

İzmir İlinde Bulunan Termal Sularda Gelişen Bazı Termofilik Mavi-Yeşil Alglerin (Siyanobakterilerin) İzolasyonu ve Moleküler Tayini

Kerem Yüksel¹, Zeliha Demirel¹, Ali Koçyiğit², *Atakan Sukatar¹

¹Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Hidrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

²Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

*E mail: atakan.sukatar@ege.edu.tr

Abstract: Isolation and molecular determination of blue-green algae (Cyanobacteria) which grow in thermal waters in Izmir. The aim is the isolation and identification of blue-green algae (cyanobacteria) obtained from thermal waters of Izmir and around by using molecular methods in laboratory. The four types of blue-green algae (cyanobacteria) were collected from 3 centers which are Zeytin dalı kaplıcaları, Şifne Termal Otel ve Balçova Termal Otel. The obtained four types of blue green algae (cyanobacteria) are isolated by purifying in culture medium at laboratory. Then DNA from the cells is isolated and amplified by PCR. Afterwards using the primers that are specific for blue green algae (cyanobacteria), 16S rRNA gene spaces are amplified by PCR and the resulting sequence was analyzed filogenetically in order to determine the species. According sequence analysis, three of the species was *Geitlerinema* sp. and the other one species is uncultured.

Key Words: Termophilic blue-green algae, DNA isolation, PCR, 16S rRNA, *Geitlerinema* sp.

Özet: İzmir ili ve çevresindeki termal tesislerden elde edilen mavi-yeşil algler (siyanobakteriler) laboratuvar ortamında izole edilip, moleküler yöntemlerle tür tayini çalışılmıştır. Zeytin dalı kaplıcaları, Şifne Termal Otel ve Balçova Termal Otel olmak üzere 3 istasyondan elde edilen 4 mavi-yeşil alg (siyanobakteri) türü, laboratuvar ortamında saflaştırılarak izole edilmişlerdir. Daha sonra elde edilen hücrelerden, DNA izolasyonu sonucu elde edilen DNA'lar PCR'da çoğaltılmıştır. Siyanobakterilere özgü primerler kullanılarak 16S rRNA gen bölgeleri tekrar PCR'da çoğaltılarak elde edilen dizi analizi verileri bilgisayar programlarında yorumlanarak filogenetik bakımdan tür tayini yapılmaya çalışılmıştır. Dizi analizlerine göre yapılan tür tayini doğrultusunda, örneklerden üçünün *Geitlerinema* cinsi olduğu diğer 1 türün ise kültürü belirlenmemiş tür olduğu belirtilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Termofilik mavi-yeşil algler, DNA izolasyonu, PCR, 16S rRNA, *Geitlerinema* sp.

Giriş

Mavi-yeşil alglerin erken Prekambriyen dönemde geliştiği ve ilk olarak atmosferik oksijenin artışından sorumlu olduğu var sayılmaktadır (Castenholz, 1969). Mavi-yeşil algler geniş ekolojik dağılıma sahip önemli primer üretici organizmalardır. Okyanus alanlarından, ılıman topraklara, tatlı su göllerine, hatta olağan dışı habitatlarda dahi (kurak çöller, soğuk göller, sıcak kaynaklar) bulunabilmektedirler (Herrero ve diğ., 2001, Stewart 1973, Mackay ve diğ., 1983).

Mavi-yeşil algler fototrofik prokaryotik canlılardır. Yüksek bitkilerdeki gibi birbirine bağlı Fotosistem I ve Fotosistem II'yi kullanarak oksijenli fotosentez yapan tek prokaryotik canlı grubudur. Çok sayıda türü bilinmektedir ve her bir türün morfolojisi diğer türlerden oldukça farklılık gösterir (Castenholz ve Waterbury, 1989).

Mavi-yeşil algler, 1969 yılında Whittaker tarafından yapılmış olan beşli alem sisteminde ilk basamağı oluşturan Monera alemi içinde incelenmektedir. Canlılar dünyasında hücre özelliklerine, morfolojik görünüşlerine göre yapılan sınıflandırmada mavi-yeşil alg üyeleri ve bakteriler prokaryotik organizmalar olarak ele alınarak aynı alem içinde incelenmektedir. Son zamanlarda yapılan üçlü alem sistemli sınıflandırmada ise Eubacteria grubuna dahil edilmişlerdir. Bakteriyologlar tarafından bakterilerle birlikte incelenen mavi-

yeşil algler 'Siyanobakteri' (Cyanobacteria) olarak isimlendirilmektedir. Botanikçiler tarafından ise bitki olarak kabul edilerek alglerle birlikte ele alınmakta ve Cyanophyta divisiosu olarak incelenmektedir. Sistematikteki yeri araştırmacılar tarafından hala tartışılan mavi-yeşil alglerin, son yıllarda yapılan moleküler düzeydeki araştırmalarla, DNA ve ribozom analizleriyle bulunduğu yer konusunda yeni fikirler ortaya atılmaktadır (Ulçay, 2005).

Sıcak sular çok fazla literatüre sahip olmamakla birlikte ilk termal alg çalışmalarından biri Amerika'da bulunan Yellowstone milli parkının alg ve diğer canlı grupları üzerinedir. 1897 yılında Davis tarafından yapılan çalışmalarda, renkli türler Cyanophyceae sınıfı içinde, renksiz ve en ilkel alg grupları *Schizomycetes* altında bakteri ya da en ilkel mantar grupları olarak ayrılmışlardır. Bu araştırmada 85°C'nin üzerinde canlı bulunmadığına dikkat çekilmiş olup hangi sıcaklık aralıklarında hangi renk canlı gruplarının yaşadığı belirtilmiştir. 1898'de Tilden'in Batı Amerika'nın termal algleri üzerine yaptığı çalışmasında 11 cins ait 17 mavi-yeşil alg türü tespit edilmiştir. 1934 yılında Flowers yapmış olduğu çalışmasında Büyük Tuz Gölü etrafında bulunan 7 kaplıcada 19 mavi-yeşil alg türü tespit etmiştir. 1941'de Gray tarafından yapılan bir araştırmada Arkansas'ta bulunan iki sıcak kaynağın alg yapısında 16 cins ait 36 tür tespit edilmiştir (Yüksel, 2009).

Castenholz, 1996 yılında yaptığı farklı araştırmada termofilik mavi-yeşil alglerde endemizm ve biyolojik çeşitliliği çalışmış, ayrıca endemik ve kozmopolit olan termal mavi-yeşil alg türlerini belirlemiştir. Son zamanlarda termal ortamlardaki literatür çalışmaları azalmış ve sıcaklık kaynaklarda yaşayan türlerin özellikleri daha detaylı incelenmeye başlandığı belirtilmiştir. Ward ve Castenholz, 2000 yılında jeotermal çevrelerde yaşayan mavi-yeşil algleri tüm yönleriyle incelemişlerdir. Termal ortamlarda yapılan bu çalışma yıllardaki en detaylı çalışmadır.

Setchell ve Nash Yellowstone sıcak kaynağında, 73 ve 75°C'nin üzerinde mavi-yeşil alg bulunmadığını belirtmişlerdir. Kempner Yellowstone'da ki birkaç bitişik kaynaktaki 73°C nin üzerinde hiçbir şeye rastlamamıştır ve bu sıcaklığın yaşam için üst limiti gösterdiği sonucuna varmıştır (Castenholz , 1969).

Çok ince trikumlu kısmen halofilik, tuza dayanıklı ve termofilik yeni bir siyanobakteri cinsine ait 4 tür üzerine 16S rRNA gen sekansına dayanan filogenetik analizler bu türlerin yakından ilişkili (%99) olduklarını göstermiştir ve bu türler için *Halomicronema excentrium* önerilmiştir (Abed ve diğ., 2002)

Kültür koleksiyonu türlerinden ve hipersalin ortamda izole edilmiş on yeni siyanobakteri türlerinin morfolojileri, fizyolojileri ve 16S rRNA gen sekansları incelenmiştir. Yapılan çalışmalar filogenetik olarak uyumlu siyanobakteri türlerinin fizyolojileri temel alınarak tanımlanabileceği belirtilmiştir (Garcia-Pitchel ve diğ., 1998).

Bu çalışmada İzmir ilindeki Zeytindalı, Balçova ve Şifne termal alanlarında bulunan siyanobakterilerin moleküler yöntemler kullanılarak tanımlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Çalışma boyunca İzmir ili içindeki çeşitli kaplıca ve termal tesislerden içerisindeki farklı bölge ve özelliklere sahip 3 istasyon belirlenmiştir. Bunlardan birincisi, Bergama –Dikili bölgesinde olup, İzmir-Çanakkale yolunun üzerinde, İzmir'e 110 km, uzaklıkta bulunan Zeytindalı Termal Tesisi dir (39°08'21 N 26°9'19 E). İkinci yer ise, Şifne-Çeşme Termal Oteldir (38°30'82 N, 26°36'16 E). Otel, İldır yolu üzerinde olup, Çeşme'ye 7,5, Ilıca'ya 1,5 km uzaklıktadır. Üçüncü örnekleme yerimiz ise Balçova Termal Tesisidir (38°23'19"N 27°2'4"E).

Örnekler, sıcak su akışın olduğu yerlerden, taş ve kayadan spatula ile kazılarak alınmıştır. Alınan örnekler steril cam şişelere alınarak üzerleri etiketlenmiştir.

Termal tesislerinden elde edilen örnekler için, genel bir ortam olan BG 11 kültür ortamı kullanılmıştır (Sukatar, 2002).

Kültüre alınan örnekler düzenli şekilde uygun kültür ortamları ile seyreltme uygulanarak izolasyonu sağlanmıştır. Yeterince seyreltilen türler agar (%1,5) ve yatık agara çizgi ekim metodu uygulanmıştır (Sukatar, 2002).

Saflaştırılan türler ayrı ayrı agarlı petrilerde 35°C'de, sürekli aydınlatmada inkübasyona bırakılmıştır.

Saflaştırılan siyanobakterilerin morfolojik tayin yönteminin yapılabilmesi için ışık mikroskobu ve floresans

mikroskobu (Leica DM 4000B) kullanılmış ve fotoğrafları çekilmiştir.

İzolatların DNA'ları ZRFungal/Bacterial DNA Kit kullanılarak izole edilmiştir. İzolasyon sonrası %1 agarozda DNA'lar görüntülenmiştir.

Siyanobakteri genlerinin spesifik bölgelerinin PCR (Roche FastStart Taq DNA Polymerase kiti) yöntemiyle amplifikasyonları için gen bölgelerine özgül primer dizileri 27F-809R seçilmiştir (Saker, 2005).

REFGEN'de tamamlanmış olan siyanobakteriyel 16S rRNA gen sekansları BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) analizi kullanılarak dizilmiş ve MEGA 4 Bootstrap Test of Phylogeny (neighbour-joining) yazılımı ile filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

Bulgular

Zeytindalı Kaplıcaları (Zeytindalı) ve Şifne Termal Otelden (Şifne) birer, Balçova Termal Otelden (Balçova-1 ve Balçova-2) 2 tür laboratuvar ortamında izolasyonu yapılmıştır.

Örnekler, floresan ve ışık mikroskopta incelenmiştir. Örnekler ortak şekilde iplikli, çok ince kılıflı ya da kılıfsız, gerçek dallanma göstermeyen, yalancı dallanma gösterebilir, iplikler trikum organizasyonlu, heterosist, hormogonium mevcut, uca doğru karakteristik özellik gösteren yapıdadır. Bu özellikler temel alındığında bu örneklerin Oscillatoriales ordosunda bulunduğu düşünülmüştür.

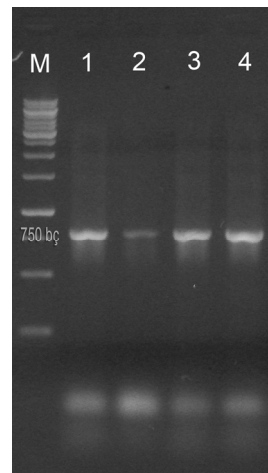
Divisio : Cyanophyta

Classis : Cyanophyceae

Ordo : Nostocales

Family : Oscillatoriaceae (Desikachary, 1959)

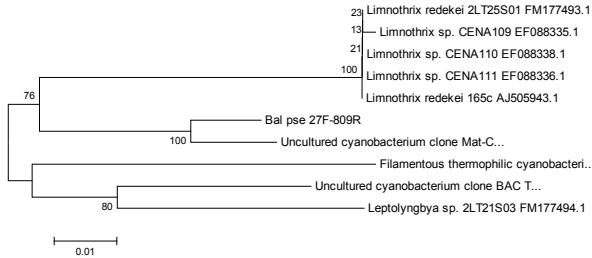
Universal primer çifti bakteri ve siyanobakterilere özgü primerler (27F-809R) kullanılarak izole edilen dört farklı DNA PCR ile çoğaltılmıştır (Şekil 1).



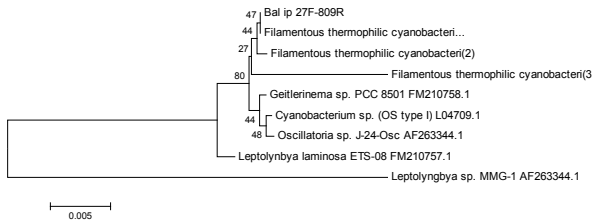
Şekil 1. PCR ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Marker, 1: Şifne, 2: Balçova (Bal ip), 3: Balçova (Bal pse), 4: Zeytindalı).

Daha sonra elde edilen PCR ürünleri sekans analizi için REFGEN (Odtü-Teknokent) Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti.'ne gönderilmiştir. Gelen sekans

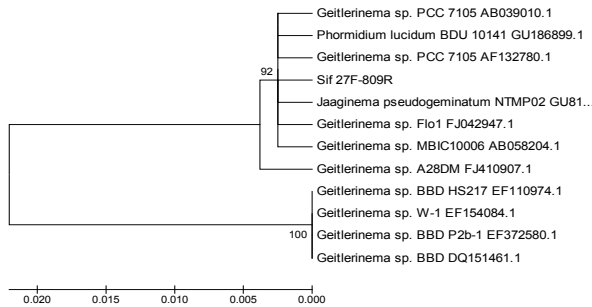
sonuçlarına göre NCBI-BLAST analizi ile filogenetik haritası çıkarılarak tür tayin işlemi tamamlanmıştır. MEGA 4 Bootstrap Test of Phylogeny yazılımı ile de filogenetik ağaçları oluşturulmuştur.



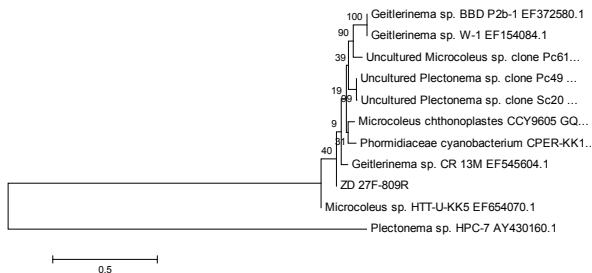
Balçova (Bal pse) örneğimiz <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> kısmi 16S rRNA sonuçlarına göre 501/516 baz çiftlik bir alandaki dizilimde Oscillatoriales ordosu altında belirlenen tür kültüre edilemeyen (uncultured) olarak belirlenmiştir.



Balçova (Bal ip) örneğimiz <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> kısmi 16S rRNA sonuçlarına göre 739/743 baz çiftlik bir alandaki dizilimde Geitlerinema sp. PCC 8501 ile % 99 benzerlik göstermiştir.



Şifne örneğimiz <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> veritabanındaki sonuçlara göre 737/740 baz çiftlik bir alandaki dizilime göre Geitlerinema sp. PC 7105 ile % 99 benzerlik göstermiştir.



Zeytinalı örneğimizin. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> veritabanındaki kısmi 16S rRNA sonuçlarına göre 655/677, baz çiftlik bir alandaki dizilimde Geitlerinema sp. CR_13M ile %96 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Tartışma ve Sonuç

Günümüze kadar Türkiye sularında sistematik açıdan birçok araştırma yapılmış ve ülkemiz su florasının çoğu ortaya çıkarılmıştır (Ulçay ve diğ., 2007, Güner, 1970; Yüksel, 2009). Cadirci (2007) tarafından gerçekleştirilmiş olan bir çalışmada Balçova-İzmir'den termofilik bir siyanobakterinin izolasyonu ve moleküler identifikasyonu yapılmıştır.

Ünal (1996) tarafından Balçova Kaplıcalarında yapılan çalışmada 74 takson tespit edilmiş olup bunlardan 35 taksonun Cyanophyta (Siyanophyta) grubuna ait olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada, farklı sıcaklıktaki istasyolardan elde edilen mavi yeşil algler morfolojik olarak tanımlanmıştır. 80°C'de egemen canlı *Phormidium* sp. olduğu belirtilmiştir. 70°C'de karakteristik canlılar ise; *Phormidium fragile*, *Oscillatoria terebriformis* ve *Anabaena constricta*'dır. 60°C'de *Phormidium purpurascens*, *P. fragile*, *P. tenue*, *P. laminosum*, *Pseudanabaena catenata* egemen olduğu belirtilmiştir. Sıcaklık artıca tür sayısının azaldığı belirtilmiştir. 55°C'de *Pseudanabaena catenata*, *Phormidium tenue*, *P. fragile* görülmüştür. 30-45°C'de *Oscillatoria* egemen canlı olmuştur ve *Oscillatoria formosa*, *O. rubescens*, *O. terebriformis*, *O. curviceps*, *Lyngbya confervoides*, *Chroococcus turgidus*, *C. minor* türleri kayıt edilmiştir.

Ulçay (2005), yüksek lisans tez çalışmasında Manisa ve çevresindeki kaplıcalardaki mavi yeşil alg türlerini çalışmıştır. Bu çalışmada 60-86°C sıcaklık aralığında tespit edilen türler şunlardır; *Chroococcus dimidiatus*, *C. minor*, *Gloecapsa quaternata*, *Spirulina subsalsa*, *S. subtilissima*, *S. meneghiniana*, *S. major*, *Leptolyngbya tenuis*, *Planktolyngbya subtilis*, *Limnotrix amphigranulata*, *Jaaginema pseudogeminata*, *Oscillatoria princeps*, *O. proteus*, *O. boryana*, *O. cacuttensis*, *Lyngbya contorta*, *Phormidium chlorinum*, *P. willei*, *P. terebriforme*, *P. amphibium*, *P. formosum*, *P. splendens*, *Calothrix thermalis*, *Mastigocladus laminosus*.

Ulçay (2007) Dikili ilçesindeki kaplıcalarda yayılış gösteren termal Cyanophyceae türleri üzerine yapılan çalışmada 8 cinse ait 19 tür belirlenmiştir. *Chroococcus membraninus*, *C. globus*, *Pseudanabaena mucicola*, *P. galeata*, *P. thermalis*, *Jaaginema geminatum*, *Spirulina tenerrima*, *S. meneghiniana*, *Phormidium numidicum*, *P. subuliforme*, *P. animale*, *Hormoscilla endophytica*, *Oscillatoria ucrainica*, *O. ornata*, *O. bonnemaisonii*, *O. janus*, *Lyngbya thermalis*, *L. meneghiniana*, *L. confervoides* türleri kayıt edilmiştir.

Bacteria; Cyanobacteria; Oscillatoriales ordosuna ait ipliksi siyanobakteriler Tablo 1 de gösterilmiştir. Ayrıca sequin programı yardımı ile aksesyon numaraları NCBI' dan alınmıştır.

Tablo 1. Türlerin tanımlamaları ve istasyonları.

| Organizmalar | İstasyonlar | Aksesyon No. |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------|
| Tanımlanmayan tür | Balçova-Izmir | - |
| <i>Geitlerinema</i> sp. synonym: <i>Leptolyngbya laminosa</i> = <i>Phormidium laminosum</i> | Balçova-Izmir | HQ197683 |
| <i>Geitlerinema</i> sp. | Şifne-Çeşme-Izmir | HQ197684 |
| <i>Geitlerinema</i> sp. | Zeytindalı-Bergama-Izmir | HQ197685 |
| <i>Geitlerinema</i> sp. Tanımlanması | | |

İpliksi; iplikleri dallanmamış, genellikle tek yaşayan, uca doğru genellikle paralel şekilde yönelir, pürüzsüz, akıcı ve zarsı tabaka, zemini kaplar, başta mikroskobik daha sonra makroskobik, trikomlar daima kılıfsız, düz veya hafifçe dalgalı veya hilal şeklinde, isopolar, dar, 1-4 µm genişliğinde, tek sıralı, silindirik hücrelerden oluşmuş, karşılıklı duvarlarda daralma görülür, genellikle dardır ve sonlara doğru büzülmüş, genellikle hareketlidir. Hücreler silindirik, uzamış, az ya da çok isodiametrik, daha sonraları hücrelerin uzunluğu genişliğinden fazladır. Bazen belirgin granüller gözlenir (karotenoid), tillakoitler hücre çeperi boyunca konsantrik düzenlenmiştir; sondaki hücreler yuvarlak veya dar ve büzülmüştür, bazen çengel biçiminde, nokta şeklinde, dar-yuvarlak, bazen yuvarlak bir kaliptrayla sonlanır. Hücreler, mat mavi-yeşil, sarımsı yeşil, zeytin yeşili ve parlak yeşil renkte olabilirler. Heterosist ve akinet bulunmaz.

Sonuç olarak, bu çalışma ile izole edilen siyanobakteri türleri moleküler olarak tanımlanmış ve ülkemizde moleküler çalışmalar için ön çalışma oluşturmaktadır.

Teşekkür

Bu araştırmayı 2008/FEN/022 no'lu proje ile destekleyen EÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna teşekkür ederiz.

Kaynakça

Abed, M.R.R., F. Gracia-Pichel, M. Hernandez-Marine, 2002. Polyphasic characterization of benthic, moderately halophilic, moderately thermophilic cyanobacteria with very thin trichomes and the proposal of

- Halomicronema excentricum* gen. nov. sp. nov. Arch Microbiol, 177 :361-370.
- Cadirci, B., I. Tuney, I. Yaşa, A. Sukatar, G. Gökçen, 2007. Isolation and identification of a thermophilic cyanobacterium from Balçova, İzmir-Turkey. 38th CIESM Congress 9-13 April 2007 Istanbul-Turkey.
- Castenholz, R. W., 1969. Thermophilic Blue-Green Algae and the Thermal Environment. Bacteriological Reviews. Dec., 33(4): 476-504.
- Castenholz, R. W., 1996. Endemism and Biodiversity of Thermophilic Cyanobacteria. Nova Hedwigia. Beiheft., 112: 33-47.
- Castenholz, R. W., J. B. Waterbury, 1989. Oxygenic Photosynthetic Bacteria. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 3(19): 1710-1806.
- Desikachary, T.V., 1959. Cyanophyta. Indian Council Agricultural Research. New Delhi.
- Garcia-Pichel, F., U. Nübel, G. Muyzer, 1998. The phylogeny of unicellular extremely halotolerant cyanobacteria. Arch Microbiol. 169: 469-482.
- Güner, H., 1970. Ege Bölgesi Kaplıca ve Maden Sularının Alg Vegetasyonu ile İlgili İnceleme. E.Ü.F.Fak. İ.R.S. No: 99.
- Herrero, A., A. M. Muro-Pastor and E. Flores, 2001. Nitrogen control in cyanobacteria. Journal of Bacteriology, 183 (2): 411-425.
- Mackay, M.A., R.S. Norton and L.J. Borowitzka, 1983. Marine blue green algae have a unique osmoregulatory system. Marine Biology, 73: 301-307.
- Saker, M.L., A.D. Jungblut, B.A. Neilan, D.F. Rawn and V.M. Vasconcelos, 2005. Detection of microcystin synthetase genes in health food supplements containing the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*. Toxicon, 46 (5): 555-62.
- Stewart, W.D.P., 1973. Nitrogen fixation by photosynthetic microorganisms. Ann. Rev. Microbiol. 27:283-316.
- Sukatar, A., 2002. Algal culture methods, (in Turkish). Ege Üni. Fen Fak. Kitapları Serisi No:184. 104s.
- Ulcay, S.Ö., 2005. Distribution of Blue-Green algae species in Manisa and around the hot springs (in Turkish). Yüksek Lis. Tez Çalışması. Celal Bayar Üniversitesi.
- Ulcay, S.Ö., T. Kurt, O. Taşkın, M. Öztürk, 2007. Distribution of thermal Cyanophyceae (Blue-Green algae) species in Dikili (İzmir) thermal water, (in Turkish). Türk Sucul Yaşam Dergisi, 5-8: 371-378.
- Ünal, T., 1996. The microscopic and macroscopic algae flora in Izmir, Balçova (Agamemnon) the hot spring, (in Turkish). Yük. Lis. Tezi, Ege Üni. Fen Fak. Bio. A.B.D.
- Ward, D.M., R.W. Castenholz, 2000. Cyanobacteria in geothermal habitats. In: Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space (Whitton. B. A. and Potts. M.. eds.), Kluwer Acad. Publ. Dordrecht, pp. 37-59.
- Yüksel, K., 2009. Isolation and Molecular determination of Blue- green algae (Cyanobacteria) which grow in thermal waters in Izmir and surroundings, (in Turkish). Yüksek Lis. Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.