGGE sonrasında tek bantlar olarak ayrılmış ve direkt olarak sekanslanmıştır. Bu bantların büyüklüğü yaklaşık olarak 16S rRNA geninin yaklaşık olarak 700 nükleotidlik bir kısmını oluşturmaktadır. Böylece heterotrofik bakterileri içeren Siyanobakteriyel kültürlerden zaman alıcı yöntem olan moleküler klonlama yapmadan sekans verileri elde edilebilmiştir (Nübel ve ark. 1997). Bunun aksine yapılan başka bir çalışmada ise klonlama yönteminin daha fazla vakit alıcı olmasına rağmen biyoeçitliliğin ortaya konması açısından daha güvenilir sonuçlar ortaya koyduğu bildirilmiştir. Yapılan bu çalışma Antartik Gölünün mikrobiyal matındaki Siyanobakteriyel çeşitliliğin morfolojik karakterizasyon ile moleküler karakterizasyonun ilk olarak birlikte kullanılması bakımından önemlidir. Mikroskopi sekiz farklı morfotipin identifikasyonunu sağlamıştır. Bunlardan sadece bir tanesi Antartik endemik tür olarak belirlenmiştir. Moleküler analizler tamamen farklı bir profil sağlamıştır. 15 den fazla filotip bulunmuştur fakat bunların hiçbirisi mikroskopi ile gözlenen *Nodularia* ya da *Hydrocoryne* 'ye ait olmamıştır. Bu çalışmada 16S rRNA gen sekansı 11 filogenetik küme belirlemiştir. Bunlardan 3'ü Antartik için özel ve 2'sinin yeni küme olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak bu çalışmada moleküler metotlarla, geleneksel mikroskobik analiz ile tespit edilen çeşitlilikten çok daha fazla çeşitlilik ortaya konulmuştur ve kullanılan moleküler yöntemlerden biri olan klon kütüphanesi yönteminin DGGE'ye göre Siyanobakteriyel çeşitliliğin tam olarak ortaya konmasında daha etkili olduğu belirtilmiştir (Taton ve ark. 2003).

Çalışmamıza benzer olarak yapılan bir çalışmada farklı substratlar üzerinde gelişen Utah Colorado Platosunun dört biyolojik çöl katmanındaki Siyanobakteri komünitelerinin yapıları karşılaştırılmıştır. Doğal örnekler, kültürler,

Siyanobakteriyel filamentler ya da koloniler DGGE ve 16S rRNA genlerinin dizi analizi ile incelenmiş ve bu analizler neticesinde birçok yeni filogenetik küme identifiye edilmiştir. Yapılan çalışmada *Microcoleus vaginatus*'un baskın çöl Siyanobakterisi olduğu anlaşılmıştır. Ortaya çıkan bu filogenetik küme içerisinde “xeronema” olarak adlandırılan yeni ve *Phormidium* benzeri Siyanobakteriler içinde gruplandırılan bir grup ortaya çıkartılmıştır. Farklı toprak tiplerinin farklı Siyanobakteriyel kommunité tiplerine sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada çevresel 16S rRNA verileri, mikroskopi ve kültüre alma yöntemleri bir arada kullanılarak Siyanobakteri karakterizasyonu yapılmıştır. (Garcia-Pichel ve ark. 2001).

16S rRNA geni temel alınarak yapılan benzer bir çalışmada kültüre edilememiş *Chloroflexaceae* ilişkili bakterilerin alkalın sıcak su kaynaklarındaki dağılımı, çeşitliliği ve fenotipleri araştırılmıştır. Direkt PCR, moleküler klonlama, 16S rRNA genlerinin dizi analizi yaklaşımlarının kullanılmasıyla bu bakteriler arasında oldukça fazla filogenetik çeşitlilik tespit edilmiştir. *Chlorflexus* sp. filamentlerine 60°C’de nadir rastlanmış fakat 70°C’de oldukça fazla görülmüşlerdir (Nübel ve ark. 2002).

Yine 16S rRNA gen bölgesi temel alınarak Neilan ve ark. (2002) tarafından yapılan bir çalışmada mikrobiyal ekoloji ve evrimi çalışmak için modern stromatolitler seçilmiştir. Ön çalışma olarak, geniş bir çevrede stromatolit oluşumundan sorumlu Siyanobakterileri karakterize etmek için geliştirilmiş spesifik genetik problemler kullanılmıştır. İki kıta üzerindeki Siyanobakteri izolatları termal sıcak su kaynakları, hipersalin göller ve okyanus kenarlarındaki stromatolitlerden toplanmıştır. Siyanobakteriyel 16S rRNA gen ürününün sekansları evrimsel ilişkiyi açıklamıştır. Stromatolit türevli tüm sekanslar Siyanobakteriler ile çok yakın ilişki göstermiştir. Benzer bir çalışma West ve ark. (2001) tarafından yapılmıştır. Doğal ortamda *Prochlorococcus* sp. nin kommunité yapısını hızlı bir şekilde değerlendirmek için 16S rRNA hedefli oligonükleotidler kullanılmıştır.

Çalışmamıza benzer olarak Boutte ve ark. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada Çek sularından yazın toplanan su örneklerinin Siyanobakteriyel çeşitliliğini değerlendirmek için 16S rRNA gen bölgesi temelinde DGGE ve

klonlama yöntemlerini kullanmışlardır. Analiz edilen 38 örnekten 113 DGGE bant sekansı elde edilmiştir. 2 bölgeye ait örnekten klonlama yapılmış ve 128 kısmi 16S rRNA sekansı elde edilmiştir. Yapılan filogenetik analiz ile 7 Siyanobakteriyel küme elde edilmiştir. 38 örneğin mikroskobik ve moleküler analizleri sonucu genellikle benzerlik göstermiştir. *Anabaena/Aphanizomenon*, *Microcystis* ve *Woronichinia* yaz aylarında Çek sularındaki temel cinsler olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada mikroskobik incelemeler ve moleküler metotlar ile elde edilen cinsler arasında farklılıklar elde edilmiştir. Bizim çalışmamızda da kültürel yöntemler ve moleküler yöntemler ile elde edilen sonuçlar arasında cins seviyesinde farklılıklar gözlenmiştir. Çalışmamızda kültürel yöntemler ile Porsuk Çayı'ndan *Synechococcus*, *Cyanobium*, *Anabaenopsis*, *Leptolyngbya*, *Microcoleus*, *Pseudanabaena*, *Synechocystis*, *Oscillatoria*, *Snowella*, *Nostoc*, *Phormidium*, *Limnothrix* cinslerine ait izolatlar elde edilmişken, moleküler yöntemler ile farklı olarak *Arthrospira*, *Lyngbya*, *Planktothricoides* ve *Microcystis* cinslerine ait sekanslar elde edilmiştir. Yine benzer olarak Seydisuyu'nda kültürel yöntemler ile *Pseudoanabaena*, *Leptolyngbya*, *Synechocystis*, *Phormidium*, *Anabaenopsis* ve *Nostoc* cinslerine ait izolatlar elde edilmişken moleküler yöntemler ile farklı olarak *Cyanobacterium* ve *Lyngbya* cinslerine ait sekanslar elde edilmiştir.

Çalışmamıza benzer olarak yapılan diğer bir çalışmada, 2001 ve 2002 Ağustos ayında ötrofik Joutikas/Finlandiya gölünden su örnekleri toplanmıştır. Bu örneklerden DNA izolasyonu yapılarak, 16S rRNA'nın kısmi amplifikasyonu yapılmış ve DGGE yöntemi uygulanmıştır. Siyanobakteriler ayrıca mikroskopi ile tanımlanmıştır. Jeldeki ana bantlar sekanslanmıştır. *Anabaena/Aphanizomenon* her iki yılda da en bol olarak bulunan cins olmuştur. DGGE analizi *Microcystis* ve *Synechococcus* cinslerinin baskın olduğunu göstermiştir (Kolmonen ve ark. 2004).

Matsunaga ve ark. (2000) tarafından, 16S rRNA gen bölgesi temel alınarak yapılan bir çalışmada 148 Siyanobakteriyel suşun 16S rDNA bölgesinin değişebilen bölgelerinden *Anabaena* sp., *Microcystis* sp., *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp., ve *Synechococcus* sp., deteksiyonu için cins-spesifik oligonükleotid proplar tasarlanmıştır. Uygulanan bu yöntemle beş Siyanobakteriyel cins tanımlanmıştır (Matsunaga ve ark. 2000).

Castiglioni ve ark. (2004) Siyanobakteriyel türlerin hızlı ve güvenilir bir şekilde identifikasyonu için 16S rRNA gen bölgesini hedef alarak miroarray yöntemini kullanmışlardır. *Anabaena/Aphanizomenon*, *Calothrix*, *Cylindrospermopsis*, *Cylindrospermum*, *Gloeotheca*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Planktothrix*, Antarctic *Phormidium*, *Prochlorococcus*, *Spirulina*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Trichodesmium* ve *Woronichinia* olmak üzere 19 Siyanobakteriyel gruba özgü prob tasarlamışlar ve bu grupları identifiye etmişlerdir. 95 örneği (kültür koleksiyonundan alınmış 24 akselik suş, 27 izole edilmiş suş ve çevresel örneklerden elde edilmiş 44 klonlanmış fragment) test etmişler ve mikroarray metodu Siyanobakterilerin hızlı ve güvenilir şekilde identifikasyonu için büyük bir potansiyel oluşturmuştur. Mikroarray yöntemi özel bir çalışma donanımı gerektirdiğinden dolayı çalışmamızda şu anda kullanılamamasına rağmen, hem araştırma hem de çevresel monitörleme konularında gelecekteki çalışmalarımıza adapte edilebilmesi amaçlanmaktadır.

Benzer olarak Willame ve ark. (2006) Belgium ve Luxemburg daki tatlı su bloomlarından izole ettikleri 95 Siyanobakteriyel suşun taksonomisi ve çeşitliliğini 16S rRNA gen bölgesini hedef alarak değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak oldukça fazla Siyanobakteriyel çeşitlilik elde etmişlerdir. Bloom oluşturan suşlar *Microcystis*, *Woronichinia*, *Planktothrix*, *Anabaena*, ve *Aphanizomenon* cinsleri, aynı örneklerden izole edilmiş diğer suşlar nonplanktonik *Aphanocapsa*, *Aphanothece*, *Snowella* ve *Pseudanabaena*, planktonik *Cyanobium* ve bentik perifitik *Geitlerinema*, *Komvophoron*, *Leptolyngbya*, *Lyngbya*, *Phormidium*, *Calothrix*, *Nostoc* ve *Trichormus* cinsleri ile ilişkilendirilmiştir.

16S rRNA gen bölgesi temel alınarak yapılan çalışmalardan birisi de Taton ve ark. (2006) tarafından gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar 23 Antartik gölünden 59 suş izole etmişler ve bu suşları morfolojik ve genotipik olarak karakterize etmişlerdir. Morfolojik olarak, Siyanobakteriler dört Antartik endemik taksayı içeren 12 türe atanmıştır. 56 suşun ribozomal rRNA gen sekansı belirlenmiştir. Genel olarak aynı morfolojiye ait olan suşlar 16S rRNA gen seviyesinde çok yakın ilişki göstermişlerdir. 56 suş için 21 OTU (Operational Taxonomic Unit) bulunmuştur, bunlardan dokuz tanesi yeni ve üç tanesi Antartik için özel grupları

oluşturmuştur. *Petalonema cf. involvens* ve *Chondrocystis* sp. sekansları bu çalışma ile ilk kez belirlenmiştir.

Bazı araştırmacılar mikrobiyal çeşitliliği belirlemek amacıyla 5S rRNA moleküllerini karışık örneklerden direkt olarak ekstre etmişlerdir. Farklı kommunitelere üyelerine ait olan bu moleküller, elektroforetik olarak ayrılmıştır ve karşılaştırmalı sekans analizi ile filogenetik bir yaklaşım ortaya konulmuştur. Ancak 5S rRNA'nın yaklaşık 120 nükleotidlik bilgi içeriği oldukça küçük olduğundan ve farklı 5S rRNA moleküllerinin elektroforetik ayırımı, çok kompleks olmayan ekosistemler için uygulanabilirliğini sınırlandırmıştır. Bu nedenle araştırmacılar mikrobiyal ekolojideki çalışmalar için daha güvenilir bir moleküler markır olarak 5S'den daha büyük rRNA moleküllerinin kullanımını ortaya koymuşlardır. Bakteriyel 16S rRNA molekülü yaklaşık 1500 nükleotide, 23S rRNA molekülleri ise 3000 nükleotide sahip olduğundan dolayı ve her iki molekülde yer alan yaklaşık 1000 nükleotidlik bir bilgi gerçek bir filogenetik analiz için yeterli olduğu sonucuna varılmıştır. Bu amaçla önerilen ilk adım, toplam kommunitelere DNA'sının ekstraksiyonu olmuştur. Daha sonra 16S rRNA spesifik probu ile hibridizasyon, 16S rRNA genlerini içeren klonlardan sekansın belirlenmesi ve elde edilen sekansların karşılaştırmalı analizleri diğer adımları oluşturmaktadır. PCR yöntemi sayesinde 16S rRNA gen fragmentleri karışık DNA'dan seçici olarak amplifiye edilebilmekte ve hızlı bir şekilde sekanslanabilmektedir. Ek olarak, doğal mikrobiyal kommunitelerin moleküler karakterizasyonu için henüz diğer bir yol olmadığı da literatürde belirtilmiştir (Aman ve ark. 1995). Belirtilen bu sebeplerden dolayı da çalışmamızda Siyanobakteriyel çeşitliliği belirlemek amacıyla moleküler bir markır olarak 16S rRNA gen bölgesi kullanılmış ve elde edilen sonuçlar yorumlanmıştır.

Çok yaygın olarak kullanılmamakla birlikte yinede bazı araştırmacılar 16S rRNA gen bölgesi dışında *rpoB*, *rpoC1*, *recA*, *rpoD1*, *gyrA* ve *nifH* gibi proteinleri kodlayan genleri Siyanobakteriyel filogeni analizi için alternatif bir kalıp olarak kullanmışlardır. Ancak var olan sekans bilgisi oldukça sınırlı olduğundan dolayı bu genlerin kullanımı da biyoçeşitliliğin tam olarak belirlenmesi için yeterli olmadığı belirtilmiştir (Gugger ve ark. 2005; Case ve ark. 2007; Bauer ve ark. 2008).

Belirtilen bu moleküler araçlardan çalışmamızda kullanılmamış olmasına karşın *rpoC1* gibi kısa sekans bilgisine sahip olan bu gen bölgeleri kullanılarak biyoçeşitliliğin ortaya konduğu çalışmalar da vardır. Örnek olarak Ma ve ark. (2004) Güney Çin Denizindeki Siyanobakterilerin doğal kommünite yapısını *rpoC1* gen sekans analizi ile ortaya koymuşlardır. Deniz suyundan ekstre edilen çevresel DNA'lardan elde edilen *rpoC1* genlerinin amplifikasyonu, fragmentlerin klonlanması ve sekans analizi incelenen bölgede *Prochlorococcus* ve *Synechococcus*'a ait çeşitliliğin oldukça fazla olduğu göstermiştir.

Yine 16S rRNA gen bölgesi dışında hedef alınan kısa sekans bilgisine sahip diğer bir gen bölgesi olan *nifH* geni Falcon ve ark. (2002) tarafından tropikal kuzey Atlantik okyanusunun planktonları içerisinde tek hücreli azot fikse eden Siyanobakterilerin filogenetik ilişkileri ve genetik çeşitliliğini ortaya koymak için kullanılmıştır. Elde edilen *nifH* gen sekansları subtropikal Kuzey Pasifik'te bulunan bir grup Siyanobakteri ile ilişkilendirilmiştir. Okyanus bölgeleri içinde ve arasında ekolojik olarak farklı ve evrimsel olarak kompleks bir profil elde edilmiştir.

Yapılan bu çalışmalar dışında yine indirekt immunofloresan yöntemi, rastgele amplifiye edilmiş polimorfik DNA PCR'ı, yaygın olmasa da farklı ekosistemlerdeki Siyanobakteriyel çeşitliliği belirlemek amacıyla uygulanmış olan yöntemler arasındadır (Campbell ve ark. 1983; Neilan 1995).

Çalışmamızda filogenetik analiz için "TREECON for Windows (version 1.3b)" programı kullanılmış ve ağaçlar Neighbour-Joining metoduna göre yapılmıştır. Oluşan dalların istatistiksel olarak doğruluğu "bootstrap" analizi ile 500 kez örnekleme yapılarak belirlenmiştir. Şekil 3.15.a.'da gösterilen filogenetik ağaç, elde edilen izolatların birbirlerine göre olan evrimsel ilişkisini göstermektedir. Ağacın topolojisi istatistiksel olarak yorumlandığında "bootstrap" değerlerinin genel olarak %50'nin üzerinde olduğu ve bu anlamda topolojinin güvenilir olduğu ortaya çıkmaktadır. Ağaçtaki dallanmadan da görüldüğü gibi %100 oranında aynı kümeye dahil olan M53, S26, M112, M95, M60 izolatlarının BLAST sonuçları bu dağılımı desteklemektedir. Bu izolatların hepsi Porsuk Çayının farklı istasyonlarından alınmış su örneklerine aittir. Diğer yandan Seydisuyu'ndan alınmış su örneğinden izole edilen M28 ve bor havuzundan

alınmış su örneğinden izole edilmiş olan b15 izolatları da %99 oranında aynı küme içerisinde yer almıştır. Bu izolatların BLAST analizine göre *Leptolyngbya* cinsine dahil oldukları görülmektedir.

Şekil 3.15.b.'de gösterildiği gibi bor havuzundan alınmış su örneğinden elde edilen klonların birbirleriyle olan evrimsel ilişkisine bakıldığında fB1-cl18, fB1-cl36, fB1-cl22 ve fB1-cl15'in %100 oranında aynı kümede yer aldıkları görülmektedir. Bu kümedeki BLAST sonuçlarına bakıldığında 4 üyenin de *Nostoc* cinsine dahil olduğu ve bu sonucu desteklediği ortaya çıkmaktadır. Diğer yandan fA1-cl2 ile fA1-cl-6'nın yine %100 oranında aynı kümede yer aldıkları ve *Leptolyngbya* cinsine karşılık gelen BLAST sonucunun da bu durumu desteklediği ortaya çıkmaktadır.

Şekil 3.15.c.'de gösterildiği gibi bor havuzlarından, Porsuk Çayı ve Seydisuyu'ndan alınan su örnekleri ile elde edilmiş olan DGGE bantlarının birbirleri ile olan evrimsel ilişkisine bakıldığında DGGE a ve DGGE b jellerinden elde edilen bantların kendi aralarında küme oluşturdukları görülmektedir. DGGE a30, DGGE a16, DGGE a21 ve DGGE a33 bantlarının %100 oranında aynı küme içerisinde toplandıkları görülmüştür. Bu kümenin BLAST sonucuna bakıldığında *Arthrospira* cinsine karşılık geldiği ve sonucu desteklediği görülmektedir. DGGE a18 ve DGGE a11 batları da yine aynı küme içerisinde toplanmıştır. Bu kümenin de BLAST sonucu *Lyngbya* cinsine karşılık gelmektedir. DGGE a2, DGGE a8 ve DGGE a12 bantlarının da yine aynı şekilde tek bir kümede toplandığı ve BLAST sonucuna göre *Nostoc* cinsine karşılık geldiği görülmektedir. Aynı küme içerisinde dahil olan DGGE a10 ve DGGE a26 bantlarının da BLAST sonucu ile desteklendiği ve *Cyanobacterium* cinsine karşılık geldiği görülmüştür. DGGE a22, DGGE a1, DGGE a3, DGGE a9, DGGE a19, DGGE a25, DGGE a13 ve DGGE a7 ile oluşan kümeye bakıldığında DGGE a22'nin diğer bantlardan ayrıldığı ortaya çıkmaktadır. BLAST sonuçlarına bakıldığında DGGE a1, DGGE a7 ve DGGE a22 bantlarının herhangi bir net BLAST sonucuna karşılık gelmemiştir. Bu belirsiz sonuçların ağaç topolojisini etkilediği ve %27 gibi düşük bir dallanma sonucunun ortaya çıkmasına neden olduğu görülmektedir. DGGE b jeli ile elde edilmiş olan bantların filogenetik ilişkisine bakıldığında DGGE b1, DGGE b2 ve DGGE b7 bantlarının aynı kümede oldukları ve BLAST sonuçlarının kesin bir

cinse karşılık gelmediği, DGGE b12, DGGE b13, DGGE b22, DGGE b23 bantlarının aynı kümede olduğu ve BLAST sonuçlarının *Leptolyngbya* cinsine karşılık geldiği, DGGE b10, DGGE b11 ve DGGE b19 bantlarının da aynı kümede olduğu ve bu kümenin de BLAST sonuçlarının *Microcystis* cinsine karşılık gelmektedir.

Tüm bu sonuçların ortak bir gen havuzunda toplanmasıyla elde edilen filogenetik ağaç Şekil 3.15.d’ de gösterilmiştir. Elde edilen topolojiye bakıldığında bazı dallanmaların oldukça net bir sonuç verdiği fakat bazı dallanmaların da şüpheli olduğu ortaya çıkmıştır. Ağaçtaki alt dallanmaların ana dallara göre daha güvenilir olduğu ortaya çıkmaktadır. Örneğin M107 suşuna ait olan BLAST ile elde edilmiş *Snowella* cinsi, M103 suşuna ait olan BLAST ile elde edilmiş *Synechococcus* cinsi, M65 suşu ile elde edilmiş *Microcoleus* cinsi, DGGE a11 ve DGGE a18 bantlarına ait olan *Lyngbya* BLAST sonucu ve DGGE b19, DGGE b11 ve DGGE b10 bantlarına ait olan *Microcystis* cinsi BLAST sonuçları bu ağaçta %100 oranında doğrulanmıştır. Gen bankasından seçilen en yakın ilişkili suşların yerleştikleri kümelerin ve bu kümelerdeki üyelerin pozisyonu Şekil 3.15.a, Şekil 3.15.b. ve Şekil 3.15.c’ de elde ettiğimiz filogenetik ağaçlar ile desteklenmiştir. Ağacın istatistiksel olarak topolojisi değerlendirildiğinde %50’nin altında “bootstrap” değerleri elde edilmiş olsa da 500 kez örnekleme sonucu elde edilmiş en güvenilir ağacı yansıtmaktadır. Hiçbir cinse karşılık gelmeyen klonlar ve DGGE bantlarının tüm gen havuzu içerisinde yer aldığı düşünüldüğünde bu sonuç olasılık dahilinde kabul edilmektedir. Elde edilen tüm sekans verileri oluşturulan bu filogenetik ağaçtaki dallanmalar *Chroococcales*, *Oscillatoriales* ve *Nostocales* bölümlerine karşılık gelmektedir. DGGE b1, DGGE b2, DGGE b3, DGGE b5, DGGE b6 DGGE b7, fA1 cl-1, fA1 cl-4, fA1 cl-8, fA1 cl-9, fA1 cl-10, fA1 cl-12, fA1 cl-14, fA1 cl-20, fA1 cl-27, fB1 cl-20, fB1 cl-17, fB1 cl-24 üyelerini içeren küme herhangi bir bölüme karşılık gelmemiştir.

Kültüre alma, klonlama ve DGGE ile elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2.’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.2. Porsuk Çayı, Seydisuyu ve bor havuzundan elde edilen kültüre alma, klonlama ve DGGE identifikasyon sonuçları

Örnekleme Bölgesi	Kültürel yöntemler	DGGE	Klonlama
Porsuk Çayı	<i>Synechococcus</i> , <i>Cyanobium</i> , <i>Anabaenopsis</i> , <i>Leptolyngbya</i> , <i>Microcoleus</i> , <i>Pseudanabaena</i> , <i>Synechocystis</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Snowella</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Phormidium</i> ve <i>Limnothrix</i>		
Porsuk 100 no'lu istasyon	<i>Leptolyngbya</i> , <i>Anabaenopsis</i> , <i>Pseudanabaena</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Synechococcus</i>	<i>Arthrospira</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Planktothricoides</i> , <i>Microcystis</i>	
Seydisuyu	<i>Pseudoanabaena</i> , <i>Leptolyngbya</i> , <i>Synechocystis</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Anabaenopsis</i> , <i>Nostoc</i>	<i>Cyanobacterium</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Nostoc</i> ve <i>Phormidium</i>	
1. Bor havuzu	<i>Leptolyngbya</i>	<i>Nostoc</i> , <i>Phormidium</i>	<i>Leptolyngbya</i> , <i>Merismopedia</i> , <i>Nostoc</i>
2. Bor havuzu		<i>Arthrospira</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Planktothricoides</i>	

Tüm bu sonuçlar göz önüne alındığında, bakterilerin taksonomik çalışmaları için kullanılan moleküler metotlardan bazıları Siyanobakteriler için de uygulanmaktadır. Daha önce de belirtildiği gibi son yaklaşımlar DNA-DNA hibridizasyonu, kısa ve uzun ardışık tekrarlayan elementlerin primerleri ile PCR' a dayalı parmak izi analizi ve ITS bölgelerinin amplifiye ribozomal DNA restriksiyon analizleridir. Tartışmalı olan bir soru gen değişimi (lateral gen transferi) nin rolü ve Siyanobakteriyel evrimdeki rekombinasyondur. Diğer önemli sorular, günümüzde bilinen taksaları tespit edecek moleküler çalışmaların ne kadar uzak olduğu ve doğal populasyonlardaki hücreleri hızlı bir şekilde karakterize eden moleküler yaklaşımların ne zaman rutin olarak kullanılabilirdir. Maalesef türler arasındaki benzerlikleri gösteren çeşitli

filogenetik ağaçlar suşların genelinden elde edilen sonuçları değerlendirmekte ve spesifik isimler ise şüpheli bir durumdadır. Bu durum olası evrimsel ilişkileri karşılaştırmak için bu ağaçların değerini sınırlamaktadır (Castenholz 1992; Wilmotte 1994).

16S rDNA yaklaşımının kararlılığı, tek bir tür mü ya da birçok yakın ilişkili tür mü konusundaki soruyu cevaplamak için yetersiz olabilmektedir. 16S rRNA geninin yavaş evrimi, bu moleküler markırın bakteriyel suşların tür seviyesindeki ayrımı için daima elverişli olmadığına işaret etmektedir. 16S rRNA geninin ortalama baz değişiminin 50 milyon yılda %1 olduğu tahmin edilmektedir. rRNA aynı zamanda horizontal gen transferine maruz kalmaktadır. Ayrıca sekans heterojenitesi, tek bir genom içerisindeki rRNA operonlarının çoklu kopyasından dolayıdır ve bu durum özellikle doğal mikrobiyal komünitelerden elde edilen sekans verilerinin yorumlanmasını karmaşık hale getirebilmektedir (Aman ve ark. 1995; Yamamoto ve Harayama 1998).

Son yirmi yılda elde edilen araştırma sonuçları hala oldukça kısmidir fakat birçok önemli sonuç ortaya konulabilmektedir. Direk rDNA sekanslama Bacteria ve Archae domainleri içerisinde keşfedilmemiş büyük bir çeşitliliğe işaret etmektedir. Bu durum mikrobiyologların yeni mikroorganizmaları izole etme, tanımlama ve de filogenisi ve fizyolojisi bakımından karakterize etme bakımından sürekli bir araç sağlamaktadır. rRNA yaklaşımı şimdiye kadar kültüre alınmamış bakterilerin kültüre edilebilmesi bakımından yarar sağlamaktadır ve bu yaklaşımın uygulanabilirliği sürekli olarak gelişmektedir. Ek olarak, bu yaklaşım daha kesin mikrobiyal çeşitliliğin taranmasına izin vererek, biyoteknoloji için ilave genetik potansiyelin elde edilmesine yardımcı olmaktadır. Ekolojiye yönelik olarak mikroorganizmalar kendi ortamlarında çalışılarak daha yenilikçi anlayışlar ortaya konulabilmektedir. Komünite kompozisyonu ve populasyonların fonksiyonu arasındaki karşılıklı ilişki *in situ* olarak belirlenebilmektedir. Bu, sadece simbiyozları anlamak için değil, birçok biyokimyasal döngüyü anlamak için de oldukça önemlidir. *In situ* hibridizasyon tekniklerinin artan şekilde gelişmesi ile düşük kopya sayısındaki nükleik asitlerin belirlenmesi olası olmaktadır. rRNA ve mRNA moleküllerine spesifik problemler populasyonların *in*

situ aktivitelerinin tanımlanmasında bize spesifik bilgiler sağlamaktadır (Aman ve ark. 1995).

Sonuç olarak;

- 1) Bu çalışma Ülkemizde Porsuk Çayı, Seydisuyu ve Kütahya Etibor işletmesinin atık su havuzunda bulunan Siyanobakteriyel çeşitliliği ilk kez ortaya koyan bir çalışma olmuştur. Bu anlamda, elde ettiğimiz sonuçlar belirtilen bu bölgelerdeki Siyanobakteri çalışmaları açısından bir veri oluşturmakta ve bundan sonraki araştırmacılar içinde bir yol gösterici olmaktadır.
- 2) Bu çalışma Porsuk Çayı, Seydisuyu ve Kütahya Etibor işletmesinin atık su havuzundaki morfolojik ve moleküler Siyanobakteriyel çeşitlilik arasında anlamlı bir ilişki olmadığını ortaya koymuştur.
- 3) Porsuk Çayı'nda kültürel yöntemler ile *Synechococcus*, *Cyanobium*, *Anabaenopsis*, *Leptolyngbya*, *Microcoleus*, *Pseudanabaena*, *Synechocystis*, *Oscillatoria*, *Snowella*, *Nostoc*, *Phormidium* ve *Limnothrix* cinslerine ait izolatlar, Seydisuyu'nda *Pseudoanabaena*, *Leptolyngbya*, *Synechocystis*, *Phormidium*, *Anabaenopsis*, *Nostoc* cinslerine ait izolatlar ve Bor havuzunda ise sadece *Leptolyngbya* cinsine ait izolatlar elde edilmiştir. *Leptolyngbya* cinsine ait izolatların üç örnekleme bölgesinden kolayca izole edilebileceği sonucuna varılmıştır.
- 4) Bor havuzundan klonlama yöntemi ile elde edilen identifikasyon sonuçları kültüre alma yöntemi ile karşılaştırıldığında her iki yöntem ile de *Leptolyngbya* cinsine ait olan sonuçlar elde edilmiştir. Bunun dışında klonlama yöntemi ile *Merismopedia*, ve *Nostoc* cinslerine ait identifikasyon sonuçları da elde edilmiştir. Bor havuzundan elde edilen klonların büyük bir kısmında %97'den düşük oranda BLAST benzerlik yüzdeleri elde edilmiştir. Bu sonuçlara dayalı olarak, bor havuzunda yeni Siyanobakteri türlerinin olabileceği sonucuna varılmıştır. Olası yeni türlerin yapılacak olan izolasyon çalışmaları ile elde edilmesi gerektiği ve bu izolatların gen sekanslarının literatüre kazandırılması bakımından önemli olacağı sonucuna varılmıştır.

- 5) Her üç örnekleme bölgesine ait olan sulardaki kimyasal analiz sonuçları ile sahip olunan Siyanobakteriyel çeşitlilik arasında anlamlı bir ilişki sağlanamamıştır. Ancak bor miktarı en yüksek olan bor havuzunda sadece *Leptolynbya* cinsine ait olan izolatların elde edilmiş olması, bu izolatların yüksek bor konsantrasyonuna dirençli oldukları sonucunu ortaya çıkarmış ve sonuç olarak da bu izolatların yüksek konsantrasyondaki bora nasıl direnç gösterdiklerini araştırmak için ön verileri sağlamıştır.
- 6) Siyanobakteriyel çeşitliliği belirlemek amacıyla yapılan kültüre alma çalışmaları yanında, moleküler yöntemler olan DGGE ve klonlama yöntemleri, farklı cinslere ait olan sekansların eldesini sağlamıştır. Bu nedenle gerçek bir çeşitliliği ortaya koymak için kültür temelli çalışmaların yanında moleküler karakterizasyon yöntemlerinin de buna paralel olarak uygulanmasının gerekliliği ortaya çıkmıştır.
- 7) DGGE ve klonlama yöntemi sonucunda bor havuzuna ait olan belirsiz identifikasyon sonuçları elde edilmiştir. Bu sonuçlar bize bor yönünden ekstrem olan bu çevrenin yeni türlere ait olabilecek sekansları içeren Siyanobakterilerin yüksek olasılıkla bu ortamda bulunduğunu ortaya koymuştur.
- 8) Uygulanmış olan DGGE ve klonlama yöntemlerine bakıldığında, tek bir örnekleme bölgesindeki biyoçeşitliliği ortaya koyabilmek için yaklaşık olarak 100 klonun analiz edilmesi gerektiği ortaya çıkmıştır. DGGE yöntemi ise, bir jelde sekiz adet kadar örneğin analizini sağlaması açısından daha kısa sürede sonuç veren bir teknik olarak yorumlanmıştır. Ancak literatürde de belirtildiği gibi klonlama ile daha fazla güvenilir veriler elde edildiği için her iki yöntemin birlikte uygulanmasının gerekliliği ortaya çıkmıştır.

Öneriler ve gelecekte yapılması planlanan çalışmalar:

Bu çalışmada, kültürel yöntemle izole edilmiş olan izolatların 16S rRNA temelindeki restriksiyon profilleri çıkartılmıştır. Bu restriksiyon profillerinin kendimize ait bir veritabanında kaydedilerek bundan sonra yapılacak çalışmalarda öncülük etmesi planlanmaktadır.

DGGE yönteminde kullanılmış olan markır Liege Üniversitesi/Belgium'nin diğer araştırmacılar ile yürütmekte olduğu bir projeden sağlanmıştır. Ancak bundan sonra yapılacak çalışmalarda elde ettiğimiz izolatların 16S rRNA gen bölgesi kullanılarak DGGE markırı hazırlamak planlanmaktadır. En azından çalışmamızdaki örnekleme bölgeleri olan Porsuk Çayı, Seydisuyu ve Bor havuzundaki Siyanobakterileri çalışmak isteyen diğer araştırmacılara ve kendi araştırma laboratuvarımıza bir kaynak sağlayacaktır.

Örnekleme bölgelerinden birisi olan bor havuzunda DGGE ve klonlama yöntemleri sonucunda kesin olarak tanımlanmış ve de tanımlanamayan sekanslar elde edilmiştir. Ancak bu sekanslar kültürel yöntemler ile elde edilemediğinden dolayı, bor içeriği bakımından ekstrem sayılan bu çevreden bu izolatların elde edilebilmesi için uygun besiyeri ve inkübasyon şartlarının sağlanması planlanmaktadır. Böylece eğer yeni türler izole edilebilirse literatüre katkı sağlaması planlanmaktadır.

Ayrıca Siyanobakterilerin özellikle kozmetik alanında oldukça yaygın şekilde kullanılmasından dolayı ileriki çalışmalarımızda elde ettiğimiz izolatların kozmetik endüstrisindeki kullanılabilirliğine yönelik çalışmalar planlanmaktadır.

Bunların dışında, Siyanobakteriyel toksinler günümüzde sağlık açısından büyük önem teşkil etmektedirler. Bu nedenle bundan sonraki çalışmalarda Eskişehir içme ve kullanma suyu olarak kullanılan Porsuk Çayı'ndaki Siyanobakteriyel toksinlerin analizi ve toksin oluşturan türlerin izolasyonuna yönelik çalışmalar da planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abelson, J.N. ve Simon, M.I. (1988), *Methods Enzymol.*, Academic Pres, San Diego, California.
- Acinas, S.G., Klepac-Ceraj, V., Hunt, D.E., Pharino, C., Ceraj, I., Distel, D.L ve Polz, M.F. (2004), “Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community,” *Nature*, **430**, 551-554.
- Amann, R.I., Ludwig, W. ve Schleifer, K.H. (1995), “Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation,” *Microbiol. Rev.*, **59**, 143–169.
- Anagnostidis, K. ve Komarek, J. (1989), “Modern approach to the classification system of the Cyanophytes 3: Oscillatoriales,” *Arch. Hydrobiol/Algological Studies*, **50-53**, 327-472.
- Anonim (2008), *Porsuk Çayı*.
<http://tr.wikipedia.org/wiki/Porsuk>
- Anonim (2007), *T.C. Kütahya Valiliği Çevre Ve Orman Müdürlüğü Çevre Yönetimi Şubesi Porsuk Çayı Özel Hüküm Belirleme Çalışması Kütahya-2007*.
<http://www.kutahya-cevreorman.gov.tr/duyuru/7/7.html>.
- Anonim (2008), *Akarsu ve Barajlar*.
<http://www.eskisehir.gov.tr/akarsuvebarajlar.asp>
- Anonim (2008), *İlçenin Coğrafi Durumu*.
http://www.mahmudiye.gov.tr/m_c_dur.php
- Barber, J. ve Nield, J. (2002), “Organization of transmembrane helices in photosystem II: comparison of plants and cyanobacteria”, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **357**, 1329-1335.
- Bauer, K., Diez, B., Lugomela, C., Sepp, S., A Borg, A.J. ve Bergman, B. (2008), “Variability in benthic diazotrophy and cyanobacterial diversity in a tropical intertidal lagoon” *FEMS Microbiol. Ecol.*, **63**, 205–221.

- Boekema, E.J., Hankamer, B., Bald, D., Kruip, J., Nield, J., Boonstra, A.F., Barber, J. ve Rogner, M. (1995), "Supramolecular structure of the photosystem II complex from green plants and Cyanobacteria" *Cell Biology*, **92**, 175-179.
- Boone, D.R., Castenholz, R.W. ve Garrity, G.M. (eds). (2001), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd. End. Springer. New York.
- Boutte, C., Komarkova, J., Grubisic, S., Znachor, P., Bataille, A., Zapomelova, E., Güllükaya, A., Jezberova, J. ve Wilmotte A. (2005), "A polyphasic approach to assess the cyanobacterial diversity of summer samples from Czech reservoirs," *Algological Studies*, **117**, 177-195.
- Boutte, C., Grubisic, S., Balthasarat, P. ve Wilmotte, A. (2006), "Testing of primers for study of cyanobacterial molecular diversity by DGGE," *J. Microbiol. Methods*, **65**, 542-550.
- Bryant, A.D. (1994), *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Calusinka, M. (2005), *Diversity of mat-forming cyanobacteria from meltwaters on Livingstone Island, Antarctic Peninsula: A molecular and morphological approach*, Master's Thesis, University of Liege, Belgium.
- Campbell, L., Carpenter, E.J. ve Iacono, V.J. (1983), "Identification and enumeration of marine chroococcoid cyanobacteria by immunofluorescence," *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 553-559.
- Carmichael, W.W. (1992), "Cyanobacteria secondary metabolites--the cyanotoxins," *J. Appl. Bacteriol.*, **72(6)**, 445-459.
- Carmichael, W.W. (1994), "Toxins of cyanobacteria," *Scientific American*, **270**, 64-70.
- Case, R.J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W. F. ve Kjelleberg, S. (2007), "Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies," *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 278-288.
- Castenholz, R. W. (2001), "Species usage, concept, and evolution in the cyanobacteria (blue-green algae)," *J. Phycol.*, **28**, 737-745.
- Castiglioni, B., Rizzi, E., Frosini, A., Sivonen, K., Rajaniemi, P., Rantala, A., Mugnai, M.A., Ventura, S., Wilmotte, A., Boutte C., Grubisic, S.,

- Balthasart, P., Consolandi, C., Bordoni, R., Mezzelani, A., Battaglia, C. ve Bellis, G.D. (2004), "Development of a universal microarray based on the ligation detection reaction and 16s rRNA gene polymorphism to target diversity of cyanobacteria," *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 7161-7172.
- Caudales, R. ve Wells, J.M. (1992), "Differentiation of free-living *Anabaena* and *Nostoc* cyanobacteria on the basis of fatty acid composition," *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **42**, 246-251.
- Caudales, R., Wells, J.M. ve Antoine, A.D. (1992), "Cellular fatty acid composition of symbiotic cyanobacteria isolated from the aquatic fern *Azolla*," *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 1489-1494.
- Chorus, I. ve Bartram, J. (1999), *Toxic Cyanobacteria in Water*, Spon Pres, London and New York.
- Çetinkaya-Dönmez, G., Elmacı, Ayşe. ve Obalı, Olcay. (1999), "Isolation and abundance of unicellular cyanobacteria from Mosquito development sites," *Turk. J. Biol.*, **23**, 451-456.
- Dhaulakhandi, D.B., Ahluwalia, K.B., Ravi, A.K. ve Garg, L.C. (2006), "Detection of 16S rRNA gene in round bodies isolated from polyps of rhinosporidiosis," *Infect. Genet. Evol.*, **6**, 331-336.
- Erhard, M., Döhren, H. ve Jungblut, P. (1997), "Rapid typing and elucidation of new secondary metabolites of intact cyanobacteria using MALDI-TOF mass spectrometry," *Nat. Biotechnol.*, **15(9)**, 906-909.
- Falcon, L.I., Cipriano, F., Chistoserdov, A.Y. ve Carpenter, E.J. (2002), "Diversity of diazotrophic unicellular cyanobacteria in the tropical North Atlantic Ocean," *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 5760-5764.
- Ferris, M.J., Muyzer, G. ve Ward, D.M. (1996), "Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community," *Appl. Environ. Microbiol.*, **62(2)**, 340-346.
- Garcia-Pichel, F., Lopez-Cortes, A. ve Nubel, U. (2001), "Phylogenetic and morphological diversity of cyanobacteria in soil desert crusts from the colorado plateau," *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 1902-1910.

- Garcia-Pichel, F., Johnson, S.L., Youngkin, D. ve Belnap, J. (2003), "Small-scale vertical distribution of bacterial biomass and diversity in biological soil crusts from arid lands in the Colorado Plateau," *Microb. Ecol.*, **46**, 312 - 321.
- Gugger, M., Molica, R., Le Bere, B., Dufour, P., Bernard, C. ve Humbert, J.F. (2005), "Genetic diversity of *Cylindrospermopsis* strains (Cyanobacteria) isolated from four continents," *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 1097-1100.
- Hamana, K. ve Matsuzaki, S. (1992), "Polyamines as a chemotaxonomic marker in bacterial systematics," *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, **18**, 261-283.
- Hunter, P.R. (1995a), "Cyanobacterial toxins and their potential risk to drinking water supplies," *Microbiol. Eur.*, **3**, 8-10.
- Hunter, P.R. (1995b), "Cyanobacteria in fresh waters," *Microbiol. Eur.*, **3**, 10-12.
- Ishida, T., Watanabe, M.M., Sugiyama, J. ve Yokota, A. (2001), "Evidence for polyphyletic origin of the members of the orders of Oscillatoriales and Pleurocapsales as determined by 16S rDNA analysis," *FEMS Microbiol. Lett.*, **1**, 79-82.
- Iteman, I., Rippka, R., Tandeau, M. ve Herdman, M. (2002), "rDNA analyses of planktonic heterocystous cyanobacteria, including members of the genera *Anabaenopsis* and *Cyanospira*," *Microbiology*, **148**, 481-496.
- Janse, I., Meima, M., Kardinaal, W.E.A., ve Zwart, G. (2003), "High-resolution differentiation of cyanobacteria by using rRNA-internal transcribed spacer denaturing gradient gel electrophoresis," *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 6634-6643.
- Keleti, G. ve Sykora J.L. (1982), "Production and properties of cyanobacterial endotoxins," *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 104-109.
- Kenyon, C.N. (1972), "Fatty acid composition of unicellular strains of blue-green algae," *J. Bacteriol.*, **109**, 827-834.
- Kenyon, C.N., Rippka, R. ve Stainer, R.Y. (1972), "Fatty acid composition and physiological properties of some filamentous blue-green algae," *Arch. Mikrobiol.*, **83**, 216-236.

- Kolmonen, E., Sivonen, K., Rapala, J. ve Haukka, K. (2004), "Diversity of cyanobacteria and heterotrophic bacteria in cyanobacterial blooms in Lake Joutikas, Finland," *Aquat. Microb. Ecol.*, **36**, 201–211.
- Kondo, R., Yoshida, T., Yuki, Y. ve Hiroishi, S. (2000), "DNA–DNA reassociation among a bloomforming cyanobacterial genus, *Microcystis*," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 767–770.
- Lindblad, P., Haselkorn, R., Bergman, B. Ve Nierzwicki-Bauer, S.A. (1989), "Comparision of DNA restriction fragment length polymorphisms of Nostoc strains in and from cycads," *Arch. Microbiol.*, **152**, 20-24.
- Lyautey, E., Lacoste, B., Ten-Hage, L., Luc Rols, J. ve Garabetian, F. (2005), "Analysis of bacterial diversity in river biofilms using 16 S rDNA PCR-DGGE: methodological settings and fingerprints interpretation," *Water Res.*, **39**, 380–388.
- Lyra, C., Hantula, J., Vainio, E., Rapala, J., Rouhiainen, L. ve Sivonen, K. (1997), "Characterization of Cyanobacteria by SDS-PAGE of whole-cell proteins and PCR/RFLP of the 16S rRNA gene," *Arch. Microbiol.*, **168**, 176-184.
- Lyra, C., Suomalainen, S., Gugger, M., Vezie, C., Sundman, P., Paulin, L. ve Sivonen, K. (2001), "Molecular characterization of planktic cyanobacteria of *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* and *Planktothrix* genera", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 513–526.
- Ma, Y., Jiao, N.Z. ve Zeng, Y.H. (2004), "Natural community structure of cyanobacteria in the South China Sea as revealed by rpoC1 gene sequence analysis," *Lett. Appl. Microbiol.*, **39**, 353-358.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. ve Parker, J. (2003), *Brock Biology of Microorganisms*, 10th ed., Prentice Hall/Pearson Education.
- Margheri, M.C., Bosco, M., Giovannetti, L. ve Ventura, S. (1999), "Assessment of the genetic diversity of halotolerant coccoid cyanobacteria using amplified 16S rDNA restriction analysis," *FEMS Microbiol. Lett.*, **173**, 9-16.
- Marquardt, J. ve Palinska, K.A. (2007) "Genotypic and phenotypic diversity of cyanobacteria assigned to the genus Phormidium (Oscillatoriales) from different habitats and geographical sites," *Arch. Microbiol.*, **187**, 397-413.

- Matsunaga, T., Nakayama, H., Okochi, M. ve Takeyama, H. (2000), "Fluorescent detection of cyanobacterial DNA using bacterial magnetic particles on a MAG-Microarray," *Biotechnol. Bioeng.*, **73(5)**, 400-405.
- Murray, R.G.E., Brenner, D.J., Colwell, R.R., De Vos, P., Goodfellow, M., Grimont, P.A.D., Pfennig, N., Stackebrandt, E. ve Zavarzin, G.A. (1990), "Report of the ad hoc committee on approaches to taxonomy within the proteobacteria," *Int. J. Syst Bacteriol.*, **40**, 213-215.
- Muyzer, G. (1999), "DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems," *Curr. Opin. Microbiol.*, **2**, 317-322.
- Myers, M.R., Fischer, S.G., Lerman, L.S. ve Maniatis, M. (1985), "Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis," *Nucleic Acids Res.*, **13**, 3131-3145.
- 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., Burns, B.P., Relman, D.A. ve Lowe, D.R. (2002), "Molecular identification of cyanobacteria associated with stromatolites from distinct geographical locations," *Astrobiology*, **2(3)**, 271-280.
- Nollau, P. ve Wagener, C. (1997), "Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment," *Clin. Chem.*, **43(7)**, 1114-1128.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F. ve Muyzer, G. (1997), "PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria," *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 3327-3332.
- Nübel, U., Bateson, M.M., Vandieken, V., Wieland, A., Kuhl, M. ve Ward, D.M. (2002), "Microscopic examination of distribution and phenotypic properties of phylogenetically diverse *chloroflexaceae*-related bacteria in hot spring microbial mats," *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 4593-4603.
- Paulsrud, P., Rikkinen, J. ve Lindblad, P. (1998), "Cyanobiont specificity in some *Nostoc* containing lichens and in a *Peltigera aphthosa* photosymbiodeme" *New Phytol.*, **139**, 517-524.

- Pearl, F.M., Lee, D., Bray, J.E., Sillitoe, I., Todd, A.E., Harrison, A.P., Thornton, J. M. ve Orenco, C.A. (2000), "Assigning genomic sequences to CATH," *Nucl. Acid Res.*, **28**, 277-282.
- Peschek, A.G., Löffelhardt, W. ve Schmetterer, G. (1999), *The Phototrophic Prokaryotes*, Kluwer Academic Publishers, United States of America.
- Rai, N.A., Bergman, B. ve Rasmussen, U. (2002), *Cyanobacteria in Symbiosis*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Reyes-Prieto, A. ve Bhattacharya, D. (2007), "Phylogeny of nuclear-encoded plastid-targeted proteins supports an early divergence of glaucophytes within plantae," *Mol. Biol. Evol.*, **24(11)**, 2358–2361.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F ve Maniatis, T. (1989), *Molecular cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sallal, A.K., Nimer, N.A. ve Radwan, S.S. (1990), "Lipid and fatty acid composition of freshwater cyanobacteria," *J. Gen. Microbiol.*, **136**, 2043-2048.
- Schopf, J.W. ve Walter, M.R. (1982), *The Biology of Cyanobacteria*, Blackwell, Oxford, and University of California Press, Berkeley.
- Sjoling, S. ve Cowan, D.A. (2003), "High 16S rDNA bacterial diversity in glacial meltwater lake sediment, Bratina Island, Antarctica," *Extremophiles*, **7**, 275-282.
- Sheffield, V.C., Coxt, D.R., Lerman, L.S. ve Myers, R.M. (1989), "Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **86**, 232-236.
- Song, T., Martensson, L., Eriksson, T., Zheng, W. ve Rasmussen, U. (2005), "Biodiversity and seasonal variation of the cyanobacterial assemblage in a rice paddy field in Fujian, China," *FEMS Microbiol. Ecol.*, **54**, 131–140.
- Stanier, R. Y., Siström, W. R., Hansen, T. A., Whitton, B.A., Castenholz, R.W., Pfennig, N., Gorlenko, V.N., Kondratieva, E.N., Eimhjellen, K.E., Whittenbury, R., Gherna, R.L. ve Trüper, H.G. (1978), "Proposal to place the nomenclature of the cyanobacteria (blue-green algae) under the rules

- of the International Code of Nomenclature of Bacteria,” *Int. Syst. Bacteriol.*, **28**, 335-336.
- Steindler, L., Huchon, D., Avni, A. ve Ilan, M. (2005), “16S rRNA phylogeny of sponge-associated cyanobacteria,” *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 4127–4131.
- Suzuki, M.T., Beja, O., Taylor, L.T. ve DeLong, E.F. (2001), “Phlogenetic analysis of ribosomal RNA operons from uncultivated coastal marine bacterioplankton,” *Environ. Microbiol.*, **3(5)**, 323-331.
- Taton, A., Grubisic, S., Brambilla, E., De Wit, R. ve Wilmotte, A. (2003), “Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of lake fryxell (mcmurdo dry valleys, antarctica): a morphological and molecular approach,” *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 5157–5169.
- Taton, A., Grubisic, S., Ertz, D., Hodgson, D.A., Piccardi, R., Biondi, N. ve Tredici, M.R. (2006), “Polyphasic study of Antarctic cyanobacterial strains,” *J. Phycol.*, **42**, 1257–1270.
- Thajuddin, N. ve Subramanian, G. (2005), “Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology,” *Curr. Sci.*, **89(1)**, 47-57.
- Tsygankov, A.A. (2007), “Nitrogen-fixing cyanobacteria: a review,” *Appl. Biochem. Microbiol.*, **43(3)**, 250–259.
- Utkilen, H. ve Gjörlme, 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.
- Uygan, D. ve Çetin, Ö. (2004), “Bor'un tarımsal ve çevresel etkileri: Seydisuyu su toplama havzası,” *2.Uluslararası Bor Sempozyumu*, 527-540.
- Yeager, C.M., Kornosky, J.L., Morgan, R.E., Cain, E.C., Garcia-Pichel, F., Housman, D.C., Belnap, J. ve Kuske, C.R. (2007), “Three distinct clades of cultured heterocystous cyanobacteria constitute the dominant N₂-fixing members of biological soil crusts of the Colorado Plateau, USA,” *FEMS Microbiol. Ecol.*, **60**, 85–97.
- Ward, D.M., Weller, R ve Bateson, M.M. (1990), “16S rRNA sequences reveal uncultured inhabitants of a well-studied thermal community,” *FEMS Microbiol. Rev.*, **75**, 105-116.

- Ward, D.M., Bateson, M.M., Ferris, M.J., Kühl, M., Wieland, A., Koeppel, A. ve Cohan, F.M. (2006), "Cyanobacterial ecotypes in the microbial mat community of Mushroom Spring (Yellowstone National Park, Wyoming) as species-like units linking microbial community composition, structure and function," *Phil. Trans. R. Soc. B.*, **361**, 1997-2008.
- Wayne, L.G., Brenner, D.j., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Star, M.P. ve Trüper, H.G. (1987), "Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics," *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **37**, 463-464.
- West, N.J., Schonhuber, W.A., Fuller, N.J., Aman, R.I., Rippka, R., Post, A.F. ve Scanlan, D.J. (2001), "Closely related *Prochlorococcus* genotypes show remarkably different depth distributions in two oceanic regions as revealed by in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides," *Microbiology*, **147**, 1731–1744.
- Whitton, A. ve Potts, M. (2000), *The Ecology of Cyanobacteria*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Willame, R., Komarek, J. ve Hoffman, L. (2006), "Morphological and molecular characterization of planktonic cyanobacteria from Belgium and Luxembourg," *J. Phycol.*, **42**, 1312–1332.
- Wilmotte, A., Neefs, J.M. ve De Wachter, R. (1994), "Evolutionary affiliation of the marine nitrogen-fixing cyanobacterium *Trichodesmium* sp. strain NIBB 1067, derived by 16S ribosomal RNA sequence analysis," *Microbiology*, **140**, 2159-2164.
- Yamamoto, S. ve Harayama, S. (1995), "PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* gene with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains," *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 1104–1109.
- Yamamoto, S. ve Harayama, S. (1998), "Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16SrRNA genes," *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **48**, 813–819.

Yu, Z. ve Morrison, M. (2004), "Comparison of different hypervariable regions of *rrs* genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis," *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 4800-4806.