T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Microcystis aeruginosa (Kützing) Kützing 1846 METABOLİTLERİ İLE FARKLI ANTİBİYOTİK KOMBİNASYONLARININ SİNERJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

EBRU TOKDEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Doç. Dr. BURAK ÖTERLER

EDİRNE-2024

Ebru TOKDEMİR'in hazırladığı "***Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing 1846 Metabolitleri ile Farklı Antibiyotik Kombinasyonlarının Sinerjik Etkilerinin Araştırılması**" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoloji Anabilim Dalında bir Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	İmza
Doç. Dr. Burak ÖTERLER	……
Prof. Dr. Volkan AKSOY	……
Dr. Öğr. Üyesi Gülcan KUYUCUKLU	……

Tez Savunma Tarihi: 24/01/2024

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Doç. Dr. Burak ÖTERLER

Tez Danışmanı ..……..

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Özlem ÇETİN ERDOĞAN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

24 / 01 / 2024

Ebru TOKDEMİR

Yüksek Lisans Tezi

Microcystis aeruginosa (Kützing) Kützing 1846 Metabolitleri ile Farklı Antibiyotik Kombinasyonlarının Sinerjik Etkilerinin Araştırılması

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışma kapsamında, farklı antibiyotiklerinin bir siyanobakteri türü olan *Microcystis aeruginosa*'nın metabolitleri ile meydana gelecek sinerjistik etkilerini tespit etmek amacıyla laboratuvar ortamında araştırmalar ve denemeler yapılmıştır. Bu amaç doğrultusunda, kültür gelişimine bağlı olarak *M. aeruginosa*'nın üssel üreme fazına 42. günde geçtiği tespit edilmiş ve deneyler kültür gelişimine göre planlanmıştır. 45, 60 ve 90 günlük kültürlerden ekstraktlar hazırlanıştır. Elde edilen ekstrakların antimikrobiyal etkinliklerini belirlemek için antimikrobiyal aktivite çalışmaları ve sinerji testleri yapılarak Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) değerleri tespit edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite testleri, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsünün CLSI M100-S28 ve M27-A3 önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Candida albicans* ATCC 10231 standart suşları kullanılmıştır. Deney sonuçlarına göre 45 günlük kültür ekstreleri arasında Gram negatif bakterilerde bir fark gözlenmezken Gram pozitif bakterilerde aktivite derecesinde fark gözlenmiştir. Dama tahtası yöntemiyle yapılan sinerji testlerinde ise 60 günlük kültür ektresi ile gentamisin kombinasyonunda *P. aeruginosa* üzerine aditif etki bulunmuş ve MİK değerinde 3 kat azalma tespit edilmiştir.

Yıl : 2024

Sayfa Sayısı : 46

Anahtar Kelimeler : *Microcystis aeruginosa*, Sinerji testleri, Antimikrobiyal aktivite

Master Thesis

Investigation of Synergistic Effects of *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing 1846 Metabolites with Different Antibiotic Combinations

Trakya University Institute of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

ABSTRACT

Aim of the study, laboratory investigations and experiments were conducted to detect the synergistic effects of different antibiotics with the metabolites of *Microcystis aeruginosa*, a cyanobacterial species. In line with this objective, it was determined that *M. aeruginosa* entered the exponential growth phase on the 42^{n}d day, and experiments were planned according to the culture development. Extracts were prepared from cultures aged 45, 60, and 90 days. Antimicrobial activity studies and synergy tests were conducted to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values of the obtained extracts. Antimicrobial activity tests were performed according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M100-S28 and M27-A3. Standard strains used included Staphylococcus aureus ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, and *Candida albicans* ATCC 10231. According to the experimental results, no significant difference was observed among the 45-day culture extracts against Gram-negative bacteria, while variations in activity levels were observed against Gram-positive bacteria. Synergy tests conducted using the checkerboard method revealed an additive effect on *P. aeruginosa* with the combination of the 60-day culture extract and gentamicin, with a threefold decrease in the MIC value.

Year : 2024

Number of Pages : 46

Keywords : *Microcystis aeruginosa*, Sinergy test, Antimicrobial activity

TEŞEKKÜR

Tüm yüksek lisans eğitimim boyunca yardımlarını esirgemeyen, eğitim anlayışı, hoşgörüsü ile yoluma ışık tutan, tüm bilgi birikimi ve tecrübesinden, yararlandığım, değerli tez danışmanım sayın Doç. Dr. Burak ÖTERLER'e, ve eğitim hayatım boyunca bilgilerinden faydalandığım, yazım aşamalarında katkılarını esirgemeyen sayın Prof. Dr. Suzan ÖKTEN'e, deneylerimde bilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın Prof. Dr. Fatma KAYNAK ONURDAĞ ve Araş. Gör. Alparslan Semih SALAN'a, bağlı bulunduğum Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'na, laboratuar çalışmalarımı yaptığım Biyoloji Bölümü'ne, Trakya Üniversitesi, Su Ürünleri Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne, tez çalışmama verdikleri desteklerden dolayı Trakya Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na, maddi ve manevi her zaman yanımda olan aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

DOĞRULUK BEYANI……iii

ÖZET…….....iv

ABSTRACT…… .v

TEŞEKKÜR…….vi

İÇİNDEKİLER……vii

SİMGELER VE KISALTMALAR……..ix

ÇİZELGELER DİZİNİ…….....x

ŞEKİLLER DİZİNİ…….xii

BÖLÜM 1……..... 1

1. GİRİŞ……..... 1

BÖLÜM 2……. 3

2.GENEL BİLGİLER…….... 3

2.1. *Microcystis aeruginosa*……...……4

2.2. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması ve Özellikleri……...….5

BÖLÜM 3……..……9

3. MATERYAL VE YÖNTEM……...…….9

3.1. *Microcystis aeruginosa* Kültürlerinin Eldesi……..9

3.2. *Microcystis aeruginosa* Kültür ve İklimlendirme Koşulları……..……10

3.3. Büyüme Oranlarının Hesaplanması……..……10

3.4. Sayım ve *M. aeruginosa*'dan Ekstre Eldesi……..10

3.5.Antimikrobiyal Aktivite Testleri…….....11

3.6. Dama Tahtası Yöntemi……..12

BÖLÜM 4…….....14

4. BULGULAR…….....14

4.1. *Microcystis aeruginosa* Kültür ve Gelişimi……...14

4.2. *Microcystis aeruginosa* Kültürleri Üzerine Antimikrobiyal Aktivite Testleri…….15

4.3. *Microcystis aeruginosa* Kültürleri ve Ekstrelerinin Antimikrobiyal Etki Dereceleri.....18

4.4. Dama Tahtası……18

BÖLÜM 5……25

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA…….25

KAYNAKLAR…….....28

ÖZGEÇMİŞ…….34

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µL	: Mikrolitre
BG-11	: Blue Green Medium
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
FİK	: Fraksiyonel İnhibitor Konsantrasyonu
G	: Gram
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MHA	: Mueller Hinton Agar
mL	: Mililitre
SDA	: Sabouraud Dekstroz Agar

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. *M. aeruginosa*'nın sınıflandırması ve sistematiği……..…….4

Çizelge 4.1. *M. aeruginosa* kültür ve ekstrelerinin *E.coli* ATCC 25912 üzerine etkisi…15

Çizelge 4.2. *M. aeruginosa* kültür ve ekstrelerinin *P. aeruginosa* ATCC 27853 üzerine etkisi…….....16

Çizelge 4.3. *M. aeruginosa* kültür ve ekstrelerinin *E. faecalis* ATCC 29212 üzerine etkisi.....16

Çizelge 4.4. *M. aeruginosa* kültür ve ekstrelerinin *S. aureus* ATCC 29213 üzerine etkisi.....17

Çizelge 4.5. *M. aeruginosa* kültür ve ekstrelerinin *C.albicans* ATCC 10231 üzerine etkisi…….18

Çizelge 4.6. *M. aeruginosa* kültür ve ekstrelerinin antimikrobiyal etki dereceleri üzerine etkisi…….18

Çizelge 4.7. *E. faecalis* ATCC 29212'ye karşı Vankomisin ve 60 günlük kültür ekstresi kombinasyonunun antimikrobiyal etkisi…….…….19

Çizelge 4.8. *E. coli* ATCC 25922'ye karşı Siprofloksasin ve 60 günlük kültür ekstresi kombinasyonunun antimikrobiyal etkisi……..……20

Çizelge 4.9. *P. aeruginosa* ATCC 27853'ye karşı gentamisin ve 60 günlük kültür ekstresi kombinasyonunun antimikrobiyal etkisi……..….21

Çizelge 4.10. *S. aureus* ATCC 29213'ye karşı Ampisilin ve 60 günlük kültür ekstresi kombinasyonunun antimikrobiyal etkisi……..…22

Çizelge 4.11. *C.albicans* ATCC 10231'ye karşı Flukanazol ve 60 günlük kültür ekstresi kombinasyonunun antimikrobiyal etkisi……..….23

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. *Microcystis aeruginosa* mikroskop görüntüsü……..…..5

Şekil 3.1. *Microcystis aeruginosa* kültürleri……..…..…….…....9

Şekil 3.2. FİK (Fraksiyonel İnhibitor Konsantrasyonu) değerlerinin hesaplanma formülü……..…..13

Şekil 4.1. *Microcystis aeruginosa* kültürlerinin 100 günlük gelişim grafiği……14

BÖLÜM 1

1. GİRİŞ

Sanayi devriminden başlayarak dünya, giderek artan enerji ihtiyacı, küresel ısınma ve su kirliliğinin de dâhil olduğu ekonomik ve çevresel sorunlar yaşamaktadır. Bu sorunlar ekosistemleri çeşitli şekillerde etkilemektedir. Çevresel kirliliğinin insan nüfusuna bağlı artışı yaşam kaynaklarının kirlenmesine ve ekosistemin zarar görmesine sebep olmuştur. Dünyada artan insan popülasyonu ve kentleşme ile beraber endüstrileşme de gelişmiştir. Endüstriyel olarak gelişen ülkeler büyük oranda çevresel kirlilik yaratırlar. Son zamanlarda endüstrileşmeye bağlı çevresel problemler arttıkça kirlilik, toplumların temel endişe kaynağı haline gelmiştir. Bu çevresel problemlerin başında su kirliliği ve su kaynaklarının kontaminantlarla kirletilmesi sonucu su kaynaklarında meydana gelen azalma gelmektedir (Safran, 2017).

Yaklaşık 3.4 milyar önce diğer bakterilerden ayrılan siyanobakteriler, gram negatif bakterilere benzeyen hücre yapılarıyla bilinirler. İçerdikleri pigmentlere ve renklenmelerine göre mavi-yeşil algler olarak da bilinen bu canlılar, dünya üzerinde ilk kez fotosentez yapan ve oksijen üreten ototrofik prokaryotlardır (Carpine & Sieber, 2021; Sun vd., 2009; Weis & Pang, 2010;). Hücre duvarında peptidoglikan bulunan Siyanobakteriler dünya üzerindeki bilinen en eski yaşam formlarından biridir ve bu canlılar sucul ekosistemlerde besin zincirinde hem primer üretim hem de oksijen, karbon ve azotun biyokimyasal döngülerinde rol oynarlar. Klorofil a içeren tek bakteri grubu olan siyanobakterilerde fotosentetik pigmentler olan fikobilinler (fikosiyanin, allofikosiyanin ve fikoeritrin) bulunmaktadır (Carpine & Sieber, 2021; Schirrmeister, Sanchez-Baracaldo

& Wacey, 2016). Genel olarak sucul ekosistemlerde bulunan Siyanobakteriler, sıcak su kaynakları, hipersalin alanlar, kar üzerinde ve çöller gibi birçok ekstrem habitatlarda da bulunmaktadırlar. Bu canlılar genel olarak tatlı su habitatlarının öncül organizmalarıdırlar ve zaman zaman baskın olabilir (Whitton & Potts, 2000).

Antimikrobiyal maddelerin son yıllardaki yanlış kullanımı nedeniyle, antibiyotik ve antifungal dirençli veya duyarlı mikroorganizma kaynaklı enfeksiyonlardaki artıştan dolayı yeni etkin ilaçların araştırılmasına yönelik çalışmalar önem kazanmıştır. Antibakteriyel ve antifungal maddelerin bazı doğal ekstre veya maddeler ile birlikte kullanımları sonucu sinerjik etkiden yararlanarak mikroorganizmalara karşı direnç gelişimini önlemek ve daha düşük dozda uygulanmaları ile yan etki olasılığını azaltmak amacıyla kombinasyon çalışmaları ilgi çekmektedir. Bu yaklaşımlar arasında uçucu yağ ile antibakteriyel ve antifungal maddelerin kombinasyon çalışmaları son yıllarda giderek artış göstermektedir (Ahmad, Khan, Khan & Manzoor, 2010; Ahmad, Van Vuuren & Viljoen 2014; Amber, Aijaz, Immaculata, Luqman & Nikhat, 2010; Giordani vd., 2004; Khan, Guelich, Phan, Redman & Doty, 2012; Rodrigues, Costa & Coutinho, 2009).

Bu çalışmada, bir siyanobakteri olan ve sucul ekosistemlerde yaygın bulunan *Microcystis aeruginosa*'nın saf kültürleri kullanılmıştır. Çeşitli büyüme evrelerindeki *M. aeruginosa* kültürleri ve bu kültürlerden elde edilen metabolitler ile farklı antibiyotik kombinasyonlarının sinerjik etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

BÖLÜM 2

2. GENEL BİLGİLER

Siyanobakteriler, fotosentez yapmaları, sucul ekosistemlerde balıklar ve diğer sucul canlıların besin maddesi olarak kullanılmalarından dolayı besin zincirinin tabanını oluştururlar. Siyanobakterilerin dünyanın erken dönemlerinden itibaren var olan canlılardan olduğu bilinmektedir (İlter, 2017).

Siyanobakteriler, sucul ekosistemlerin primer üreticileri olması, fotosentez yapması, madde döngüsünde rol alması ve yapılarında önemli biyolojik bileşikleri bulundurmaktadır. Ayrıca bu canlıların hücresel aktiviteleri sonunda oluşan birincil (primer) ve ikincil (sekonder) metabolitler önemli ve değerlidir. Canlılar tarafından oluşturulan birincil metabolitler, hemen hemen her canlı organizmada bulunan karbonhidratlar, proteinler, yağlar ve nükleik asitler olarak bilinirler. İkincil metabolitler ise canlı gruplarına özgü olarak üretilen ve çeşitli nedenlerle ortaya çıkan biyoaktif bileşikler olarak bilinirler. Siyanobakteriyel metabolitlerin, antibakteriyel, antifungal, antioksidan, antikanser ve antimutajenik gibi birçok özellik gösterdiği yapılan çalışmalar ile tespit edilmiştir (Bhowmick, Mazumdar, Moulick & Adam, 2020; Soltani, Khavari-Nejad, Tabatabaei Yazdi, Shokravi & Fernández-Valiente, 2005).

Sulak alanlarda yerleşim yeri, tarım ve endüstriye kaynaklı kirlilik artışına bağlı olarak besin tuzu denen azotlu ve fosfatlı bileşiklerin yoğunlukları da artmaktadır. Alıcı su ortamlarında besin tuzlarının artmasıyla birlikte siyanobakteri biyokütlesi artmakta ve bu durum su kalitesini etkilemektedir. Siyonobakterilerin çoğalmaları “Bloom-Aşırı alg

çoğalmaları" olarak tanımlanmaktadır ve sekonder metabolitler hücre içinde sentezlenmekte ve bir kısmı suya salınmaktadır. Yüzeysel sularda aşırı siyanobakteri artışları ve ötrofikasyon sonucunda özellikle içme suyu olarak kullanımı sınırlanmaktadır. Bu durum, toksik ya da toksin üretme potansiyeline sahip olan türlerin bir araya gelmesiyle ülkemizdeki ve dünyadaki sulak alanlarda insan ve diğer canlıların sağlığı için tehlike oluşmaktadır (Raveh & Carmeli, 2007; Smith, Desbois & Dyrynda, 2010).

Toksin üretme kapasitesine sahip siyanobakterilerin sucul ekosistemlerdeki artışları, insan da dâhil olmak üzere birçok canlı için risklidir. Bu canlıların ürettiği metabolitler ekosistem için büyük problemlere neden olabilir. Siyanobakteri toksinleri arasında en çok bilinen microcystinler, siklik heptapeptid hepatotoksinlerin bir grubudur. *Microcystis, Anabaena, Nostoc* ve *Oscillatoria* gibi siyanobakteri taksonları tarafından üretilirler (Çelikoğlu, 2022).

2.1. *Microcystis aeruginosa*

Microcystis aeruginosa dünya üzerindeki sucul ekosistemlerde bulunan kozmopolit bir türdür. Dünya üzerinde hemen hemen her ülkede *M. aeruginosa* kayıt edilmiştir (Harke vd., 2016). *Microcystis* türlerinin bir tür sekonder metabolit olan microcystin ve türevlerini ürettiği bilinmektedir (Straub, Quillardet, Vergalli, Tandeau de Marsac & Humbert, 2011; Kuşoğlu, 2019). *Microcystis aeruginosa* maksimum büyüme hızına 25°C'nin üzerindeki sularda ulaşır (Rao, Bhattacharya, Parida, Jana & Bhaskar, 1998). Sitoplazmalarında gaz vesikülleri ile hem yüzeyde hem de ışığa ve besin tuzlarına yönelme yeteneklerine sahiptirler (Walsby, 1987; Kuşoğlu, 2019). *Microcystis aeruginosa* küresel hücrelere sahiptir. Hücre çapı, 1-9 µm aralığındadır (Harke vd., 2016; Kuşoğlu, 2019). *Microcystis aeruginosa*'nın sınıflandırması ve sistematiği Çizelge 2.1'de, mikroskop görüntüsü Şekil 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. *Microcystis aeruginosa*'nın sınıflandırması ve sistematiği.

Empire: Prokaryota
Kingdom: Eubacteria
Subkingdom: Negibacteria
Phylum: Cyanobacteria

Class: Cyanophyceae

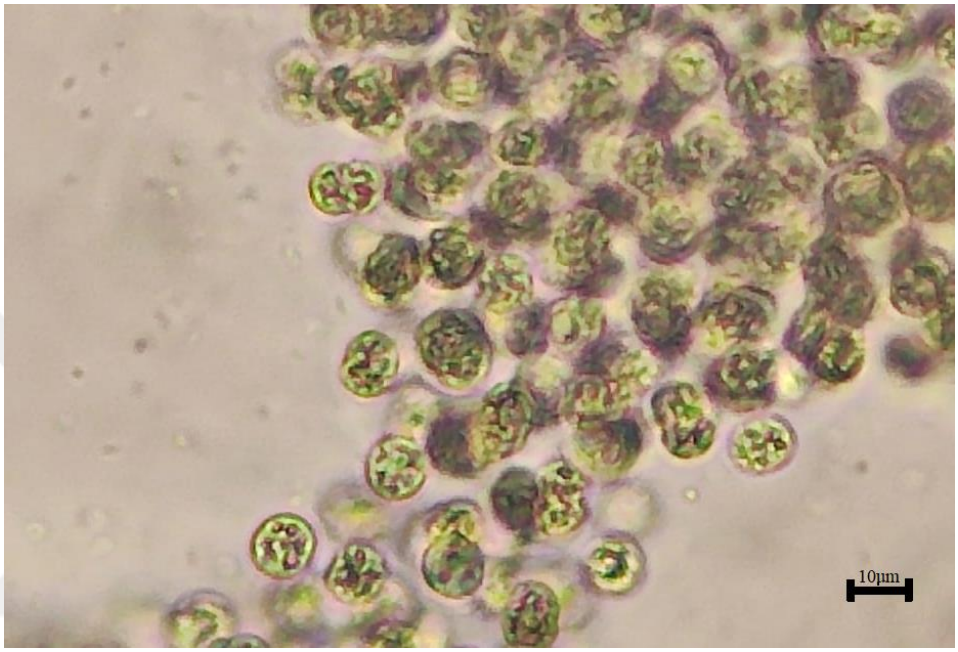
Subclass: Oscillatoriophycidae

Order: Chroococcales

Family: Microcystaceae

Genus: Microcystis

Species: *Microcystis aeruginosa* (Kützing, 1846)



Şekil 2.1. *Microcystis aeruginosa* mikroskop görüntüsü (Ölçek 10 µm).

2.2. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması ve Özellikleri

Bakteri, mantar, aktinomisetler gibi mikroorganizmalar tarafından üretilen veya sentetik olarak da hazırlanan, bakterilerin gelişmesini engelleyen veya onları öldüren maddelere "antibiyotik" denir. Antibiyotiğin kullanımı ile modern tedavi yöntemleri dönemi, Alexander Fleming'in 1928 yılında penisilinin keşfiyle başlamıştır. Antibiyotikler doğal, sentetik ve yarı sentetik olabilir ve istenmeyen bakteri gelişimini önleme amaçlı, bakteriyel hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Küçük, 2020).

Günümüzde kullanılan antibiyotikler en yaygın sınıflandırmaya göre; **i.** etki güçlerine göre, **ii.** etki mekanizmalarına göre ve **iii.** kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmaktadır. Antibiyotikler, etki güçlerine göre ise bakteriyostatikler ve bakterisitler olmak üzere iki farklı gruba ayrılmaktadır. Bakteri hücresinin üremesini ve gelişmesini önleyenler bakteriyostatik, bakteri hücresini yok eden ya da ölmesine neden

olanlar ise bakterisit adını alır (Akkan, 1997). Antibiyotikler etki mekanizmalarına göre 5 gruba ayrılır. Bunlar; **i.** bakteri hücre duvar sentezini bozan ve litik enzimleri aktive eden antibiyotikler, **ii.** sitoplazma membran permeabilitesini bozan antibiyotikler, **iii.** ribozomlarda protein sentezini bozan antibiyotikler, **iv.** bakteri genetik materyali üzerine etki yapan antibiyotikler ve **v.** bakteriyel antimetabolitlerdir (Akkan, 1997; Chasan, 2022).

İnsanlar ve hayvanlar tarafından vücutlarına alınan antibiyotikler, canlı vücudunda büyük miktarda metabolize edilirler. Canlılar tarafından herhangi bir şekilde alınan antibiyotikler ve bunların metabolitleri sucul ortamlara ulaşmaktadır (Kümmerer, 2012; Korkmaz, 2017). Hücre yapılarının bakterilere benzemesinden dolayı bir çok Siyanobakteri türü antibiyotik ve türevlerine duyarlılık göstermektedir ve bu nedenle susul ekosistemlerde toksisite değerlendirmelerinde indikatör olarak kullanılmaktadırlar (Öbek, Topal, Uslu Şenel & Arslan Topal, 2015; Ye, Huang, Shang, Xu, & Wu, 2020; Manavoğlu, 2021).

Hücre metabolitleri genellikle primer ve sekonder olmak üzere iki grupta toplanırlar. Primer metabolitler intrinsik fonksiyonları olan ve canlının temel yaşamsal fonksiyonlarını sürdürmek için üretilen organik moleküllerdir (Karlovsky, 2008). Sekonder metabolitler ise tipik olarak ekstrinsik fonksiyonları olan organik moleküllerdir. Sekonder metabolitler yaşamın devam ettirilebilmesi için zorunlu değildir, canlının bulunduğu çevredeki rekabetçiliğini artırmaktadır (Lazar, 2005; Uras, 2021: 4).

Bazı siyanobakteri türlerinin, Gram pozitif (+) ve Gram negatif (–) bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip birkaç ikincil metabolitleri hücresel bazda ürettiği yapılan çalışmalarla bilinmektedir (Mazard, Penesyan, Ostrowski, Paulsen & Egan, 2016; Falaise vd., 2016; Demay, Bernard, Reinhardt & Marie, 2019). Siyanobakterilerden izole edilen antibakteriyel kimyasalların çoğu alkaloidler ve indol içeren bileşiklerdir. Aynı zamanda *Calothrix* sp. tarafından üretilen Calothrixin (Bakteriyel RNA polimeraz inhibitörü olarak iş görür) kanser hücre hattına gelişimine karşı aktivite gösterdiği yapılan çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır (Bernardo vd., 2004; Kumar, Singh, Tyagi & Kumar, 2019).

Sucul ekosistemlere aşırı organik kirletici yükünün girmesi sonucunda algler ve siyanobakteri türleri aşırı miktarda artar ve sonucunda ötrifikasyon denilen olay meydana gelir (Jones & Smol, 2023). Yapılan çalışmalar sonucunda *Anabaena, Aphanizomenon, Anabaenopsis, Cylindrospermopsi, Microcystis, Nostoc, Nodularia, Planktothrix, Scytonema, Hapalosiphon, Schizothrix* ve *Gleotrichia* gibi siyanobakteri taksonlarının

biyolojik olarak sekonder bileşik ürettiği bilinmektedir ve bu bileşiklerin pek çoğunun, insan dâhil olmak üzere çeşitli organizmalarda son derece toksik olduğu kanıtlanmıştır (Kabziński vd., 2000; Pearson, Mihali, Moffitt, Kellmann & Neilan, 2010; Koca, Demir & Alp, 2019; Jones & Smol, 2023). Bu organizmalardan 800'den fazla sekonder metabolit izole edilmiştir. Bu sekonder metabolitlerin toksik, antibakteriyal, antifungal, antiviral ve sitotoksik etkileri olduğu belirlenmiştir (Vijayakumar & Menakha, 2015).

Antibakteriyel aktivite çalışmaları, maddelerin mikrobiyal etkinliklerini belirlemek amacıyla yapılmaktadır. Bakterilerin üremesini durduran veya inaktive eden en düşük madde konsantrasyonu Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) olarak adlandırılır. Yöntemin belirlenmesinde, test edilecek maddelerin sayısı, miktarı, çözünürlüğü, kullanılacak mikroorganizmanın türü ve özellikleri kritik rol oynar.

Antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi için çeşitli yöntemler kullanılabilir. Bu yöntemler, antimikrobiyal miktarını kantitatif olarak saptayan, antimikrobiyal içeren diskler kullanarak duyarlı, orta duyarlı ve dirençli gibi kalitatif değerlerin verildiği ya da moleküler düzeyde belirlenen metodlar olarak sınıflandırılabilir (Işık; 2008; Abbasoğlu & Çeviktaş, 2011). Yapılacak ilk işlem, bakterilerin uygun bir besiyerinde üretilmesidir. Üreyen bu bakteriler farklı konsantrasyonlardaki antimikrobiyal maddelerle steril ve uygun deney ortamında test edilir (Işık; 2008). Dilüsyon ve difüzyon yöntemlerini içeren bu testlerde uygun standart test organizmalarının kullanılmaktadır. Bu testler, mikroorganizmanın ilaca karşı duyarlılığını araştırmak amacıyla gerçekleştirilir. Dilüsyon yöntemi, ilacın çeşitli konsantrasyonlarının mikroorganizma üzerindeki etkilerini belirlemek için kullanılır. Difüzyon yöntemi ise ilacın belirli bir ortamda ne kadar yayıldığını ve mikroorganizmanın bu yayılma alanındaki tepkisini değerlendirmek için kullanılır. Bu testler, ilaçların antibakteriyel aktivitesini değerlendirmek ve tedaviye olan etkinliklerini anlamak için önemli araçlardır (Abbasoğlu & Çeviktaş, 2011).

Dilüsyon yöntemleri sıvı dilüsyon ve agar dilüsyon olarak iki şekilde uygulanır. Agar dilüsyon yöntemi, antimikrobiyal madde içeren çözeltilerin uygun dilüsyonlarının hazırlanması esasına dayanır. Çözeltiler, besiyerine eklenir ve iyice karıştırıldıktan sonra petri plaklarına dökülür. Farklı konsantrasyonlarda antibiyotik içeren plaklara, en düşük konsantrasyondan başlayarak inokülasyon yapılır. İnkübe edilen plaklarda, mikroorganizmaların üremesini inhibe eden en düşük ilaç konsantrasyonu MİK olarak kabul

edilir. Bu yöntem, antimikrobiyal maddenin etkinliğini belirlemede kullanılır ve mikroorganizmaların ilaca karşı duyarlılığını değerlendirmek için önemli bir test yöntemidir.

Disk difüzyon yönteminde temel prensip, katı besiyerine inoküle edilen mikroorganizmaların, besiyerinin yüzeyine konan disklerden yayılan antimikrobiyal maddenin neden olduğu üreme engellenen bölgelerin ölçülmesine dayanır (Abbasoğlu & Çeviktaş, 2011). Şerit etrafında oluşan inhibitör elipsinin, şerit üzerindeki ölçekle kesiştiği nokta, MİK değerini temsil eder (Işık, 2008; Demirpek, 2012). Kombine bileşiklerde antimikrobiyal duyarlılık tespitinde genellikle sinerji testleri yapılmaktadır ve genellikle Dama tahtası testi kullanılamaktadır. (Özseven Gül, Çetin Sesli & Özseven, 2012). Dama tahtası testinde, 96 kuyucuklu mikroplak kullanılmaktadır. Bu test ile farklı ilaçların farklı konsantrasyonları karşılaştırılır ve bunların kombinasyon etkinlikleri test edilir. İlaçların kombinasyondan elde edilen MİK değerleriyle tek başlarına olan MİK değerleri oranlanır ve FİK (Fraksiyonel İnhibitor Konsantrasyonu) hesaplanır (Özseven vd., 2012; Döşler & Gürler, 2006).

Ülkemizde siyanobakteriler birçok alanda kullanılmakta olup, son 20-25 yılda siyanobakterilerin çeşitliliği, antimikrobiyal ve sinerjistik etkilerinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar oldukça azdır. Bu veriler, Türkiye'de özellikle siyanobakterilerin ve ürettikleri sekonder metabolitlerin yeterince çalışılmadığını göstermektedir (Manavoğlu, 2021). Bu tez çalışmasında sucul ekosistemlerin önemli bir üyesi olan *M. aeruginosa*'nın kültüre alınıp büyüme eğrisinin çıkartılması ve kültür şartlarında yetiştirilen bu organizmanın farklı gelişim evrelerinde üretmiş olduğu sekonder bileşiklerin antimikrobiyal ve sinerjistik özelliklerinin incelenmesi hedeflemiştir.

Dünyamızda ekstrem ekolojik ortamlar da dahil olmak üzere milyarlarca yıldır varlığını devam sürdüren siyanobakterilerin metabolitleri, çağımızın önemli bir sorunu olan antibiyotik direncine karşı önemli potansiyele sahiptir. Dolayısıyla çalışmamızda sıcaklık açısından ekstrem ekolojik bir ortam olan Karahayıt'tan (kırmızı su) izole edilen siyanobakteri izolatlarının çeşitli mikrobiyal patojenlere karşı etkili antimikrobiyal özelliğe sahip metabolitlerinin varlığı çalışmamızın diğer hipotezini oluşturmaktadır. Siyanobakteri izolatlarının hücre içi ve hücre dışı metabolitlerinin antimikrobiyal aktivitesinin mikrodilüsyon ve dama tahtası yöntemlerini kullanılarak incelenmesi hedeflenmiştir.

BÖLÜM 3

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 *Microcystis aeruginosa* Kültürlerinin Eldesi

Siyanobakterilerine ilişkin kültür örnekleri Trakya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Hidrobiyoloji Anabilim Dalı, Plankton Kültürü Laboratuarı'ndan sağlanmış ve deneyler bu laboratuarda ve Trakya Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *Microcystis aeruginosa* kültürleri.

3.2 *Microcystis aeruginosa* Kültür ve İklimlendirme Koşulları

Microcystis aeruginosa için uygun olan otoklavlanmış BG-11 besiyeri kullanılmıştır. Bu besiyerleri, 250 mL'lik erlenlerde 15 dakika boyunca 121°C'de otoklavlanarak hazır hale getirilmiştir. *Microcystis aeruginosa*'nın stok kültürü ilk büyüme ortamına eklenmiş ve optimal büyümeye ulaşana kadar steril koşullarda inkübe edilmiştir.

Tüm stoklar, deney ve bakım aşamalarında gün içinde 2 defa el ile çalkalanarak yeterli oksijenlenme sağlanmıştır. *Microcystis aeruginosa* kültürleri, 23-25°C sıcaklıkta, günışığı floresan kullanılarak sağlanan (60 µmol.m-2s-1) ışık yoğunluğunda 16 saat ışık alarak ve 8 saat karanlık bir döngüde, Teknosem/TSK 500LN marka iklim kabini içinde tutulmuştur (Şekil 2.2).

Microcystis aeruginosa kültürleri deneyler için 250 mL'lik erlenlerde, pH'ı 7.1olarak ayarlanmış ve 150 mL BG-11 besiyerine, besiyeri hacminin %15'i (22.5 mL) kadar stok alg kültürü eklenerek hazırlanmıştır. Bu kültürler, 23-25˚C sıcaklıkta, günde iki kez elle çalkalanarak gece-gündüz periyotlu ışık kaynağı altında 100 gün süreyle üretilmiştir (Stanier, Kunisawa, Mandel, & Cohen-Bazire, 1971).

3.3 Büyüme Oranlarının Hesaplanması

Çalışmada kullanılan algin büyüme oranları ve hücre konsantrasyonları dikkate alınarak aşağıdaki denklemler kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır (Guillard & Sierachiki, 2005).

HY (Hücre mL^{-1})= 16 büyük karedeki hücre sayısı x 10,000

HY= Hücre yoğunluğu sayım kamarasında 16 kareye düşen hücrelerin sayılması ile yapılmıştır.

3.4. Sayım ve *M. aeruginosa*'dan Ekstre Eldesi

Her bir kuyucuktan mikropipet ile 100 µL alınarak, mikroorganizmaların Thoma lam üzerinde ışık mikroskobu kullanılarak sayımı gerçekleştirilmiştir. Sayım işlemi tamamlandıktan sonra, aynı kuyucuklarda bulunan sıvının absorbansı, UV-mini 1240 spektrofotometre kullanılarak 680 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Microcystis aeruginosa kültürleri 100 gün boyunca yukarıda bahsedildiği gibi yetiştirilmiştir. Daha sonra biyokütle ve kültür ortamı santrifüjleme ve filtreleme yoluyla ayrılmıştır. Kültür ortamı, sulu sistemlerden suda çözünen organik bileşiklerin adsorpsiyonu için uygun çözücülerden yavaşça geçirilerek ekstrakte edilmiştir. Öncelikle uygun bir ayırma hunisi içerisine 50 ml alg kültürü üzerine 50 ml Metilen klorür ve 50 ml Etil asetat ilave edilmiştir. Bu şekilde moleküller organik faza çekilmiştir. Organik faz sulu fazdan ayrılmıştır. Organik faz sodyum asetat kullanılarak kurutulmuştur. Vakumlu evaporatör yardımıyla organik faz uçurularak sarımsı renkli madde elde edilmiştir. 1 ml DMSO (Dimetil Sülfat) ve 9 ml ultra saf su kullanılarak tekrar çözülmüş ve ektrakte edilen çözelti deneylerde kullanılacak hale getirilmiştir.

3.5.Antimikrobiyal Aktivite Testleri

Antimikrobiyal aktivite testleri, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsünün CLSI M100-S28 ve M27-A3 önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Candida albicans* ATCC 10231 standart suşları kullanılmıştır. Mikroorganizmalar Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir.

Siprofloksasin (Sigma), gentamisin (Sigma), seftazidim (TÜM Ekip İlaç), flukonazol (Sigma), vankomisin (cayman) , ampisilin (Sigma) saf olarak kullanılmıştır. Stok çözeltileri CLSI M100-S28 ve M27-A3 önerileri doğrultusunda uygun çözücülerde çözülmüştür. Çalışmada Mueller Hinton Agar (MHA) (Merck) ve Katyon ayarlı Mueller Hinton Broth (MHB) (Merck) ve Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) (Merck) ve 3-[N-morpholino]-propansulfonic acid (MOPS) (Sigma) ile pH:7'ye tamponlanmış L-glutamin içermeyen RPMI-1640 (Sigma) besiyeri kullanılmıştır.

MHA plaklarında üretilmiş olan kolonilerden steril serum fizyolojik içerisine süspanse edilerek bulanıklık 0.5 McFarland standardına uygun bulanıklığa ayarlanmıştır. McFarland yoğunluğu densitometre cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Bakteri süspansiyonu McFarland 0.5 yoğunluğunda ayarlandıktan sonra 1:100 oranında dilüe edilerek $5x10^5$ CFU/mL yoğunluğunda kullanılmıştır.

SDA plaklarında üretilmiş olan maya kolonilerinden steril serum fizyolojik içerisine süspanse edilerek bulanık 0.5 McFarland standardına uygun bulanıklığa ayarlanmıştır ve McFarland yoğunluğu densitometre cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Maya süspansiyonu McFarland 0.5 yoğunluğunda ayarlandıktan sonra önce 1/100, sonra 1/20 oranında dilüe edilerek $2.5x10^3$ CFU/mL yoğunluğunda kullanılmıştır.

Mikrodilüsyon plaklarının tüm kuyularına 100µL mikroorganizmaya uygun besiyeri eklendikten sonra, 45 günlük Siyanobakteri kültürü, 90 günlük Siyanobakteri kültürü ve bu kültürlerin 5000 rpm'de santrifüj edilmesi sonrasında elde edilen süpernatanlardan asetonitril içerisinde çözülerek hazırlanan ekstreler mikrodilüsyon plaklarının ilk kuyucuklarına 100µL hacimde eklenmiştir. Bu şekilde stok solüsyonlardaki madde konsantrasyonu çift katlı olarak sulandırılmıştır. Çok kanallı mikropipet kullanılarak çift katlı dilüsyona devam edilip mikrodilüsyon plaklarının takip eden kuyucuklarında da konsantrasyon her defasında yarı yarıya azaltılmıştır. Dilüsyon işlemi tamamlandıktan sonra, mikrodilüsyon plağındaki her kuyucuğa, hazırlanan inokulum süspansiyonlarından 10µL inokülasyon yapılmıştır. Her mikrodilüsyon plağında sadece besiyeri+mikroorganizma içeren, sadece besiyeri içeren kontrol kuyucukları kullanılmıştır. Ayrıca, kullanılan tüm çözücülerin antimikrobiyal etkileri incelenmiştir. Bakteri inoküle edilmiş mikrodilüsyon plakları 37°C'de 18-24 saat, maya inoküle edilmiş plaklar ise 35°C'de 24-48 saat inkübe edilerek MİK değerleri, mikroorganizmanın mikrodilüsyon kuyucuklarındaki üremesini tamamen inhibe eden en düşük madde konsantrasyonu olarak, MİD değerleri mikroorganizmanın mikrodilüsyon kuyucuklarındaki üremesini tamamen inhibe eden dilüsyon olarak saptanmıştır.

***Microcystin aeruginosa* ekstresinin Antibiyotiklerin MİK değeri üzerine etkisi**: 60 günlük kültürden elde edilen ekstre kullanılmıştır.

3.6. Dama Tahtası Yöntemi

96 kuyucuklu mikrodilüsyon plaklarının tümüne 100µL mikroorganizmaya uygun besiyeri eklenmiştir. Yukarıdan 1 seri kuyucuk boş bırakılarak B serisine 100µL antibiyotik eklenmiştir. Daha sonra yukarıdan aşağıya olacak şekilde çok kanallı mikropipet yardımıyla çift katlı dilüsyon yapılmıştır. Bu şekilde kuyucuklarda konsantrasyon her defasında yarı yarıya azaltılmıştır.

Diğer bir 96 kuyucuklu mikroplakta bütün kuyucuklarına 100µL mikroorganizmaya uygun besiyeri eklenmiştir. Soldan 1. seri boş bırakılmış, 2. seriye *M. aeruginosa* ekstresinden 100 µL eklenmiş ve soldan sağa olmak üzere çok kanallı mikropipet kullanılarak çift katlı dilüsyon yapılmıştır. Bu şekildede konsantrasyon her defasında yarı yarıya azaltılmıştır. Mikroplaka içerikleri 1 mikroplakada toplanmış ve bu şekilde her kuyucukta *M. aeruginosa* ekstresinin ve antimikrobiyal maddelerin farklı konsantrasyonları elde edilmiştir. Kombinasyon testinin değerlendirilmesi fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu (FİK) indeksine göre yapılmıştır (Şekil 3.2.).

$FİK\ A = MİKA_{kombinasyon}/MİKA$

$FİK\ B = MİKB_{kombinasyon}/MİKB$

$FİK = FİK\ A + FİK\ B$

$FİK \leq 0,5$ ise sinerjik etki

$0,5 < FİK \leq 4$ ise aditif etki

$FİK > 4$ ise antagonistik etki

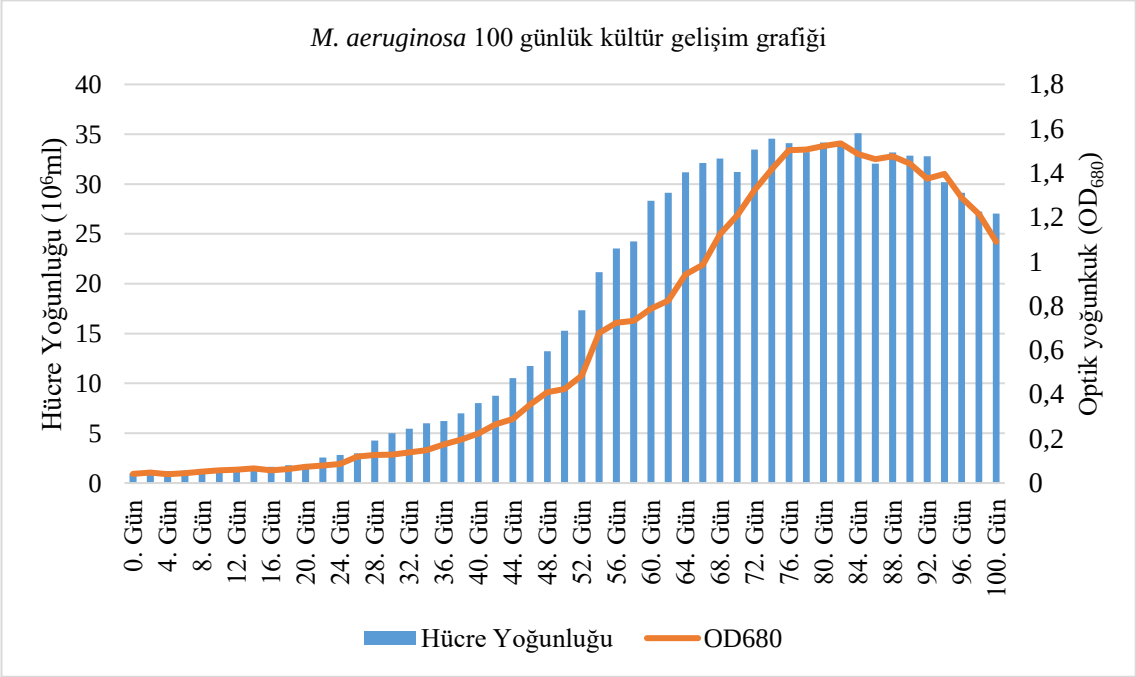
Şekil 3.2. FİK Değerlerinin Hesaplanma Formülü

BÖLÜM 4

4. BULGULAR

4.1. *Microcystis aeruginosa* Kültür ve Gelişimi

Ekim yapılan *Microcystis aeruginosa* kültürlernin 42 ile 50. gün arasında, uygulanan iklimlendirme koşullarında 5×10^4 hücre.ml^{-1} hücre yoğunluğuna ulaştığı tespit edilmiştir. Stok kültürlerin hücre sayılarının değişimi grafiği Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. *Microcystis aeruginosa* kültürlerinin 100 günlük gelişim grafiği

4.2. *Microcystis aeruginosa* Kültürleri Üzerine Antimikrobiyal Aktivite Testleri

Microcystis aeruginosa kültürleri ve ekstrelerinin *E.coli* ATCC 25912'in gelişimi üzerindeki etkileri Çizelge 4.1'de, *P. aeruginosa* ATCC 27853'in gelişimi üzerindeki etkileri Çizelge 4.2'de, *E. faecalis* ATCC 29212'in gelişimi üzerindeki etkileri Çizelge 4.3'de, *S. aureus* ATCC 29213'in gelişimi üzerindeki etkileri aşağıda Çizelge 4.4'de ve *C.albicans* ATCC 10231'in gelişimi üzerindeki etkileri aşağıdaki Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Escherichia coli üzerine uygulanan 90 günlük kültür ve ekstresi arasında etki farkı gözlenmemekle birlikte her ikisi de ¼ oranında dilüe edilmiş süspansiyonunun antimikrobiyal etkisi saptanmıştır. 45 günlük kültür ve ekstresi arasında etki farkı gözlenmiştir. 45 günlük kültür ekstresinin etkisi 90 günlük kültürden daha fazla olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1.).

Microcystis aeruginosa kültür ve ekstrelerinin *P. aeruginosa* ATCC 27853 üzerine etkisi incelendiğinde, 45 ve 90 günlük kültür ve ekstresi arasında etki farkı gözlenmemekle birlikte her ikisi de ¼ oranında dilüe edilmiş süspansiyonunun antimikrobiyal etkisi saptanmıştır (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.1. *M. aeruginosa* kültür ve ekstrelerinin *E.coli* ATCC 25912 üzerine etkisi

1	2	3	4	5	6	7	Mikroorganizma	Besiyeri
½	½	½	½	½	½	1		
¼	¼	¼	¼	¼	¼	0,5		
⅛	⅛	⅛	⅛	⅛	⅛	0,25		
1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	0,125		
1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	0,0625		
1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	0,03125		
1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	0,015625		
1/256	1/256	1/256	1/256	1/256	1/256	0,0078		

*Gri alanlar üreme görülen kuyucuklardır. 1: 90 günlük kültür,2: 90 günlük kültür ekstresi, 3: 45 günlük kültür, 4: 45 günlük kültür ekstresi, 5: 60 günlük kültür 6: 60 günlük kültür ekstresi 7: Siprofloksasin (µg/mL)

Çizelge 4.2. *M. aeruginosa* kültür ve ekstrelerinin *P. aeruginosa* ATCC 27853 üzerine etkisi.

1	2	3	4	5	6	7	Mikroorganizma	Besiyeri
½	½	½	½	½	½	1		
¼	¼	¼	¼	¼	¼	0,5		
⅛	⅛	⅛	⅛	⅛	⅛	0,25		
1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	0,125		
1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	0,0625		
1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	0,03125		
1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	0,015625		
1/256	1/256	1/256	1/256	1/256	1/256	0,0078		

*Gri alanlar üreme görülen kuyucuklardır. 1: 90 günlük kültür,2: 90 günlük kültür ekstresi, 3: 45 günlük kültür, 4: 45 günlük kültür ekstresi, 5: 60 günlük kültür 6: 60 günlük kültür ekstresi 7: Gentamisin (µg/mL)

Microcystis aeruginosa kültür ve ekstrelerinin *E. faecalis* ATCC 29212 üzerine etkisi incelendiğinde ise 90 günlük ekstrenin ¼ oranında dilüe edilmiş süspansiyonunun antimikrobiyal etkisi tespit edilmiştir ancak 90 günlük kültürün ½ oranında dilüe edilmiş süspansiyonda antimikrobiyal etki vardır. 45 günlük kültür ekstresinin 1/64 oranında dilüe edilmiş konsantrasyonunda antimikrobiyal etki görülmüştür. Bu etki diğer maddelere kıyasla oldukça yüksektir. 45 günlük kültürün etkisi ise 90 günlük kültürün etkisi ile aynıdır (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. *M. aeruginosa* kültür ve ekstrelerinin *E. faecalis* ATCC 29212 üzerine etkisi.

1	2	3	4	5	6	7	Mikroorganizma	Besiyeri
½	½	½	½	½	½	16		
¼	¼	¼	¼	¼	¼	8		
⅛	⅛	⅛	⅛	⅛	⅛	4		
1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	2		
1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1		
1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	0,5		
1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	0,25		
1/256	1/256	1/256	1/256	1/256	1/256	0,125		

*Gri alanlar üreme görülen kuyucuklardır. 1: 90 günlük kültür,2: 90 günlük kültür ekstresi, 3: 45 günlük kültür, 4: 45 günlük kültür ekstresi, 5: 60 günlük kültür 6: 60 günlük kültür ekstresi 7: Vankomisin (µg/mL)

Microcystis aeruginosa kültür ve ekstrelerinin *S. aureus* ATCC 29213 üzerine etkisi üzerine etkisi incelendiğinde ise 90 günlük ekstrenin ¼ oranında dilüe edilmiş süspansiyonunun antimikrobiyal etkisi tespit edilmiştir ancak 90 günlük kültürün ½ oranında dilüe edilmiş süspansiyonda antimikrobiyal etki vardır. 45 günlük kültür ekstresinin $^1/_{64}$ oranında dilüe edilmiş konsantrasyonunda antimikrobiyal etki görülmüştür. Bu etki diğer maddelere kıyasla oldukça yüksektir. 45 günlük kültürün etkisi ise 90 günlük kültürün etkisi ile aynıdır (Çizelge 4.4.).

Enterococcus faecalis, ve *S. aureus* için elde edilen sonuçlara göre 45 günlük kültür ekstresinin Gram pozitif bakteriler üzerine etkisinin yüksek olduğu söylenebilir.

Çizelge 4.4. *M. aeruginosa* kültür ve ekstrelerinin *S. aureus* ATCC 29213 üzerine etkisi.

1	2	3	4	5	6	7	Mikroorganizma	Besiyeri
½	½	½	½	½	½	16		
¼	¼	¼	¼	¼	¼	8		
⅛	⅛	⅛	⅛	⅛	⅛	4		
$^1/_{16}$	$^1/_{16}$	$^1/_{16}$	$^1/_{16}$	$^1/_{16}$	$^1/_{16}$	2		
$^1/_{32}$	$^1/_{32}$	$^1/_{32}$	$^1/_{32}$	$^1/_{32}$	$^1/_{32}$	1		
$^1/_{64}$	$^1/_{64}$	$^1/_{64}$	$^1/_{64}$	$^1/_{64}$	$^1/_{64}$	0,5		
$^1/_{128}$	$^1/_{128}$	$^1/_{128}$	$^1/_{128}$	$^1/_{128}$	$^1/_{128}$	0,25		
$^1/_{256}$	$^1/_{256}$	$^1/_{256}$	$^1/_{256}$	$^1/_{256}$	$^1/_{256}$	0,125		

*Gri alanlar üreme görülen kuyucuklardır.

1: 90 günlük kültür,2: 90 günlük kültür ekstresi, 3: 45 günlük kültür, 4: 45 günlük kültür ekstresi, 5: 60 günlük kültür 6: 60 günlük kültür ekstresi 7: Ampisilin(µg/mL)

Microcystis aeruginosa kültür ve ekstrelerinin *C.albicans* ATCC 10231 üzerine etkisi incelendiğinde ise 90 günlük ekstrenin ¼ oranında dilüe edilmiş süspansiyonunun antimikrobiyal etkisi tespit edilmiştir ancak 90 günlük kültürün ½ oranında dilüe edilmiş süspansiyonda antimikrobiyal etki vardır. 45 günlük kültür ekstresinin $^1/_{32}$ oranında dilüe edilmiş konsantrasyonunda antimikrobiyal etki görülmüştür. Bu etki diğer maddelere kıyasla oldukça yüksektir. 45 günlük kültürün etkisi ise 90 günlük kültürün etkisinden daha fazladır (Çizelge 4.5.).

Çizelge 4.5. *M. aeruginosa* kültür ve ekstrelerinin *C.albicans* ATCC 10231 üzerine etkisi.

1	2	3	4	5	6	7	Mikroorganizma	Besiyeri
½	½	½	½	½	½	0,5		
¼	¼	¼	¼	¼	¼	0,25		
⅛	⅛	⅛	⅛	⅛	⅛	0,125		
$^1/_{16}$	$^1/_{16}$	$^1/_{16}$	$^1/_{16}$	$^1/_{16}$	$^1/_{16}$	0,0625		
$^1/_{32}$	$^1/_{32}$	$^1/_{32}$	$^1/_{32}$	$^1/_{32}$	$^1/_{32}$	0,03125		
$^1/_{64}$	$^1/_{64}$	$^1/_{64}$	$^1/_{64}$	$^1/_{64}$	$^1/_{64}$	0,015625		
$^1/_{128}$	$^1/_{128}$	$^1/_{128}$	$^1/_{128}$	$^1/_{128}$	$^1/_{128}$	0,0078		
$^1/_{256}$	$^1/_{256}$	$^1/_{256}$	$^1/_{256}$	$^1/_{256}$	$^1/_{256}$	0,0037		

*Gri alanlar üreme görülen kuyucuklardır.

1: 90 günlük kültür, 2: 90 günlük kültür ekstresi, 3: 45 günlük kültür, 4: 45 günlük kültür ekstresi, 5: 60 günlük kültür 6: 60 günlük kültür ekstresi 7: Flukonazol (µg/mL)

4.3. *Microcystis aeruginosa* Kültürleri ve Ekstrelerinin Antimikrobiyal Etki Dereceleri

Yukarıda elde edilen bulgular doğrultusunda *M. aeruginosa* izolatlarının antimikrobiyal etki dereceleri skorlanarak aşağıdaki çizelge 4.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. *Microcystis aeruginosa* kültür ve ekstrelerinin antimikrobiyal etki dereceleri.

	E.coli	*P. aeruginosa*	*S. aureus*	*E. faecalis*	*C. albicans*
1	++	++	+	+	+
2	++	++	++	++	++
3	++	++	+	+	++
4	+	++	++++++	++++++	+++++

90 günlük, 60 günlük ve 45 günlük kültür ekstrelerinin antimikrobiyal aktivitesi sonuçlarına göre aktivite gözlenmeyen 60 günlük ektresi sinerji çalışmalarına dahil edilmiştir. *Microcystis aeruginosa* kültürlerinden elde edilen 60 günlük kültür ekstresi kombinasyonunun antimikrobiyal etkileri Çizelge 4.7., 4.8., 4.9., 4.10. ve 4.11.'de gösterilmiştir.

4.4. Dama Tahtası

Dama tahtası yöntemi kullanılarak yapılan sinerji çalışmaları sonucunda *M. aeruginosa* 60 günlük kültür ektresi ile gentamisin kombinasyonunda *P. aeruginosa* üzerine aditif etki tespit edilmiştir. Kültür ekstresi ile kombinasyonda gentamisin MİK değerinde 3 kat azalma tespit edilmişitir (Çizelge 4.9.).

Çizelge 4.7. *E. faecalis* ATCC 29212'ye karşı vankomisin ve 60 günlük kültür ekstresi kombinasyonunun antimikrobiyal etkisi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0/0	1000/0	500/0	250/0	125/0	67,5/0	33,75/0	16,88/0	8,44/0	4,22/0	2,11/0	1,05/0
B	0/8	1000/8	500/8	250/8	125/8	67,5/8	33,75/8	16,88/8	8,44/8	4,22/8	2,11/8	1,05/8
C	0/4	1000/4	500/4	250/4	125/4	67,5/4	33,75/4	16,88/4	8,44/4	4,22/4	2,11/4	1,05/4
D	0/2	1000/2	500/2	250/2	125/2	67,5/2	33,75/2	16,88/2	8,44/2	4,22/2	2,11/2	1,05/2
E	0/1	1000/1	500/1	250/1	125/1	67,5/1	33,75/1	16,88/1	8,44/1	4,22/1	2,11/1	1,05/1
F	0/0,5	1000/0,5	500/0,5	250/0,5	125/0,5	67,5/0,5	33,75/0,5	16,88/0,5	8,44/0,5	4,22/0,5	2,11/0,5	1,05/0,5
G	0/0,25	1000//0,25	500//0,25	250//0,25	125//0,25	67,5//0,25	33,75//0,25	16,88//0,25	8,44//0,25	4,22//0,25	2,11//0,25	1,05//0,25
H	0/0,125	1000/0,125	500/0,125	250/0,125	125/0,125	67,5/0,125	33,75/0,125	16,88/0,125	8,44/0,125	4,22/0,125	2,11/0,125	1,05/0,125

METOBOLİT →

ANTİBİYOTİK↓

Çizelge 4.8. *E. coli* ATCC 25922'ye karşı siprofloksasin ve 60 günlük kültür ekstresi kombinasyonunun antimikrobiyal etkisi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0/0	1000/0	500/0	250/0	125/0	67,5/0	33,75/0	16,88/0	8,44/0	4,22/0	2,11/0	1,05/0
B	0/1	1000/1	500/1	250/1	125/1	67,5/1	33,75/1	16,88/1	8,44/1	4,22/1	2,11/1	1,05/1
C	0/0,5	1000/0,5	500/0,5	250/0,5	125/0,5	67,5/0,5	33,75/0,5	16,88/0,5	8,44/0,5	4,22/0,5	2,11/0,5	1,05/0,5
D	0/0,25	1000/0,25	500/0,25	250/0,25	125/0,25	67,5/0,25	33,75/0,25	16,88/0,25	8,44/0,25	4,22/0,25	2,11/0,25	1,05/0,25
E	0/0,125	1000/0,125	500/0,125	250/0,125	125/0,125	67,5/0,125	33,75/0,125	16,88/0,125	8,44/0,125	4,22/0,125	2,11/0,125	1,05/0,125
F	0/0,0625	1000/0,0625	500/0,0625	250/0,0625	125/0,0625	67,5/0,0625	33,75/0,0625	16,88/0,0625	8,44/0,0625	4,22/0,0625	2,11/0,0625	1,05/0,0625
G	0/0,03125	1000/0,03125	500/0,03125	250/0,03125	125/0,03125	67,5/0,03125	33,75/0,03125	16,88/0,03125	8,44/0,03125	4,22/0,03125	2,11/0,03125	1,05/0,03125
H	0/0,01563	1000/0,01563	500/0,01563	250/0,01563	125/0,01563	67,5/0,01562	33,75/0,01563	16,88/0,01563	8,44/0,01563	4,22/0,01563	2,11/0,01563	1,05/0,01563

METOBOLİT →

ANTİBİYOTİK↓

Çizelge 4.9. *P. aeruginosa* ATCC 27853'ye karşı gentamisin ve 60 günlük kültür ekstresi kombinasyonunun antimikrobiyal etkisi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0/0	1000/0	500/0	250/0	125/0	67,5/0	33,75/0	16,88/0	8,44/0	4,22/0	2,11/0	1,05/0
B	0/1	1000/1	500/1	250/1	125/1	67,5/1	33,75/1	16,88/1	8,44/1	4,22/1	2,11/1	1,05/1
C	0/0.5	1000/0,5	500/0,5	250/0,5	125/0,5	67,5/0,5	33,75/0,5	16,88/0,5	8,44/0,5	4,22/0,5	2,11/0,5	1,05/0,5
D	0/0.25	1000/0,25	500/0,25	250/0,25	125/0,25	67,5/0,25	33,75/0,25	16,88/0,25	8,44/0,25	4,22/0,25	2,11/0,25	1,05/0,25
E	0/0.125	1000/0,125	500/0,125	250/0,125	125/0,125	67,5/0,125	33,75/0,125	16,88/0,125	8,44/0,125	4,22/0,125	2,11/0,125	1,05/0,125
F	0/0,0625	1000/0,0625	500/0,0625	250/0,0625	125/0,0625	67,5/0,0625	33,75/0,0625	16,88/0,0625	8,44/0,0625	4,22/0,0625	2,11/0,0625	1,05/0,0625
G	0/0,03125	1000/0,03125	500/0,03125	250/0,03125	125/0,03125	67,5/0,03125	33,75/0,03125	16,88/0,03125	8,44/0,03125	4,22/0,03125	2,11/0,03125	1,05/0,03125
H	0/0,01563	1000/0,01563	500/0,01563	250/0,01563	125/0,01563	67,5/0,015623	33,75/0,01563	16,88/0,01563	8,44/0,01563	4,22/0,01563	2,11/0,01563	1,05/0,01563

METOBOLİT →

ANTİBİYOTİK↓

FİK G = $MİKG_{kombinasyon}$/MİKG

FİK E = $MİKE_{kombinasyon}$/MİKE

FİK = 0,25/0,5 + 1000/2000 = 0.5 + 0.5 = 1 ≤ 4 Aditif Etki

FİK = 0,125/0,5 + 1000/2000 = 0.25 + 0.5 = 0.75 ≤ 4 Aditif Etki

FİK = 0,0625/0,5 + 1000/2000 = 0.125 + 0.5 = 0.625 ≤ 4 Aditif Etki

Çizelge 4.10. *S. aureus* ATCC 29213'ye karşı ampisilin ve 60 günlük kültür ekstresi kombinasyonunun antimikrobiyal etkisi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0/0	1000/0	500/0	250/0	125/0	67,5/0	33,75/0	16,88/0	8,44/0	4,22/0	2,11/0	1,05/0
B	0/16	1000/16	500/16	250/16	125/16	67,5/16	33,75/16	16,88/16	8,44/16	4,22/16	2,11/16	1,05/16
C	0/8	1000/8	500/8	250/8	125/8	67,5/8	33,75/8	16,88/8	8,44/8	4,22/8	2,11/8	1,05/8
D	0/4	1000/4	500/4	250/4	125/4	67,5/4	33,75/4	16,88/4	8,44/4	4,22/4	2,11/4	1,05/4
E	0/2	1000/2	500/2	250/2	125/2	67,5/2	33,75/2	16,88/2	8,44/2	4,22/2	2,11/2	1,05/2
F	0/1	1000/1	500/1	250/1	125/1	67,5/1	33,75/1	16,88/1	8,44/1	4,22/1	2,11/1	1,05/1
G	0/0,5	1000/0,5	500/0,5	250/0,5	125/0,5	67,5/0,5	33,75/0,5	16,88/0,5	8,44/0,5	4,22/0,5	2,11/0,5	1,05/0,5
H	0/0,25	1000/0,25	500//0,25	250//0,25	125//0,25	67,5//0,25	33,75//0,25	16,88//0,25	8,44//0,25	4,22//0,25	2,11//0,25	1,05//0,25

METOBOLİT →

ANTİBİYOTİK↓

Çizelge 4.11. *C.albicans* ATCC 10231'ye karşı flukanazol ve 60 günlük kültür ekstresi kombinasyonunun antimikrobiyal etkisi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0/0	1000/0	500/0	250/0	125/0	67,5/0	33,75/0	16,88/0	8,44/0	4,22/0	2,11/0	1,05/0
B	0/0,5	1000/0,5	500/0,5	250/0,5	125/0,5	67,5/0,5	33,75/0,5	16,88/0,5	8,44/0,5	4,22/0,5	2,11/0,5	1,05/0,5
C	0/0,25	1000/0,25	500/0,25	250/0,25	125/0,25	67,5/0,25	33,75/0,25	16,88/0,25	8,44/0,25	4,22/0,25	2,11/0,25	1,05/0,25
D	0/0,125	1000/0,125	500/0,125	250/0,125	125/0,125	67,5/0,125	33,75/0,125	16,88/0,125	8,44/0,125	4,22/0,125	2,11/0,125	1,05/0,125
E	0/0,0625	1000/0,0625	500/0,0625	250/0,0625	125/0,0625	67,5/0,0625	33,75/0,0625	16,88/0,0625	8,44/0,0625	4,22/0,0625	2,11/0,0625	1,05/0,0625
F	0/0,03125	1000/0,03125	500/0,03125	250/0,03125	125/0,03125	67,5/0,03125	33,75/0,03125	16,88/0,03125	8,44/0,03125	4,22/0,03125	2,11/0,03125	1,05/0,03125
G	0/0,01563	1000/0,0156	500/0,0156	250/0,0156	125/0,0156	67,5/0,0156	33,75/0,0156	16,88/0,0156	8,44/0,0156	4,22/0,0156	2,11/0,0156	1,05/0,0156
H	0/0.007815	1000/0.0078	500/0.0078	250/0.0078	125/0.0078	67,5/0.0078	33,75/0.0078	16,88/0.0078	8,44/0.0078	4,22/0.0078	2,11/0.0078	1,05/0.0078

METOBOLİT →

ANTİBİYOTİK↓

Bu sonuçlar doğrultusunda kültür ve kültür ekstreleri arasında Gram negatif bakterilerde bir fark gözlenmezken Gram pozitif bakterilerde aktivite derecesinde fark gözlenmiştir. 45 günlük kültür ekstresinin içerisindeki maddelerin saflaştırılıp elde edilen maddelerin antimikrobiyal etki açısından incelenmesi önerilmektedir. Bu tür çalışmalar yeni antimikrobiyal maddeler elde etmek açısından oldukça değerli çalışmalardır.

BÖLÜM 5

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde, dünya nüfusunun yarıya yakınının önümüzdeki dönemde temiz suya ulaşmakta zorluk çekeceği ve su kıtlığı ile karşı karşıya kalacağı kaçınılmaz bir gerçektir (Özkan, Alkaya & Demirer, 2008). Suyun, sadece insanların değil, tüm canlıların yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmek için kritik bir kaynak olduğu bilinen bir gerçektir.

Algler, hem denizel hem de tatlı su ekosistemlerde önemli rol oynayan birincil üreticilerdir. Antibiyotiklerin algler üzerindeki etkileri, besin zincirindeki diğer organizmaları olumsuz yönde etkileyebilir. Antibiyotiklerin, algler ve sucul çevreye etkilerini araştırmak son derece önemlidir. İnsan kaynaklı, tarımsal, evsel ve endüstriyel atık maddelerinin sucul ekosistemlere ulaşması, su kalitesinde bozulmalara ve sonuç olarak su kirliliğine neden olmaktadır (Sönmez, Hisar, Karataş, Arslan, & Aras, 2008).

Antibiyotiklerin alg kültürlerinin gelişimi üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar giderek artmaktadır. *M. aeruginosa* üzerinde yapılan antibiyotik etkilerini belirleme çalışmaları bulunmakla birlikte, farklı antibiyotik konsantrasyonlarının algal metabolitleri üzerindeki sinerjistik etkilerini inceleyen çalışmalar oldukça azdır. Bu çalışmanın, gelecekte yapılacak benzer çalışmalarla birlikte tek sağlık çalışmalarına önemli bir katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Siyanobakteriler, hem primer hem de sekonder metabolit kaynakları olarak bilinmektedir. Özellikle antimikrobiyal metabolitlerin üreticileri olarak öne çıkmaktadırlar (Carpine & Sieber, 2021). Bu antimikrobiyal metabolitler, alkaloid,

karbonhidrat, lipid, peptid, fenol, poliketid ve protein gruplarını içermektedir (Niedermeyer, 2015; Hershberger, Lee & Chmielewski, 2007). Bunun yanı sıra, taşıdıkları bazı yağ asitlerinin de antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir (Kumar vd., 2019).

Elde ettiğimiz sonuçlarda 45 günlük kültür ekstreleri arasında Gram negatif bakterilerde bir fark gözlenmezken Gram pozitif bakterilerde aktivite derecesinde fark gözlenmiştir. Üssel büyüme fazının başlangıcından seçilmiş olan 45 günlük kültür ekstresinin kültür ekstresinin içerisinde doğal olarak primer metabolitlerin fazla olduğu düşünülmektedir. Bulunan bu etkinin primer metabolitler tarafından yapıldığını söylemek için bu maddelerin saflaştırılıp elde edilen maddelerin antimikrobiyal etki açısından tek tek incelenmesi önerilmektedir.

Şen (2022)'nin yapmış olduğu çalışmanın hipotezi, milyonlarca yıldır çeşitli ekstrem çevrelerde varlığını sürdüren siyanobakterilere ait metabolitlerin, günümüzün önemli bir sorunu olan antibiyotik direncine karşı potansiyel bir çözüm sunabileceği üzerineyken, bizim çalışmamızda *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde gentamisin MİK değerinin 3 kat azaldığı tespit edilmiştir ve Şenin hipotezine ters olarak doğada antibiyotikler ile algal ekstreler sinerjistik aktivite gösterebilirler ve doğal ortamda bu durum antibiyotik direncine neden olabilir mi sorusunu akla getirmektedir. Böyle bir olasılık antibiyotiklerin hedef dışı organizmalar yani ekosistemde doğal olarak bulunan bu canlılar üzerine olumsuz etki yaparak özellikle sucul ekosistemlerin biyolojik çeşitliğinin üzerine negatif etkisinin olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızın iki faklı sonucu bulunmaktadır.

i) Dünya üzerinde var olan antibiyotiklere karşı gelişen direnç bilim adamlarını yeni antibiyotik bulmaya yönlendirmiştir. Siyanobakterilerin metobolitleri yeni antimikrobiyal ajanlara alternatif olabilir.

ii) Diğer bir sonuç ise dünya üzerinde sürekli artan antibiyotik kullanımı ve antibiyotiklerin sucul ekosistemlere dâhil olması ile algal metobolitler ile sinerjistik etki göstermesi ile antiyotik direncine de neden olabileceği yönündedir.

Bu sonuçlar doğrultusunda sucul ekosistemlere atık maddelerin salınımının kontrollü olarak yapılması çevre kirliliği açısından ve günümüzdeki tehlike olan

antibiyotik direncinin önlenmesi açısından önem arz etmektedir. Bununla birlikte, tek sağlık yaklaşımı kapsamında çevresel sulardaki bu olası etkileşimlerin incelemesi, mekanizmalarının aydınlatılması da oldukça önemlidir. Yaptığımız çalışmanın direkt çevresel örneklerden elde edilen alg türleri ile metabolitlerin saf olarak eldesinin sağlanması ile tekrarlanması bu mekanizmaların aydınlatılmasında faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

Abbasoğlu, U., & Çevikbaş, A. (2011). *Farmasötik Mikrobiyoloji*. 1. Baskı. Ankara: Efil.

Ahmad, A., Khan, A., Khan, L. A., & Manzoor, N. (2010). In vitro synergy of eugenol and methyleugenol with fluconazole against clinical *Candida isolates*. *J. Med. Microbiol., 59*(10), 1178-11840.

Ahmad, A., Van Vuuren, S., & Viljoen, A. (2014). Unravelling the complex antimicrobial interactions of essential oils-the case of *Thymus vulgaris* (Thyme). *Molecules, 19*(3), 2896-2910.

Akkan, A. G. (1997). *Antibiyotiklerin Sınıflandırılması*. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu. İstanbul, 2-3 Mayıs, 53-62.

Amber, K., Aijaz, A., Immaculata, X., Luqman, K. A., & Nikhat, M. (2010). Anticandidal effect of ocimum sanctum essential oil and its synergy with fluconazole and ketoconazole. *Phytomedicine*, *17*(12), 921-925.

Aygül, A. (2015). Antibiyotik direncinde dışa atım sistemlerinin ve dirençle mücadelede dışa atım pompa inhibitörlerinin önemi. *Mikrobiyol Bul*., *49*(2), 278-291.

Bernardo, P. H., Chai, C. L., Heath, G. A., Mahon, P. J., Smith, G. D., Waring, P., & Wilkes, B. A. (2004). Synthesis, electrochemistry, and bioactivity of the cyanobacterial calothrixins and related quinones. *Journal of Medicinal Chemistry*, *47*(20), 4958-4963.

Bhowmick, S., Mazumdar, A., Moulick, A., & Adam, V. (2020). Algal metabolites: An inevitable substitute for antibiotics. *Biotechnology advances*, *43*, 107571, 1-17.

Carpine, R., & Sieber, S. (2021). Antibacterial and antiviral metabolites from cyanobacteria: Their application and their impact on human health. *Current Research in Biotechnology, 3*, 65-81.

Chasan, Z. (2022). *Kalsiyum Hidroksit, Klorheksidin Jel, Curcumin(Zerdeçal) Ve Aloe Veranın Kanal İçi Medikament Olarak Kullanıldığında Enterococcus Faecalis Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi*. (Uzmanlık tezi). Marmara Üniversitesi/Diş Hekimliği Fakültesi, İstanbul.

Çelikoğlu, E. (2022). *Farklı Ekolojik Ortamlardan İzole Edilen Siyanobakterilerin Sekonder Metabolitlerinin Tanımlanması.*(Doktora tezi). Eskişehir Teknik Üniversitesi, Eskişehir.

Demay, J., Bernard, C., Reinhardt, A., & Marie, B. (2019). Natural products from cyanobacteria: Focus on beneficial activities. *Marine Drugs, 17*(6), 320.

Demirpek, U. (2012). *Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri*. http://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2012/02/128201112107-49.pdf

Döşler, S., & Gürler, B. (2006). Antimikrobik etkili katyonik peptitlerin tek başına ve kombinasyon halindeki etkilerinin araştırılması. *ANKEM Dergisi, 20*(3), 173-179.

Falaise, C., François, C., Travers, M. A., Morga, B., Haure, J., Tremblay, R., ... & Mouget, J. L. (2016). Antimicrobial compounds from eukaryotic microalgae against human pathogens and diseases in aquaculture. *Marine Drugs, 14*(9), 159.

Giordani, R., Regli, P., Kaloustian, J., Mikail, C., Abou, L., & Portugal, H. (2004). Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans* potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytotherapy Research, 18*(12), 990-995.

Guillard, R. R. L., & Sierachiki, M. S. (2005). Counting Cells in Cultures With the Light Microscope. Pp. 239-252. In: Andersen, R.A. (eds) Algal Culturing Techniques. London: Elsevier Academic.

Harke, M. J., Steffen, M. M., Gobler, C. J., Otten, T. G., Wilhelm, S. W., Wood, S.A., & Paerl, H. W. (2016). A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis sp*. *Harmful Algae, 54*, 4–20.

Hershberger, S. J., Lee, S. G., & Chmielewski, J. (2007). Scaffolds for blocking proteinprotein interactions. *Current Topics in Medicinal Chemistry, 7*(10), 928-942.

Işık, Y. (2008). *Pseudomonas aeruginosa Kökenlerinde Kinolon Direncinin Moleküler Olarak Saptanması.*(Yüksek lisans tezi). Gazi Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

İlter, I. (2017). *Siyanobakterilerden Doğal Renk Maddesi Fikosiyaninin Farklı Yöntemlerle Ekstrakte Edilmesi, Enkapsülasyonu, Model Gıda Sistemleri İçinde Kullanımı Ve Stabilitesinin Belirlenmesi.* (Yüksek lisans tezi). Ege Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Jones, I. D., & Smol, J. P. (eds.) (2023). *Wetzel's Limnology Lake and River Ecosystems*, 4th ed. Amsterdam: Elsevier. https://shop.elsevier.com/books/wetzels-limnology/jones/978-0-12-822701-5 Erişim Tarihi: 10.05.2023.

Kabziński, A. K. M., Juszczak, R., Miękoś, E., Tarczyńska, M., Sivonen, K., & Rapala, J. (2000). The first report about the presence of cyanobacterial toxins in Polish lakes. *Polish Journal of Environmental Studies*, *9*(3), 171.

Karlovsky, P. (2008). Secondary Metabolites in Soil Ecology. Petr Karlovsky (Ed.), *In: Secondary Metabolites in Soil Ecology* (s. 1-19). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Khan, Z., Guelich, G., Phan, H., Redman, R., & Doty, S. L. (2012). Bacterial and yeast endophytes from poplar and willow promote growth in crop plants and grasses. *ISRN Agron*, doi:10.5402/2012/890280

Koca, H. M., Demir, A. N., & Alp, M. T. (2019). İçsularda siyanobakteri artıkları ve oluşturduğu riskler. *Ziraat Mühendisliği, 367*, 25-35.

Korkmaz, N. (2017). *Transrektal Prostat İğne Biyopsisi Yapılan Olgularda Rektal Florada Siprofloksasin Dirençli ve Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Üreten Enterobacteriaceae İle Kolonizasyon ve İşlem Sonrası Gelişen Enfektif Komplikasyonların /Değerlendirilmesi*.(Uzmanlık tezi). Sağlık Bakanlığı Türkiye Kamu Hastaneler Kurumu, Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara.

Kumar, J., Singh, D., Tyagi, M. B., & Kumar, A. (2019). *Cyanobacteria: Applications in Biotechnology. In Cyanobacteria*. Academic Press.

Kuşoğlu, S. (2019). *Microcytis aeruginosa'nın Toksik Peptidlerinin Kromatografik Analizi ve Epitel Hücreleri Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi.* (Yüksek lisans tezi). İstanbul Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Küçük, B. (2020). *Tavuk Orijinli Salmonella Enteritidis Suşlarında Siprofloksasin direncinin araştırılması.* (Yüksek lisans tezi). Ankara Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

Kümmerer, K. (2012). *Antibiotics in the Aquatic Environment.* Keen, P.L. & Montforts, M. H. M. M. (Eds.), *Resistance in the Environment*, Germany.

Lazar, T. (2005). Chemistry of natural products. By S. V. Bhat, B. A. Nagasampagi and M. Sivakumar. *ChemBioChem, 6*(6), 1127-1128. doi:https://doi.org/10.1002/cbic.200500134

Manavoğlu, D. C. (2021). *Microcystis aeruginosa (Kützing) Kützing 1846 Gelişimi Üzerine Ampisilin, Gentamisin ve Siprofloksasin Antibiyotiklerinin Etkileri.* (Yüksek lisans tezi). Trakya Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.

Mazard, S., Penesyan, A., Ostrowski, M., Paulsen, I. T., & Egan, S. (2016). Tiny microbes with a big impact: The role of cyanobacteria and their metabolites in shaping our future. *Marine Drugs*, *14*(5), 97.

Niedermeyer, T. H. J. (2015). Anti-infective natural products from cyanobacteria. *Planta Medica*, *81*(15), 1309-1325.

Soltani, N., Khavari-Nejad, R. A., Tabatabaei Yazdi, M., Shokravi, S., & Fernández-Valiente, E. (2005). Screening of soil Cyanobacteria for antifungal and antibacterial activity. *Pharmaceutical Biology, 43,* 455–459.

Özkan, L., Alkaya, E., & Demirer, G. N. (2008). Suyun geri kazanımı ve yeniden kullanımı. *Toplum ve Hekim, 23*, 69-74.

Özseven Gül, A., Çetin Sesli, E., & Özseven, L. (2012). Dama tahtası sinerji testi sonuçlarının farklı yöntemlerle yorumlanması sonuçlarımızı etkiliyor mu? *Mikrobiyol. Bul., 46*(3), 410-20.

Pearson, L., Mihali, T., Moffitt, M., Kellmann, R., & Neilan, B. (2010). On the chemistry, toxicology and genetics on the Cyanobacterial toxins, Microcystin, nodularin, Saxitoxin and silindrospermopsin. *Marine Drugs*, *8*(5), 1650-1680.

Rao, P. V. L., Bhattacharya, R., Parida, M. M., Jana, A. M., & Bhaskar, A. S. B. (1998). Freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (UTEX 2385) induced DNA damage *in vivo and in vitro. Environmental Toxicology and Pharmacology*, 1–6.

Raveh, A., & Carmeli, S. (2007). Antimicrobial Ambiguines from the Cyanobacterium *Fischerella* sp. *collected in Israel*. *J. Nat. Prod*., *70*, 196–201.

Rodrigues, F. F., Costa, J. G., & Coutinho, H. D. (2009). Synergy effects of the Antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*. *Phytomedicine, 16*(11), 1052-1055.

Safran, E. (2017). *Atıksulardan Cr(vı) Gideriminde Termofil Mikroalg Ve Siyanobakterilerin Kullanımı.* (Yüksek lisans tezi). Ankara Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Schirrmeister, B. E., Sanchez-Baracaldo, P., & Wacey, D. (2016). Cyanobacterial evolution during the Precambrian. *International Journal of Astrobiology*, *15*(3), 187-204.

Smith, V. J., Desbois, A. P., & Dyrynda, E. A. (2010). Conventional and unconventional antimicrobials from fish, marine invertebrates and micro-algae. *Mar. Drugs*, *8*, 1213–1262.

Sönmez, A. Y., Hisar, O., Karataş, M., Arslan, G., & Aras, M. S. (2008). Su Bilgileri. *Büyük Menderes Havzası'nda Yaşayan Balıklar Üzerinde Nehir Suyu Kalitesinin Etkileri Üzerine Bir Araştırma, Türkiye.* Ankara: Nobel.

Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M., & Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological reviews*, *35*(2), 171-205.

Straub, C., Quillardet, P., Vergalli, P., Tandeau de Marsac, N., & Humbert, J. (2011). A day in the life of *Microcystis aeruginosa* strain PCC 7806 as revealed by a transcriptomic analysis, *PLoS One*, *6*(1), e16208. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016208

Sun, L., Wang, S., Zhao, M., Fu, X., Gong, X., Chen, M., & Wang, L. (2009). *Phycobilisomes from Cyanobacteria.* Handbook on Cyanobacteria: Biochemistry, Biotechnology and Application. *New York: Nova Science*.

Şen, E. (2022). *Karahayıt-Denizli Kaplıcalarındaki Siyanobakteri Çeşitliliği, Antimikrobiyal Aktivitesi ve Yağ Asidi Profillerinin İncelenmesi*. (Yüksek lisans tezi). Eskişehir Teknik Üniversitesi/Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Eskişehir.

Topal, M., Uslu Şenel, G., Arslan Topal, E., I., & Öbek, E. (2015). Antibiyotikler ve kullanım alanları. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 31*(3),121-127.

Uras, İ. S. (2021). *Aspergillus Terreus ve Aspergillus Costaricaensis Mantarları Üzerine Farmakognozik Araştırmalar.* (Doktora tezi). Ankara Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Vijayakumar, S., & Menakha, M. (2015). Pharmaceutical applications of cyanobacteria-A review. *Journal of Acute Medicine, 5*(1), 15-23.

Walsby, A. E. (1987). Mechanisms of buoyancy regulation by planktonic cyanobacteria with gas vesicles. *The Cyanobacterial*, 377-414.

Weis, Y. H., & Pang, C., Y. (2010). The role of mitocondria in human aging process. *Biotech International, 17*, 8-13.

Wiese, M., D'Agostino, P.M., Mihali, T. K., Moffitt, M. C., & Neilan, B. A. (2010). Neurotoxic alkaloids: Saxitoxin and its analog. *Marine Drugs, 8*, 2185- 2211.

Whitton, A., & Potts, M. (2000). *The Ecology of Cyanobacteria*. Netherlands: Kluwer Academic.

Ye, J., Huang, C., Shang, A., Xu, C., & Wu, L. (2020). Characteristics of toxin production and release in *Microcystis aeruginosa* exposed to three tetracycline antibiotics. Environmental Science and Pollution Research, *27*(14), 16798-16805. doi: 10.1007/s11356-020-08253-x

ÖZGEÇMİŞ

Ebru TOKDEMİR, İlköğretimi Havsa Atatürk İlköğretim Okulu'nda, liseyi Edirne Anadolu Teknik Lisesi'nde tamamladı. 2017 yılında Balıkesir Üniversitesi Necatibey Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Öğretmenliği Bölümü'nden, mezun oldu. 2019 yılında Mimarsinan Ortaokulunda öğretmen olarak göreve başladı. 2020 yılında Trakya Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladı. 2020 yılında Faika Erkut Özel Eğitim okulunda, 2022 yılında Trakya Üniversitesi Armağan Dönertaş Engelli Çocuklar Eğitim Uygulama okulunda görev aldı. 2023 yılında 2. Beyazıd Özel Eğitim Uygulama okulunda görevini sürdürmektedir.