

Bazı Mavi-Yeşil Alglerin (Cyanophyta-Cyanobacteria) Poli-β-hidroksibütirat (PHB) Üretimi ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi

M. Akbar Yoldaş¹, Hikmet Katırcıoğlu², Yavuz Beyatlı³

¹ Balkh Üniversitesi, Mazar-ı Sharif, Afganistan

² Gazi Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı, 06500, Beşevler, Ankara

³ Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 06500, Beşevler, Ankara

Abstract: *Study on poli-β-hydroxybutrate (PHB) production and antimicrobial activities of some blue-green algae (Cyanophyta-Cyanobacteria).* Microorganisms have very important role among the natural springs that people use. On this point, photosentetic, gram negative blue-green algae has a significant role. PHB is known as bioplastic polymer and there is limited knowledge about the accumulation of these granules by Cyanobacteria as a source of carbon and energy. Meanwhile, blue-green algae is active as antibiotic, algisit, pharmacologic and consists of elements which balance the plants growth. On this study, PHB production and antimicrobial activity of 6 different strains of *Synechocystis* sp. were tested. Three different medium were used in the studing of PHB production by Cyanobacteria (BG11, Ashbey's and Beggiaotoa). A spectrophotometric method was used for determining PHB production by the strains. PHB production of the strains according to the cell dry weight were found 13.6-38.8% in BG11, 0.7-50.6% in Ashbey's and 3.8-77.5% in Beggiaotoa medium. Agar diffusion method was used for studing antimicrobial activities of Cyanobacteria strains on 16 different tested bacteria. Only, *Synechocystis* sp. B6 strain has been shown the antimicrobial activity on *Micrococcus flavus* and *Proteus vulgaris*. The inhibition zones were 0.36 mm. and 0.35 mm. respectively. None other cultures have been shown any antimicrobial activities on tested bacteria.

Key Words: Bottom trawl, beach-seine, catch composition, Izmir Bay.

Özet: İnsanların kendi yararlarına kullanmaya başladığı doğal kaynaklar arasında mikroorganizmaların çok önemli bir yeri vardır. Fotosentetik, gram negatif mavi-yeşil alglerde bu doğrultuda önemli role sahiptir. PHB'nin biyoplastik polimeri olarak önemi bilinmekte olup, karbon ve enerji kaynağı olarak bu granüllerin Cyanobacteria'da birikimi hakkında sınırlı bilgi mevcuttur. Aynı zamanda mavi-yeşil alglerin antibiyotik, algisit, farmasötik olarak aktif ve bitkilerin büyümelerini düzenleyici maddeler sentezlediği bilinmektedir. Bu çalışmada *Synechocystis* sp.'nin 6 farklı suşunun PHB üretim yeteneği ve antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Suşların PHB üretimlerinin belirlenmesinde üç farklı besiortamı kullanılmıştır (BG11, Ashbey's ve Beggiaotoa). Suşların PHB üretimleri spektrofotometrik yöntemle belirlenmiş ve PHB üretim miktarları hücre kuru ağırlığına göre BG11 besiortamında %13.6-38.8, Ashbey's besiortamında %0.7-50.6 ve Beggiaotoa besiortamında %3.8-77.5 olarak bulunmuştur. Suşların antimikrobiyal aktiviteleri 16 farklı test bakterisi üzerinde denenmiştir. Antimikrobiyal aktivite tespitinde agar diffüzyon metodu kullanılmıştır. Yalnız *Synechocystis* sp. B6 suşunda *Micrococcus flavus* (0.36 mm. zon çapı) ve *Proteus vulgaris* (0.35 mm. zon çapı)'e karşı antimikrobiyal etki tespit edilmiştir. Diğer suşların test edilen bakterilere karşı antimikrobiyal etkisinin olmadığı saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Cyanobacteria, Poli-β-hidroksibütirat, Antimikrobiyal aktivite.

Giriş

Bugüne kadar çeşitli araştırmacılar tarafından

değişik adlarla anılan Cyanobacteria, Archaeobacteria ile birlikte prokaryotları oluşturan Eubacteria grubuna bağlıdır.

Önceleri mavi-yeşil algler, mavi-yeşil bakteriler ve Cyanophyta olarak isimlendirilen bu canlılar için son yıllarda Cyanobacteria adı önerilmiştir. Son yıllarda ise Cyanophyta ile Cyanobacteria bu mikroorganizmalar için eş anlamlı isimler olarak kullanılmaktadır (Van den Hoek, 1995).

Cyanobacteria insanlar ve hayvanlar için protein, karbonhidrat, lipit, vitamin, enzim ve diğer biyoaktif bileşikleri açısından çok önemlidir (Pinotti ve Segato, 1991). Ancak lipit rezervleri ile ilgili sınırlı bilgi mevcuttur. Nitekim, bakterilere özgü polimer poli-β-hidroksibütirat çok az sayıdaki Cyanobacteria türlerinde belirlenmiştir. Ancak genel itibarıyla Cyanobacteria'nın bu tür polimerleri sentezleyebilme kabiliyetinde olduğu saptanmıştır (Allen, 1984; Philippis ve diğ., 1992).

Cyanobacteria antibiyotikler, algisitler, toksinler, farmasötik olarak aktif bileşikler ve bitki gelişimi düzenleyici gibi biyolojik aktiviteye sahip birçok bileşik içerir (Metting, 1986). 1970'li yıllardan başlayan incelemelerin sonucu bunların antineoplastik, antimikrobiyal ve antiviral aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Patterson ve diğ. 1994). Bu çalışmada *Synechocystis* sp.'nin 6 farklı suşunun farklı besiortamlarında PHB üretim yeteneği ve BG11 besiortamında antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi'nden temin edilen *Synechocystis* sp. suşlarının üretim ve muhafazası BG11 besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Kültürler 2000 lüks fleuresan lambalar kullanılarak 18 gün oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Kültürler +4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir (Rippka, 1988).

Suşların PHB üretimleri Ashbey's, Beggiatoa ve BG11 besiortamlarında incelenmiştir. Aktif kültürler 100 ml

besiortamına %2 oranında inoküle edilerek 18 gün oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, örnekler santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra kurutulmuş ve kuru ağırlıkları tespit edilmiştir. Elde edilen peletler 5 ml distile suyla karıştırılıp 10 dk sonikasyona tabi tutulmuştur. Sonike edilen örneklerden 2 ml alınarak üzerine 2 ml 2 N HCl ilave edilerek 100°C su banyosunda 2 saat bekletilmiştir. Örnekler 6000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatant ortamtan uzaklaştırılmıştır. Üzerlerine 5 ml kloroform ilave edilmiş, 28°C'de bir gece bekletilmiştir. Örnekler 30 dk santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatandan 2 ml alınarak su banyosunda kloroformun uçurulması sağlanmıştır. Örnekler üzerine 5 ml sülfirik asit ilave edilerek 20 dk su banyosunda bekletildikten sonra 235 nm UV spektrofotometrede OD değerleri ölçülmüştür (Bonertseva ve Myschkina, 1989).

Cyanobacteria suşlarının PHB verimi ile hücre kuru ağırlığı arasındaki ilişki Spermann'ın korelasyon testine göre eşitlik 1 kullanılarak tespit edilmiştir (Conver, 1971).

$$P=1-[6\Sigma(x_1-y_1)^2 / n(n^2-1)] \quad (1)$$

Cyanobacteria'nın patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitesini belirlemek amacıyla agar diffüzyon metodu kullanılmıştır (Reinhammer ve diğ., 1990). Bu yöntemde göre agar plakların üzerine kuyu (6 mm çap) açılarak aktif kültürlerden direkt olarak sulu ekstraktlardan 100 µl inoküle edilmiştir. Test bakterisi olarak *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* F₂, *Micrococcus flavus*, *Yersinia enterocolitica* ATCC-1501, *Escherichia coli* B704, *Micrococcus luteus* NRLL-4375, *Bacillus subtilis* F₁, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* ve *Proteus vulgaris* kullanılmıştır. Test bakterilerinin aktif kültürlerinden petrilere de 100 µl inoküle edilmiştir.

Bulgular

Suşların PHB üretim yetenekleri üç farklı besiortamında denenmiş olup, üretim miktarları Tablo 1, 2 ve 3'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, BG11 besiortamında en yüksek verim *Synechocystis* sp. D31'de %38.88, Ashbey's besiortamında en yüksek PHB verimi

Synechocystis sp. 1.11'de %50.63 ve Beggiatoa besiortamında en yüksek verim *Synechocystis* sp. 1.11'de %77.50 olarak bulunmuştur.

Tüm kullanılan besiortamları, *Synechocystis* sp. suşlarının PHB üretimleri açısından değerlendirildiğinde Beggiatoa besiyerinin bu suşlarda PHB üretimi için daha uygun olduğu görülmüştür (Tablo 4).

Tablo 1. *Synechocystis* sp'nin BG11 besiortamında PHB üretimi.

| Suşlar | Hücre kuru ağırlığı (g l ⁻¹) | PHB (g l ⁻¹) | %PHB |
|-------------------------------|--|--------------------------|-------|
| <i>Synechocystis</i> sp. D31 | 0.585 ± 0.130 | 0.227 ± 0.105 | 38.88 |
| <i>Synechocystis</i> sp. 4.8 | 0.575 ± 0.130 | 0.133 ± 0.109 | 23.22 |
| <i>Synechocystis</i> sp. C21 | 0.360 ± 0.180 | 0.085 ± 0.043 | 23.75 |
| <i>Synechocystis</i> sp. B6 | 0.515 ± 0.350 | 0.107 ± 0.008 | 20.77 |
| <i>Synechocystis</i> sp. 1.11 | 0.525 ± 0.050 | 0.071 ± 0.103 | 13.62 |
| <i>Synechocystis</i> sp. 2A5 | 0.490 ± 0.020 | 0.088 ± 0.001 | 18.06 |

Tablo 2. *Synechocystis* sp'nin Ashbey's besiyerindeki PHB üretimi.

| Suşlar | Kuru hücre ağırlığı (g l ⁻¹) | PHB (g l ⁻¹) | %PHB |
|-------------------------------|--|--------------------------|-------|
| <i>Synechocystis</i> sp. D31 | 0.505 ± 0.670 | 0.032 ± 0.017 | 6.44 |
| <i>Synechocystis</i> sp. 4.8 | 0.080 ± 0.010 | 0.019 ± 0.030 | 23.78 |
| <i>Synechocystis</i> sp. C21 | 0.255 ± 0.050 | 0.002 ± 0.004 | 0.72 |
| <i>Synechocystis</i> sp. B6 | 0.205 ± 0.010 | 0.023 ± 0.027 | 6.68 |
| <i>Synechocystis</i> sp. 1.11 | 0.160 ± 0.000 | 0.081 ± 0.000 | 50.63 |
| <i>Synechocystis</i> sp. 2A5 | 0.180 ± 0.080 | 0.030 ± 0.004 | 16.66 |

Tablo 3. *Synechocystis* sp. kültürlerinin Beggiatoa besiortamında PHB üretimleri.

| Suşlar | Hücre kuru ağırlığı (g l ⁻¹) | PHB (g l ⁻¹) | % PHB |
|-------------------------------|--|--------------------------|-------|
| <i>Synechocystis</i> sp. D31 | 0.535 ± 0.730 | 0.061 ± 0.100 | 11.40 |
| <i>Synechocystis</i> sp. 4.8 | 0.810 ± 0.000 | 0.0310 ± 0.000 | 3.83 |
| <i>Synechocystis</i> sp. C21 | 0.400 ± 0.680 | 0.034 ± 0.002 | 8.47 |
| <i>Synechocystis</i> sp. B6 | 0.045 ± 0.010 | 0.025 ± 0.000 | 55.55 |
| <i>Synechocystis</i> sp. 1.11 | 0.040 ± 0.000 | 0.031 ± 0.000 | 77.50 |
| <i>Synechocystis</i> sp. 2A5 | 0.045 ± 0.030 | 0.013 ± 0.016 | 28.88 |

Tablo 4. *Synechocystis* sp. suşlarının üç farklı besiortamında ortalama PHB üretimleri.

| Besiyerleri | %PHB | PHB (g l ⁻¹) | Hücre kuru ağırlığı (g l ⁻¹) |
|-------------|-------|--------------------------|--|
| BG 11 | 23.05 | 0.1189 ± 0.0615 | 0.5083 ± 0.1433 |
| Ashbey's | 17.49 | 0.0296 ± 0.0136 | 0.2308 ± 0.1366 |
| Beggiatoa | 30.94 | 0.0325 ± 0.0196 | 0.3125 ± 0.2416 |

Suşların PHB üretimleri ile hücre kuru ağırlığı arasındaki ilişki test edilmiştir. Korelasyon testinden elde edilen değerler <0.77 bulunmuş ve hücre kuru ağırlığı ile PHB arasındaki ilişkinin önemli olmadığı belirlenmiştir.

Synechocystis sp. suşlarının test bakterileri üzerindeki inhibisyon etkileri

Tablo 5’de gösterilmiştir. Suşlardan yalnız *Synechocystis* sp. B6 suşunun *M. flavus* üzerinde 0.36 mm, *P. vulgaris* üzerinde 0.35 mm çapında inhibisyon zonu göstermiştir. Diğer suşların denenen tüm test bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitelelerinin olmadığı bulunmuştur.

Tablo 5. *Synechocystis* sp. suşlarının test bakterilerine karşı antimikrobiyal aktiviteleleri.

| Test Bakterileri | Antimikrobiyal aktivitel (zon çapı, mm) | | | | | | |
|------------------------------------|---|-----|------|------|------|-----|----|
| | D 31 | 4.8 | C 21 | B6 | 1.11 | 2A5 | C5 |
| <i>B. cereus</i> F2 | İY | İY | İY | İY | İY | İY | İY |
| <i>B. subtilis</i> F1 | İY | İY | İY | İY | İY | İY | İY |
| <i>E. coli</i> B.704 NRRL | İY | İY | İY | İY | İY | İY | İY |
| <i>M. luteus</i> NRRL-4375 | İY | İY | İY | İY | İY | İY | İY |
| <i>M. flavus</i> | İY | İY | İY | 0.36 | İY | İY | İY |
| <i>P. vulgaris</i> | İY | İY | İY | 0.35 | İY | İY | İY |
| <i>P. aeruginosa</i> | İY | İY | İY | İY | İY | İY | İY |
| <i>P. fluorescens</i> | İY | İY | İY | İY | İY | İY | İY |
| <i>S. aureus</i> | İY | İY | İY | İY | İY | İY | İY |
| <i>Y. enterocolitica</i> ATCC 1501 | İY | İY | İY | İY | İY | İY | İY |

İY : Inhibisyon yok

Tartışma ve Sonuç

Cyanobacteria’nın karbon depo bileşiği olarak PHB ve glikojen depo ettiği bilinmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda yüksek PHB üretimi *Synechococcus* sp. MA19’da (hücre kuru ağırlığının %20’sinden fazla) bulunmuştur. Rekombinant suşlarda bu değer daha da yüksek tespit edilmiştir. Ayrıca PHB üretimini ışık miktarı, azot eksikliği ve birçok faktörlerin etkilediği bildirilmiştir (Miyake ve diğ., 1996; Miyake ve diğ., 1997; Takahashi ve diğ., 1998; de Philippis ve diğ., 1992; Dönmez ve diğ., 1999).

Buna göre, BG11 (D31’de %38.88), Ashbey’s (1.11’de %50.63) ve Beggiatoa (1.11’de %77.50) besiyortamlarında *Synechocystis* sp. suşlarının PHB üretiminin yüksek olması dikkat çekicidir. Korelasyon testine göre de, hücre kuru ağırlığı ile PHB arasında bir ilişkinin olmadığı belirlenmiştir.

Son yıllarda antibiyotik ve farmasotik olarak aktif bileşiklerin eldesi açısından

Cyanobacteria gittikçe artan araştırma konularını oluşturmuştur. Nitekim bu bakterilerden pek çok yeni yapılar sahip antibiyotik bileşiklerin izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Bazı araştırmacılar, Cyanobacteria üyelerinden *Nostoc* (Knübel ve diğ., 1990; Bloor ve Englan, 1991), *Scytonema* (Chetsumon ve diğ., 1994), *Microcystis* (Ishada ve diğ., 1997), *Oscillatoria* (Bagchi ve diğ., 1990) ve *Phormidium* (Fish ve Codd, 1994)’un antimikrobiyal aktivitelelerini incelemişler, çeşitli patojenlere karşı inhibe edici etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda sadece *Synechocystis* sp. B6 suşu *M. flavus* ve *P. vulgaris* üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

Kaynakça

- Allen, M. M. 1984. Cyanobacterial cell inclusions. Ann. Rev. Microbiol., 38:1-25.
 Bagchi, S. N., Palod, A. and Chauhan, V. S. 1990. Algicidal properties of a bloom-

- forming blue-green algae, *Oscillatoria* sp. J. Basic Microbiol., 30(1):21-29.
- Bloor, S. and Englan, R.R. 1991. Elucidation and optimization of the medium constituents controlling antibiotic production by the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. Enzym. Microbiol. Technol., 13(1):76-81.
- Bonartseva, G. A. and Myshkina, V.I. 1989. Fluorescence intensity of nodule bacteria (R. meliloti, R. phaseoli) differing in activity, grown in the presence of the lipophilic vital stain phasphine 3R. Microbiol.,54(4):535-541.
- Chetsumon, A., Maeda, I., Umeda, F., Yagi, k., Mura, Y. and Mizoguchi, T. 1994. Antibiotic production by the immobilized cyanobacterium, *Scytonema* sp. TİSTR 8208, in a seaweed-type photobioreactor. J. Appl. Phycol., 6, 539-543.
- Conver, W.J. 1971. Practical Nonparametric Statics. p. 244-248, John Wiley and Sons., New York.
- Dönmez, G.Ç., Aslım, B. and Beyatlı, Y. 1999. Production of poly-β-hydroxybutrate (PHB) by photosynthetic bacteria, (in turkish). G.Ü. Fen Bil. Enst. Dergisi, 12(3):605-611
- Fish, S. A. and Codd, G. A. 1994. Bioactive compound production by thermophilic and thermotolerant Cyanobacteria. W. J. Microbiol. Technol., 10(3), 338-341.
- Ishada, K., Matsuda, H., Murakami, M. and Yamaguchi, K. 1997. Kawaguchipeptin B, an antibacterial cyclic undecapeptide from the cyanobacterium *M. Aeruginosa*. J. Nat. Prod., 60:724-726.
- Knübel, G., Larsen, L. K., Moore, R. E., Levine, I. A. and Patterson G. M. L. 1990. Cytotoxic, antiviral indolocarbazoles from a blue green algae belonging to the *Nostocaceae*. J. Antibiotics, 10:1236-1239.
- Metting, B. 1986. Biologically active compounds from microalgae. Enzyme Microb. Technol., 8:386-394.
- Miyake, M., Erata, M. and Asada, Y. 1996. A thermophilic Cyanobacterium *Synechococcus* sp. MA19, capable of accumulating PHB. J. Ferment. and Biotech., 82(5):512-514.
- Miyake, M., Kataoka, K., Shirai, M. and Asada, Y. 1997. Control of PHB synthase mediated by acetyle phosphate in cyanobacteria. J. Bacteriol., 179(16):5009-5013.
- Patterson, G.M.L., Larsen, L.K. and Moore, R.E. 1994. Bioactive natural products from blue-green algae, J. Phycol., 29(39):14.
- Philippis, R.D., Ena, A., Guastini, M., Sili, G. and Vincenzini, M. 1992. Factores affecting PHB accumulation in cyanobacteria and purple non-sulfur bacteria. FEMS Microb. Rev., 103:187-194.
- Pinotti, M.H. P. and Segato, R. 1991. Economic importance of Cyanobacteria. Semina Londrina, 12(4), 179-211.
- Reinheimer, J.A., Demkow, M.R. and Codioti, M.C. 1990. Inhibition of coliform bacteria by lactic cultures. The Aust. J. Dairy Technol., 5-9.
- Rippka, R. 1988. Isolation and purification of cyanobacteria. Methods Enzimology, 167:3-27.
- Takahashi, H., Miyake, M., Tokiwa, Y. and Asada, Y. 1998. Improved accumulations of PHB by a recombinant Cyanobacterium. Biotech. Letters, 20(2):182-186.
- Van den Hoek, C., Mann, D.G. and Jahns, H.M., 1995. Algae, An introduction to phycology. Cambridge Un. UK.