

**BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ❖ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İZMİR ÇAMALTI TUZLASINDAN İZOLE EDİLEN HALOFİLİK  
MİKROALGLERİN MOLEKÜLER VE MORFOLOJİK TAKSONOMİSİ İLE  
STRES FAKTÖRLERİNE FİZYOLOJİK YANITLARI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Vesile Esra DÖKÜMCÜOĞLU**

**Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**TEMMUZ 2018**



**BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ❖ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İZMİR ÇAMALTI TUZLASINDAN İZOLE EDİLEN HALOFİLİK  
MİKROALGLERİN MOLEKÜLER VE MORFOLOJİK TAKSONOMİSİ İLE  
STRES FAKTÖRLERİNE FİZYOLOJİK YANITLARI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Vesile Esra DÖKÜMCÜOĞLU  
(182083101)**

**Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mete YILMAZ  
Eş Danışman: Doç. Dr. Arpat ÖZGÜL**

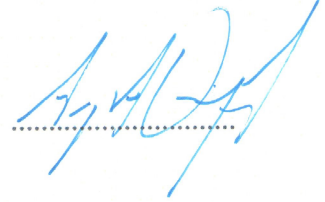
**TEMMUZ 2018**

BTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 182083101 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Vesile Esra DÖKÜMCÜOĞLU, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "İzmir Çamaltı Tuzlasından İzole Edilen Halofilik Mikroalglerin Moleküler ve Morfolojik Taksonomisi ile Stres Faktörlerine Fizyolojik Yanıtları" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

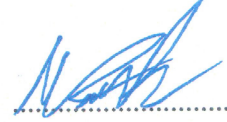
**Tez Danışmanı :** Doç. Dr. Mete YILMAZ  
Bursa Teknik Üniversitesi



**Eş Danışman :** Doç. Dr. Arpat ÖZGÜL  
Zürich Üniversitesi



**Jüri Üyeleri :** Doç. Dr. Muharrem BALCI  
İstanbul Üniversitesi



**Dr. Öğr. Üyesi Gökçe TANER**  
Bursa Teknik Üniversitesi



**Savunma Tarihi :** 09.07.2018

**FBE Müdürü :** Doç. Dr. Murat ERTAŞ  
Bursa Teknik Üniversitesi

.....  
...../...../.....

## İNTİHAL BEYANI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belgelediğimi, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Vesile Esra DÖKÜMCÜOĞLU



*Aileme,*

## ÖNSÖZ

Bu tezin oluşum aşamasında bilgi ve tecrübeleri ile beni geliştiren, yol gösteren, gerekli olan her türlü imkanı sağlayarak en büyük katkıyı sağlayan, her açıdan desteklerini esirgemeyen değerli tez danışman hocam Sayın Doç.Dr. Mete YILMAZ'a

Binlerce kilometre mesafeye rağmen bilgilerini benimle paylaşan, farklı bakış açıları ile bakmamı ve tezimi zenginleştirmemi sağlayan değerli eş danışmanım Sayın Doç.Dr. Arpat ÖZGÜL'e

Bu tez Doç.Dr. Mete Yılmaz'ın yürütücüsü olduğu TÜBİTAK 1001 programı 114Z274 no'lu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir. Maddi desteğinden dolayı TÜBİTAK'a,

Tez çalışmamın laboratuvarında yürütülmesi aşamasında bana destek ve yardımcı olan değerli arkadaşlarım Kübra ŞENTÜRK'e ve Cem DİRLİK'e

Tez çalışmamın yürütülmesi ve yazım aşamasında manevi desteğini esirgemeyen arkadaştan öte kan bağımlı olmayan kardeşim Ayşe Gül BAL'a

Öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi hep yanımda olan, sevgi ve desteklerini bir an olsun ayırmayan Aileme

Sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim.

Temmuz 2018

Vesile Esra DÖKÜMCÜOĞLU

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
KISALTMALAR .....	vii
SEMBOLLER .....	viii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xii
SUMMARY .....	xiii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI .....</b>	<b>4</b>
2.1 <i>Dunaliella</i> 'nın Taksonomisi ve Moleküler Sistematiği .....	4
2.2 <i>Dunaliella</i> Türlerinin Özellikleri ve Çevresel Koşullara Verdiği Fizyolojik Yanıtlar .....	7
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....</b>	<b>14</b>
3.1 Mikroalg Suşları ve Kültür Ortamları .....	14
3.2 Moleküler Analizler .....	27
3.2.1 Genomik DNA izolasyonu.....	27
3.2.2 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR).....	28
3.3 Biyoinformatik Analizler .....	28
3.4 Mikroalg Kültürlerinin Farklı Tuzluluklara Aklımasyonu.....	29
3.5 Işık Etkisinde Renk Değişimlerinin Saptanması .....	31
3.6 Seçilen <i>Dunaliella</i> Suşlarının Farklı Tuzluluklarda Büyüme Özellikleri .....	32
3.7 Total Karotenoid Miktarının Belirlenmesi .....	33
3.8 <i>Dunaliella</i> Suşlarına Işık Yoğunluğu, Sıcaklık ve Tuzluluğun Etkilerinin İncelendiği Faktöriyel Deney Tasarımı .....	34
3.9 İstatiksel Analizler.....	38
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>39</b>
4.1 Morfolojik ve Genetik Özelliklerine Göre AQUAMEB <i>Dunaliella</i> Suşlarının Karakterizasyonu .....	39
4.2 <i>Dunaliella</i> AQUAMEB Suşlarının Fizyolojik Özellikleri.....	45
4.2.1 Suşların farklı tuzluluklarda büyüme özellikleri .....	45
4.2.2 Total karotenoid ölçümleri.....	57
4.3 Işık Yoğunluğu, Sıcaklık ve Tuzluluğun <i>Dunaliella sp.</i> AQUAMEB Suşlarının Büyümesine Etkisi.....	58
<b>5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....</b>	<b>66</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>69</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>74</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>79</b>



## **KISALTMALAR**

<b>ATCC</b>	: American Type Culture Collection, VA, USA
<b>CCAP</b>	: Culture Collection of Algae and Protozoa, Scotland, UK
<b>CCMP</b>	: Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton, Canada
<b>CONC</b>	: Coleccion de Cultivos de Microalgas, Universidad de Concepcion, Chile
<b>DNA</b>	: Deoksiribo Nükleik Asit
<b>ITS</b>	: Internal Transcribed Spacer
<b>ML</b>	: Maksimum Likelihood
<b>MUR</b>	: Murdoch University Microalgae Culture Collection
<b>NJ</b>	: Neighbor Joining
<b>NOR</b>	: Nükleor Organizatör Bölge
<b>nrDNA</b>	: Nükleer Ribozomal DNA
<b>PZR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonları
<b>RFLP</b>	: Restriksiyon Fragmentlerinin Uzunluk Polimorfizmi
<b>RNA</b>	: Ribo Nükleik Asit
<b>rRNA</b>	: Ribozomal RNA
<b>UTEX</b>	: Culture Colellection of Algae the University of Texas at Austin,USA

## SEMBOLLER

<b><math>\beta</math></b>	: Beta
<b>bp</b>	: Baz çifti
<b><math>^{\circ}\text{C}</math></b>	: Santigrat derece
<b><math>\text{CO}_2</math></b>	: Karbondioksit
<b><math>\text{H}_2\text{O}</math></b>	: Hidrojen Dioksit (Su)
<b>kb</b>	: Kilobaz
<b><math>\mu\text{m}</math></b>	: Mikrometre
<b><math>\mu\text{g}</math></b>	: Mikrogram
<b><math>\mu\text{l}</math></b>	: Mikrolitre
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>M</b>	: Molar
<b><math>\text{MgCl}_2</math></b>	: Magnezyum klorür
<b><math>\text{NaCl}</math></b>	: Sodyum Klorür
<b><math>\text{NaNO}_3</math></b>	: Sodyum Nitrat
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>ppt</b>	: Binde bir

## ÇİZELGE LİSTESİ

### Sayfa

<b>Çizelge 2.1</b> : Bazı Dunaliella türlerine ait ITS-1, ITS-2 ve toplam ITS gen bölgesi uzunlukları (bp), yüzde GC bazı içerikleri (González ve diğ., 2001). .....	<b>7</b>
<b>Çizelge 3.1</b> : L1 Ortamı (Guillard ve Hargraves, 1993).....	<b>25</b>
<b>Çizelge 3.2</b> : L1 ortamı tuzluluk değerleri hesaplamalarına göre stok çözelti miktarları .....	<b>26</b>
<b>Çizelge 3.3</b> : Aşamalı olarak gerçekleştirilen tuzluluk değişimleri. Koyu olarak belirtilenler başlangıç tuzluluk değerleridir. ....	<b>30</b>
<b>Çizelge 4.1</b> : BTÜ Alg ve Siyanobakteri Kültür Koleksiyonu Dunaliella spp. suşlarından tez çalışmasında kullanılanların bazı morfolojik ve fizyolojik özellikleri. ....	<b>40</b>
<b>Çizelge 4.2</b> : ITS genleri için 24 farklı nükleotid değişim modelinin Maksimum Olabilirlik uyumu. ....	<b>43</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 3.1 : AQUAMEB-1, <i>Cryptophyceae</i> , mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir türdür, 75 ppt tuzluluktan izole edilmiştir.....	14
Şekil 3.2 : AQUAMEB-2, <i>Dunaliella sp.</i> , mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir türdür, 165 ppt tuzluluktan izole edilmiştir.....	15
Şekil 3.3 : AQUAMEB-4, <i>Dunaliella sp.</i> , mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir suştur, 163 ppt tuzluluktan izole edilmiştir.....	15
Şekil 3.4 : AQUAMEB-5, <i>Dunaliella sp.</i> , mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir suştur, 152 ppt tuzluluktan izole edilmiştir.....	16
Şekil 3.5 : AQUAMEB-6, <i>Dunaliella sp.</i> , mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir suştur, 178 ppt tuzluluktan izole edilmiştir.....	16
Şekil 3.6 : AQUAMEB-7, <i>Dunaliella sp.</i> , mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir suştur, 178 ppt tuzluluktan izole edilmiştir.....	17
Şekil 3.7 : AQUAMEB-8, <i>Dunaliella sp.</i> , mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir suştur, 285 ppt tuzluluktan izole edilmiştir.....	17
Şekil 3.8 : AQUAMEB-9, <i>Dunaliella sp.</i> , mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir suştur, 285 ppt tuzluluktan izole edilmiştir.....	18
Şekil 3.9 : AQUAMEB-11, <i>Dunaliella sp.</i> , mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir suştur, 285 ppt tuzluluktan izole edilmiştir.....	18
Şekil 3.10 : AQUAMEB-12, <i>Dunaliella sp.</i> , mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir suştur, 98 ppt tuzluluktan izole edilmiştir.....	19
Şekil 3.11 : AQUAMEB-13, <i>Dunaliella sp.</i> , mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir suştur, 98 ppt tuzluluktan izole edilmiştir.....	19
Şekil 3.12 : AQUAMEB-14, <i>Dunaliella sp.</i> , mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir suştur, 274 ppt tuzluluktan izole edilmiştir.....	20
Şekil 3.13 : AQUAMEB-15, <i>Dunaliella sp.</i> , mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir suştur, 274 ppt tuzluluktan izole edilmiştir.....	20
Şekil 3.14 : AQUAMEB-16, <i>Dunaliella sp.</i> , mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir türdür, 270 ppt tuzluluktan izole edilmiştir.....	21
Şekil 3.15 : AQUAMEB-17, <i>Tetraselmis sp.</i> , mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir türdür.....	21
Şekil 3.16 : AQUAMEB-18, <i>Dunaliella sp.</i> , mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir suştur.....	22
Şekil 3.17 : AQUAMEB-20, <i>Dunaliella sp.</i> , mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir suştur Tuz Gölünden izole edilmiştir.....	22
Şekil 3.18 : AQUAMEB-21, <i>Dunaliella sp.</i> , mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir suştur Tuz Gölünden izole edilmiştir.....	23
Şekil 3.19 : AQUAMEB-22, <i>Tetraselmis sp.</i> , mikroskop görüntüsü.....	23
Şekil 3.20 : AQUAMEB-49, <i>Dunaliella sp.</i> , mikroskop görüntüsü.....	24
Şekil 3.21 : Utermöhl görüntüsü.....	30
Şekil 3.22 : Tez çalışmasında kullanılan mikroalg suşlarının renk değişimlerini saptamak amacıyla oluşturulan ışık deneyi düzeneği .....	32

<b>Şekil 3.23</b> : Dokuz <i>Dunaliella</i> suşunun farklı tuzluluklarda büyümelerinin incelendiği deneylerde kültür kaplarının iklim kabini içerisindeki görüntüsü. ....	<b>33</b>
<b>Şekil 3.24</b> : 23 °C, 50 ppt ve 50 µmol ışık yoğunluğundaki denemede kullanılan plaka yerleşimi. Kenar kuyucuklar (gri) saf su ile doldurulmuştur. ....	<b>35</b>
<b>Şekil 3.25</b> : Faktöriyel dizayn deneyinde kullanılan türlerin plate içerisindeki gösterimi.....	<b>37</b>
<b>Şekil 4.1</b> : Bazı AQUAMEB <i>Dunaliella sp.</i> suşlarının 4 hafta 120 µmol. foton. m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> ışığa maruz bırakıldıktan sonra çekilmiş resmi.....	<b>41</b>
<b>Şekil 4.2</b> : <i>Dunaliella sp.</i> AQUAMEB suşlarının ITS genlerine dayalı Neighbour Joining (NJ) yöntemi ile elde edilen filogenetik ağacı. ....	<b>42</b>
<b>Şekil 4.3</b> : <i>Dunaliella sp.</i> AQUAMEB suşlarının birbirleriyle ve dünyadaki benzerleri ile ilişkilerini gösteren ve ITS gen dizilerine dayalı ML filogenetik ağacı.....	<b>44</b>
<b>Şekil 4.4</b> : <i>Dunaliella sp.</i> AQUAMEB-2 suşunun 750 nm'deki optik yoğunluklarına (OD) göre farklı tuzluluklarda büyüme eğrileri. ....	<b>46</b>
<b>Şekil 4.5</b> : <i>Dunaliella sp.</i> AQUAMEB-4 suşunun 750 nm'deki optik yoğunluklarına (OD) göre farklı tuzluluklarda büyüme eğrileri. ....	<b>48</b>
<b>Şekil 4.6</b> : <i>Dunaliella sp.</i> AQUAMEB-6 suşunun 750 nm'deki optik yoğunluklarına (OD) göre farklı tuzluluklarda büyüme eğrileri.....	<b>49</b>
<b>Şekil 4.7</b> : <i>Dunaliella sp.</i> AQUAMEB-8 suşunun 750 nm'deki optik yoğunluklarına (OD) göre farklı tuzluluklarda büyüme eğrileri. ....	<b>50</b>
<b>Şekil 4.8</b> : <i>Dunaliella sp.</i> AQUAMEB-13 suşunun 750 nm'deki optik yoğunluklarına (OD) göre farklı tuzluluklarda büyüme eğrileri. ....	<b>51</b>
<b>Şekil 4.9</b> : <i>Dunaliella sp.</i> AQUAMEB-14 suşunun 750 nm'deki optik yoğunluklarına (OD) göre farklı tuzluluklarda büyüme eğrileri. ....	<b>52</b>
<b>Şekil 4.10</b> : <i>Dunaliella sp.</i> AQUAMEB-18 suşunun 750 nm'deki optik yoğunluklarına (OD) göre farklı tuzluluklarda büyüme eğrileri. ....	<b>54</b>
<b>Şekil 4.11</b> : <i>Dunaliella sp.</i> AQUAMEB-21 suşunun 750 nm'deki optik yoğunluklarına (OD) göre farklı tuzluluklarda büyüme eğrileri.....	<b>55</b>
<b>Şekil 4.12</b> : <i>Dunaliella sp.</i> AQUAMEB-49 suşunun 750 nm'deki optik yoğunluklarına (OD) göre farklı tuzluluklarda büyüme eğrileri. ....	<b>56</b>
<b>Şekil 4.13</b> : Büyüme deneylerinde alınan örneklerin total karotenoid ölçümleri. Aynı tuzluluktaki her tür farklı renklerle gösterilmiştir.....	<b>57</b>
<b>Şekil 4.14</b> : <i>Dunaliella sp.</i> AQUAMEB-2 suşunun farklı sıcaklık, ışık yoğunluğu ve tuzluluk değerlerinde büyüme grafikleri. ....	<b>59</b>
<b>Şekil 4.15</b> : <i>Dunaliella sp.</i> AQUAMEB-4 suşunun farklı sıcaklık, ışık yoğunluğu ve tuzluluk değerlerinde büyüme grafikleri. ....	<b>61</b>
<b>Şekil 4.16</b> : <i>Dunaliella sp.</i> AQUAMEB-8 suşunun farklı sıcaklık, ışık yoğunluğu ve tuzluluk değerlerinde büyüme grafikleri. ....	<b>62</b>
<b>Şekil 4.17</b> : <i>Dunaliella sp.</i> AQUAMEB-21 suşunun farklı sıcaklık, ışık yoğunluğu ve tuzluluk değerlerinde büyüme grafikleri. ....	<b>64</b>
<b>Şekil 4.18</b> : <i>Dunaliella sp.</i> AQUAMEB-49 suşunun farklı sıcaklık, ışık yoğunluğu ve tuzluluk değerlerinde büyüme grafikleri. ....	<b>65</b>

# İZMİR ÇAMALTI TUZLASINDAN İZOLE EDİLEN HALOFİLİK MİKROALGLERİN MOLEKÜLER VE MORFOLOJİK TAKSONOMİSİ İLE STRES FAKTÖRLERİNE FİZYOLOJİK YANITLARI

## ÖZET

Halofilik ve halotolerant mikroorganizmalar yüksek tuz derişimlerine toleranslarından ötürü biyoteknolojinin çeşitli alanlarında yoğun üretim için uygundur. Yüksek tuz derişimleri mikrobiyal kontaminasyonu ve tatlı su kullanımını azalttığı gibi, bu tuzluluklarda yaşayan mikroorganizmaların benzersiz metabolitleri de olabilmektedir. Bu doğrultuda tez çalışmasında, İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan izole edilmiş 20 mikroalg suşunun öncelikle genetik ve morfolojik özellikleri belirlenerek hangi türlere ait oldukları belirlenmiştir. Genetik ve morfolojik farklılık gösteren suşlardan 9'u tuzluluk tolerans deneylerine tabii tutulmuş; farklı tuzluluklarda büyüme ve total karotenoid üretimleri incelenmiştir. Bu deneylerden seçilen ve genetik farklılık gösteren 5 suş ise sıcaklık, tuzluluk ve ışık yoğunluğunun etkilerinin faktöriyel tasarımla incelendiği büyüme deneylerine tabii tutulmuştur. Böylece tez çalışmasında kullanılan halofilik mikroalg suşlarından biyoteknolojide kullanım ve yoğun üretim için en uygun potansiyele sahip olanlar belirlenmiştir.

Tez çalışmasında kullanılan *Dunaliella* suşları boy x en aralıklarına göre büyük (8-20  $\mu\text{m}$  x 6-18  $\mu\text{m}$ ) orta (4-12  $\mu\text{m}$  x 3-10  $\mu\text{m}$ ) ve küçük (4-10  $\mu\text{m}$  x 3-7  $\mu\text{m}$ ) formlardan oluşmuştur. Morfolojik özelliklerine göre üç gruba ayrılan bu suşlar, internal transcribed spacer (ITS) gen dizilerinin filogenetik analizinde de üç gruba ayrılmış ve büyük formlar *Dunaliella salina*, küçük formlar ise *D. viridis* benzeri olarak tanımlanmıştır. Orta boyuttaki suşların ITS gen dizileri, *Dunaliella* taksonomisi ve sistematikindeki problemlerden ötürü, tür bazında tanımlama yapmaya yeterli olmamıştır. Genetik ve morfolojik farklılığa sahip 9 *Dunaliella* suşu 7 farklı tuzluluğu da (37 ppt-175 ppt) tolere edebilmiş, ancak farklı büyüme eğrilerine sahip olmuştur. Bu deneylerde en yüksek total karotenoid üretimi diğer suşlardan 2-5 kat fazla üretime sahip *D. salina* AQUAMEB-21 suşunda görülmüştür. Buradan seçilen 5 suşun 27 farklı sıcaklık, tuzluluk ve ışık yoğunluğu kombinasyonuna tabii tutulduğu büyüme deneylerinde ise suşlarda farklı tuzluluk ve sıcaklık optimumları tespit edilse de, en iyi büyüme değerleri yüksek ışık yoğunluklarında (150 ve 300  $\mu\text{mol. foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) görülmüştür. Her suş için optimum koşullarda elde edilen biyomas değerleri birbirine yakındır ve her biri farklı özelliklerine göre (Ör: pigment, protein, yağ asidi üretimi) biyoteknolojide kullanım potansiyeline sahiptir.

**Anahtar kelimeler:** *Dunaliella* sp., Faktöriyel Tasarım, Halofil, ITS geni, Tuzluluk, Sistematik

# MOLECULAR AND MORPHOLOGICAL TAXONOMY AND PHYSIOLOGICAL RESPONSES TO STRESS FACTORS OF HALOPHILIC MICROALGAE ISOLATED FROM ÇAMALTI SALTEN, IZMIR

## SUMMARY

Halophilic and halotolerant microorganisms are suitable candidates for use in mass production in various biotechnological fields due to their tolerances to high salinities. Highly saline conditions do not only reduce microbial contamination and freshwater use, but microorganisms living in these conditions may have unique metabolites. Accordingly, in this thesis study, genetic and morphological characteristics of 20 microalgae strains isolated from İzmir Çamaltı saltern were determined to identify their species. Nine strains showing genetic and morphological variations were chosen to test their salinity tolerances, to determine their growth and total carotenoid production in various salinity levels. Five strains with genetic and morphological differences and chosen from these experiments were further grown in a factorial design experiment testing the effects of salinity, temperature and light intensity. Therefore halophilic microalgae strains with the best potential to be used in biotechnology and mass production were determined in this thesis study.

*Dunaliella* strains used in this work were grouped into three forms based on their length x width ranges: Big forms (8-20 µm x 6-18 µm), medium forms ((4-12 µm x 3-10 µm), and small forms (4-10 µm x 3-7 µm). These strains, grouped into three according to their morphological characters, also clustered into three groups based on the sequences of their internal transcribed spacer genes. Big forms were identified as *Dunaliella salina*, and small forms were identified as *D. viridis*-like. However, due to inherent problems associated with *Dunaliella* taxonomy and systematics, ITS gene sequences were not enough to assign species names to medium forms. Nine *Dunaliella* strains with genetic and morphological differences tolerated all seven salinity levels (37 ppt to 175 ppt) tested, however with different growth curves. In these experiments highest total carotenoid production was seen in *D. salina* AQUAMEB-21 with 2 to 5 times more production than other strains. Further selected 5 strains were grown in 27 different combinations of salinity, temperature and light intensity. Although results suggested different salinity and temperature optima for these strains, best growth was always observed in high light intensities (150 ve 300 µmol. foton.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>). For all tested strains, biomass values obtained under optimal conditions were similar and each of these strains have the potential to be used in biotechnology for their various characteristics such as pigment, protein or fatty acid production.

**Keywords:** *Dunaliella* sp., Factorial design, Halophile, ITS gene, Salinity, Systematics.

## 1. GİRİŞ

Mikroalgler, tek hücreli formlardan ipliksi formlara kadar farklı morfolojilere sahip mikroorganizmalardır (Round, 1973). Çoğunluğu ökaryotik hücre yapısına sahip olmasına rağmen, prokaryotik yapıdaki siyanobakteriler de geleneksel olarak mikroalg grupları içinde gösterilmektedir (Javor,1989). Mikroalgler, fotosentetik oksijen üretimleri ile atmosferdeki O<sub>2</sub>'nin büyük bir kısmını üretirler. Aynı zamanda atmosferden tutulan karbon ve azotun büyük çoğunluğu da bu mikroorganizmalar sayesinde dengelenir. Evrimsel süreçte üç milyar yıldan daha uzun geçmişe sahip olan bu canlılar (Ör: siyanobakteriler) tek hücreli yapılarına rağmen kompleks özellikler gösterebilmektedir. Bu fotosentetik canlılar güneş enerjisi ve yapılarındaki pigment maddeleri ile atmosferik CO<sub>2</sub>'i inorganik moleküllere dönüştürerek tüm sucul ortamlarda primer üretici olarak görev yaparlar (Guedes ve diğ., 2011).

Her ne kadar morfolojik, sitolojik ve üreme özellikleri bakımından diğer bitkilerle farklılık gösterse de, biyokimyasal yapı ve mekanizmalarının benzer olduğu görülmektedir. Örneğin; klorofil-a ve diğer pigmentler yoluyla çalışan fotosentetik sistemleri, besin ihtiyaçları ve karbon asimilasyonunun son ürünleri (karbonhidratlar ve proteinler) yüksek bitkiler ile benzerlik göstermektedir. Bitkilere benzer özellikleri ve bitkilerden daha hızlı büyüebilmeleri mikroalglerin gıda, eczacılık ve biyoteknoloji sektörlerinde kullanımının önünü açmıştır (Becker, 1994). Örneğin tek hücreli bir mikroalg olan *Chlorella sp.* yüksek protein içeriği sebebiyle insan gıda takviyesi ve hayvan yemi olarak kullanılmaktadır (Becker, 2007). Yine bazı yeşil mikroalgler ile diatomlar akuakültür sistemlerinde kullanılmaktadır (Merz ve Main, 2014). Afrika'da soda göllerinde çoğalan ve yerel halkın kurutarak gıda olarak tükettiği *Arthrospira (Spirulina)* artık pek çok ülkede ticari olarak üretilmekte, gıda ve yem sanayiinde kullanılmaktadır (Gershwin ve diğ., 2007). Bazı mikroalgler aynı zamanda çok değerli metabolitler de üretmektedirler. Bunlar arasında tıp alanında kullanılan ilaç hammaddeleri olduğu gibi, gıda ve yem sektörlerinde kullanılan karotenoid ve fikobiliproteinler gibi pigment maddeleri de sayılabilir (Chu, 2012).



Mikroalgler tatlısu sistemlerinden, okyanuslara; çeşitli karasal ortamlardan kutuplara kadar çok farklı ekosistemlerde dağılım göstermektedir (Tomaselli, 2004). Bazı türler ise yüksek ışık yoğunluğu (Ör: *Chroococciopsis sp.*), tuzluluk (Ör: *Dunaliella sp.*) ve sıcaklık (Ör: *Synechococcus lividus*) gibi ekstrem koşulları tolere edebilmektedir (Oren, 2005). Ekstrem koşullarda yaşayan mikroalgler biyoteknolojinin çeşitli alanlarında kullanımda bazı avantajlar sağlamaktadır. Örneğin yüksek sıcaklıkları tolere edebilen bir mikroalgin açık alanlarda yoğun üretimi çöl ikliminde gerçekleştirilebilir. Diğer taraftan yüksek tuzluluk toleransına sahip türler, tatlısu kullanımı ve buharlaşma ile kaybedilen su ilavesi olmadan üretilebilir.

Tüm potansiyellerine rağmen, mevcut binlerce mikroalg türünden sadece çok azı detaylı olarak incelenmiş ve ticari olarak kullanılmaktadır. Farklı mikroalg türlerinin birbirinden çok farklı özellikleri olduğu bilinmektedir. Aynı türe ait farklı suşlar dahi genetik farklılıklarından ötürü biyokimyasal içerikleri ve çevre toleransları açısından farklılık gösterebilmektedir. Dolayısıyla sucul ortamlardan yeni tür ve suşların izole edilerek detaylı karakterizasyonu farklı endüstriyel ve biyoteknolojik kullanımlarının önünü açabilecektir. Bu tür çalışmalar alglerden biyodizel hammaddesi elde edilmesi, biyoremediasyon ve ilaç hammaddesi tespitinde yoğun olarak devam etmektedir.

Mikroalg kültür koleksiyonları yerel veya dünya çapında toplanmış örneklerden izole edilen mikroalg suşlarının canlı olarak korunduğu merkezlerdir. Bu tür merkezlerden elde edilen mikroalg suşları ile yapılan bilimsel çalışmalar bitki genetiği, biyokimyası ve fizyolojisi konusunda çığır açan model organizmalar ortaya çıkarmıştır (Ör: *Chlamydomonas sp.*). Diğer taraftan biyoteknolojik kullanıma sahip veya üzerinde yoğun araştırmalar devam eden türler bu tür merkezlerden temin edilebilmektedir. Dolayısıyla her ülke kendi mikrobiyal çeşitliliğini belirlemek, koruma altına almak ve yararlanmak için bu tür kültür koleksiyonları oluşturmaktadır.

Kültür koleksiyonlarına dâhil edilen türler geleneksel olarak morfolojik özelliklerine göre sınıflandırılmıştır. Genetik yöntemlerin ortaya çıkması ve yaygınlaşması ile diğer canlılarda olduğu gibi, mikroalglerde de bazı gen bölgelerine dayalı (Ör: rRNA küçük alt ünite bölgesi) moleküler sistematik teknikler yaygınlaşmaya başlamıştır (Hamby ve Zimmer, 1992). Ancak moleküler yöntemlerin kullanımı ile mikroalg sistematğinde yeni problemler ortaya çıkmıştır. Bu çalışmalarla, klasik taksonomik yöntemlere göre sınıflandırılması yapılmış pek çok kültür koleksiyonu türü için

genetik sınıflandırma ile klasik taksonominin uyuşmadığı ortaya çıkmıştır (Borowitzka ve Siva, 2007). Bunun başlıca sebepleri arasında mikroalglerin morfolojik esnekliğe sahip olması, farklı çevresel koşulların mikroalg morfolojisi ve fizyolojisini değiştirmesi, sistematikte kullanılan gen bölgelerinin evrimsel olarak korunmuş olması (değişmemiş olması) gibi faktörler sayılabilir (González ve diğ., 1998). Günümüzde de mikroalg taksonomisi ile sistematiği arasındaki problemler devam etmektedir. Güncel yaklaşım, mikroalgleri sadece morfolojik özelliklerine göre değil; fizyolojilerini ve genetik özelliklerini de inceleyen polifazik bir yaklaşımla değerlendirerek sınıflandırmaları yapmaktır (Cifuentes ve diğ., 2001).

Fizyolojik özelliklerin belirlenmesi için izole edilmiş mikroalglerin büyüme özelliklerinin belirlenmesi, tolerans aralıklarının tespiti, pigmentlerinin karakterizasyonu önerilen güncel yaklaşımlar arasındadır (Oren, 2005). Moleküler sistematikte ise rRNA büyük ve küçük alt ünitelerinin nükleotid dizilerinin karşılaştırılması farklı cinsler arasında ayırım yapmayı sağlasa da, aynı cinse veya türe ait suşlar arasında ayırımı zorlaştırmaktadır (Hamby ve Zimmer, 1992). Bu sebeple, daha değişken gen bölgeleri (Ör: ITS) kullanılmalı ve mümkünse genom dizilemeleri yapılmalıdır.

Bu tez çalışmasında, İzmir Çamaltı Tuzlasından izole edilmiş ve Bursa Teknik Üniversitesi Alg ve Siyanobakteri Kültür Koleksiyonunda yer alan halofilik mikroalg türlerinin polifazik yaklaşımla tanımlanabilmesi için fizyolojik, morfolojik ve genetik özelliklerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Ayrıca büyüme özellikleri ve pigment üretimleri belirlenen izolatlardan biyoteknolojik kullanım için uygun olanların tespiti hedeflenmiştir. Bu doğrultuda bu mikroalg izolatlarının farklı tuzluluklarda morfolojik değişimleri belirlenmiş, ITS gen dizileri tespit edilerek dünyadaki benzer türler ile filogenetik ilişkileri incelenmiş, farklı tuzluluk, sıcaklık ve ışık yoğunluklarında büyüme özellikleri araştırılmıştır.

## 2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

### 2.1 *Dunaliella*'nın Taksonomisi ve Moleküler Sistematiği

Botanikçi Michel Felix Dunal (1838), Fransa'nın güneyinde yer alan Montpellier yakınlarında bulunan tuzlada *Dunaliella salina*'nın parlak kırmızı renkte beta-karoten dolu hücrelerini gözlemlemiştir (Dunal, 1838). Teodoresco (1905), Romanya Tuz Gölü'nden aldığı örnekler içerisinde yeşil alg olan *Dunaliella* cinsini tespit ederek ilk tanımlayan kişi olmuştur ve türü M.F. Dunal onuruna isimlendirmiştir (Teodoresco, 1905). Hamburger, organizmanın ayrıntılı çizimlerini yaparak onların morfolojileri, hücre yapıları, üreme ve davranışları hakkında bilgi sağlamıştır (Hamburger, 1905). Tuz gölleri ve hipersalin başka bölgelerde de rastlanan bu türe farklı araştırmacılar tarafından isimlendirmeler yapılmıştır (Oren, 2005).

Yirmi üç alt türü olan *Dunaliella* (Massyuk, 1973) dört bölüme ayrılır: *Dunaliella*, *Tertiolectae*, *Virides* ve *Peirceinae*. Teodoresco (1905) *Dunaliella salina*, *Dunaliella viridis*; Nicolai ve Becking (1935) *Dunaliella peircei*; Lerche (1937) *Dunaliella parva*, *Dunaliella minuta*, *Dunaliella euchlora*, *Dunaliella media*; Butcher (1959) *Dunaliella tertiolecta*, *Dunaliella primolecta*, *Dunaliella polymorpha*, *Dunaliella quartolecta* türlerini tanımlamışlardır.

*Dunaliella* cinsinin sistematikteki yeri aşağıdaki gibidir.

Alem	: <i>Plantae</i>
Bölüm	: <i>Chlorophyta</i>
Sınıf	: <i>Chlorophyceae</i>
Takım	: <i>Chlamydomonadales</i>
Familya	: <i>Dunaliellaceae</i>
Cins	: <i>Dunaliella</i>

Moleküler filogenetik teknikler *Dunaliella*'nın taksonomik çalışmalarına yön vermiştir. Moleküler teknikler kullanılarak *Dunaliella* cinsine ait yedi taksonunun

deneysel olarak fizyolojik özelliklerinin yeniden değerlendirilmesi yapılmıştır. Internal Transcribed Spacer (ITS) RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analizi ile *D.salina* türleri ve üç farklı bölüme ait bazı türler arasında (*Tertiolecta* bölümünden *D.tertiolecta*, *Dunaliella* bölümünden *D.parva*, *Peirceinae* bölümünden *D.peircei*) büyük bir genetik benzerlik ortaya koyulmuştur (Cifuentes ve diğ., 2001). 18S rRNA ve ITS gen bölgelerinin dizilerine dayalı analizler ile RFLP analizine dayalı çalışmalar moleküler veri ve taksonomide kullanılan morfolojik ve fizyolojik özellikler (pigment içeriği ve gelişim için tuz toleransı) arasında bir eşleşme olmadığı sonucunu ortaya çıkarmıştır (González ve diğ., 2001; 1998).

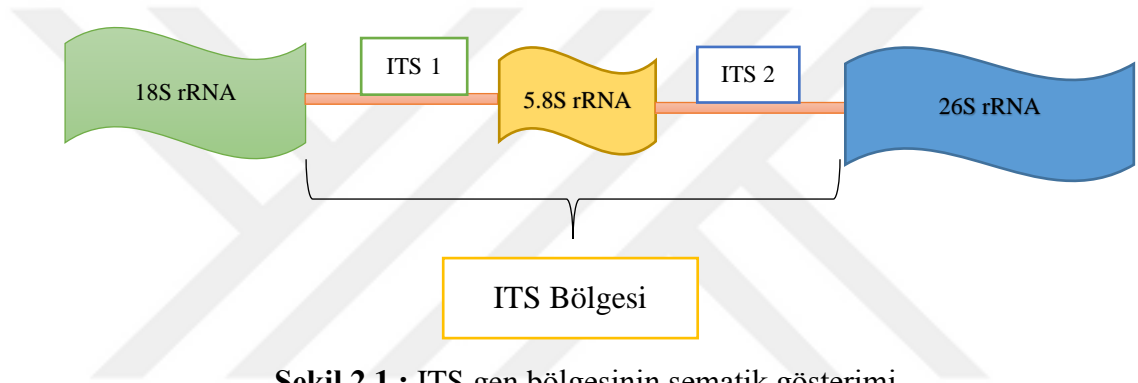
18S - 26S nükleer ribozomal DNA (nrDNA), birbiri ardına tekrarlı dizilerde spesifik kromozomların NOR (Nükleolus Organizatör Bölge) bölgesinde bulunur. Her tekrarlı birim, transkribe olan ve olmayan bölgelerden oluşur ve 18S, 5.8S ve 26S olgun RNA'lara işlenen bir öncü olarak transkribe edilir. Transkribe olan bölgede 18S, 5.8S ve 26S rRNA'nın genleri vardır. İki kenarında ITS bölgelerini içerir (Vander Stappen ve diğ., 1998)

ITS bölgesi, Şekil 2.3'de gösterildiği gibi ITS1, ITS2 ve 5.8S rRNA genlerini içerir. ITS, 18S rRNA ve 26S rRNA genleri arasında yer alır. Bu bölge, 18S ve 26S rRNA genlerine göre daha değişken olduğu için, filogenetik çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır (Baldwin ve diğ., 1995).

González ve diğ., (1998) *Dunaliella* cinsi içerisinde yer alan türlerin taksonomik ilişkilerini belirlemek amacıyla yedi taksonu (*D. salina*, *D. tertiolecta*, *D. bardawil*, *D. Peircei*, *D. parva*, *D. viridis*, *D. lateralis*) RFLP analiziyle nükleer 5.8S rRNA gen bölgelerini kullanarak karşılaştırmıştır. Türler  $21 \pm 1$  °C,  $33 \mu\text{mol foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ 'de 14:10 (Aydınlık : Karanlık) periyotta muhafaza edilmiştir. *Dunaliella* cinsi ITS gen bölgesi uzunluğu (5.8S rRNA bölgesi eklenmiş) yaklaşık 640 baz çifti (*D.salina* CCMP 1303 (540 bp) ve *D.lateralis* (600 bp) hariç) olarak belirlenmiştir. Sekiz restriksiyon endonükleaz (DpnI, StyI, HhaI, TaqI, EcoRI, PvuII, HaeIII, MspI) ile PCR ürününün parçalanmasıyla oluşturulan ve bantların olup olmadığına dayanan grup analizinde, genetik ilişkileri içeren ITS RFLP verileri ve morfo-fizyolojik özellikler arasında bir korelasyon olmadığını göstermişlerdir.

Borowitzka ve Siva, (2007) taksonomisi sorunlu olan yeşil alg cinsi *Dunaliella*'nın morfolojisi ve biyokimyasal karakterlerini temel alarak mevcut taksonomik

tanımlamaları gözden geçirmiştir. Stok kültürler 25 °C, 20 – 50  $\mu\text{mol foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ 'de 12 saat aydınlık; 12 saat karanlık döngüsünde büyütülmüştür. Denizden izole edilen ve örihalin suşlar %1,5 ile %18 (w/v) NaCl konsantrasyon aralığında, hipersalin suşlar ise %5 ile %30 arasında değişen NaCl konsantrasyonlarında büyütülerek optimum tuzluluk değerlerini belirlemişlerdir. Deneylerde 25 $\pm$ 1°C ve 50 - 240  $\mu\text{mol foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğu sağlayan beyaz floresan lambalar kullanmışlardır. Total karotenoid miktralarını belirlemiş ve elektron mikroskobu ile incelemeler yapmışlardır. Yirmi iki türün detaylı tanımlayıcı özelliklerini belirlemişlerdir. Daha önce tanımlaması yapılan bir çok türün yanlış tanımlandığını öne sürmüş ve yeni tür isimleri önermişlerdir. Önerdikleri yeni tür isimleri Şekil 4.2 ve 4.3'de türlerin yanında parantez içerisinde verilmiştir.



Şekil 2.1 : ITS gen bölgesinin şematik gösterimi.

Yapılan çalışmalarda *Dunaliella* cinsindeki farklı tür ve suşlarda ITS bölgesinin boyutu baz çifti olarak 410 ile 446 arasında değiştiği gözlenmiştir (González ve diğ., 2001). Ayrıntılı olarak tür ve suşların ITS-1, ITS-2, toplam baz çifti ve dizinin %GC oranı Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Zamani ve diğ. (2010), Shiraz'daki Maharlu Tuz Gölünden izole ettikleri yeni *Dunaliella salina* suşunun büyüme, karotenogenez ve filogenetik ilişkisini araştırmışlardır. İlk olarak nükleer rRNA ITS (ITS-1+ 5.8 rRNA+ ITS-2) gen bölgesi dizilemesini yaparak Neighbor-joining algoritmasına dayanan filogenetik ağaç oluşturulmuş ve izolatanın *D.salina* suşlarını içeren dalın parçası olduğu belirlenmiştir. *Dunaliella salina* 22  $\pm$  2 °C ve 50  $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğu koşullarında kültüre alınmıştır. Karotegenez'in pH' a bağımlı olduğunu ve pH 9 da en iyi üretimi yaptıklarını göstermişlerdir. MS-1 olarak isimlendirdikleri kendi suşlarının *Dunaliella* cinsine ait olduğunu ve en yakın akrabasının *Dunaliella salina* Mexican (AF546093, AF546094) olduğunu belirlemişlerdir.

**Çizelge 2.1 :** Bazı *Dunaliella* türlerine ait ITS-1, ITS-2 ve toplam ITS gen bölgesi uzunlukları (bp), yüzde GC bazı içerikleri (González ve diğ., 2001).

Takson	ITS-1 (bp)	ITS-2 (bp)	Toplam (bp)	GC oranı (%)
<i>Dunaliella salina</i>				
UTEX 200	213	223	436	50.9
UTEX 1644	214	232	446	52.9
CONC 006	214	225	439	50.1
CONC 007	214	231	445	51.5
<i>Dunaliella pseudosalina</i>				
CONC 010	214	220	434	50.9
<i>Dunaliella viridis</i>				
CONC 002	220	220	440	50
<i>Dunaliella tertiolecta</i>				
A/2, CCMP 1320	214	222	436	51.8
UTEX 99	214	222	436	51.6
<i>Dunaliella bardawil</i>				
ATCC 30861	213	227	440	50
<i>Dunaliella lateralis</i>				
Nepal suş	215	195	410	49.5
<i>Dunaliella parva</i>				
UTEX 1983	222	223	445	49.9
CCMP 362	214	222	436	51.6
CCMP 19/9	214	222	437	50.8
<i>Dunaliella peircei</i>				
UTEX 2192	214	222	436	50.9

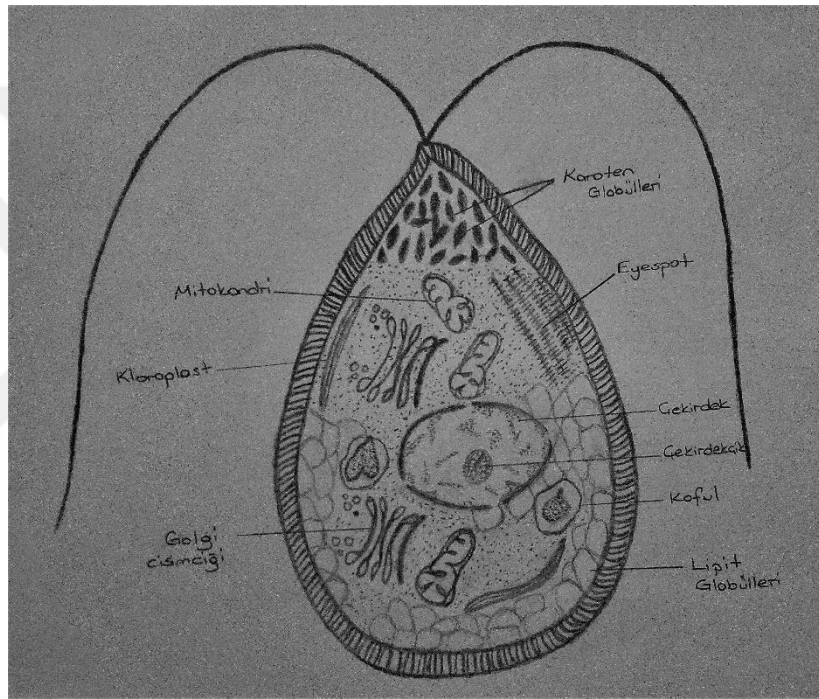
*Dunaliella* türleri ile yapılan kısıtlı sayıdaki moleküler çalışmalar birçok kültür suşunun tanımlamasında sıkıntılar olduğunu, muhtemelen yanlış adlandırıldığını ve gereksiz tür isim önerilerinin yapılmış olduğunu işaret etmektedir.

## 2.2 *Dunaliella* Türlerinin Özellikleri ve Çevresel Koşullara Verdiği Fizyolojik Yanıtlar

*Chlorophyta* soyuna ait olan *Dunaliella* türleri morfolojik olarak katı bir hücre duvarına sahip olmamalarıyla tanınırlar. Hücre duvarı yerine bulunduğu yere uyum sağlayabilen esnek bir hücre zarfı ile çevrelenmişlerdir (Teodoresco, 1905). İki adet flagellaya sahiptirler; flagellalar ya hücre uzunluğu kadar ya da daha kısa boyuttadırlar (Şekil 2.2). Hücreleri oval, küresel, elips şekillerde, genişlikleri 3 ile 13 µm, uzunlukları 5 ile 25 µm arasında değişmektedir (Melkonian, ve diğ., 1980). *Dunaliella* hücreleri klorofil a ve b'nin yanı sıra β-karoten, α-karoten, lutein, neoksantin, zeaksantin ve violaksantin gibi değerli karotenoid pigmentler içermektedirler. Yüksek

tuzlulukta yaşayabilirler ve bu özellikleri ile halotolerant ökaryotlar içerisinde yer alırlar.

Tuzluluk mikroalglerin doğal popülasyonunda çeşitliliği ve ürün üretimini etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Bazı mikroalg türleri sınırlı tuzluluk toleransına sahipken bazı türler ise çeşitli tuzluluk değerlerinde yaşamlarını sürdürebilmektedirler (Booth ve Beardall, 1991). Yüksek tuzluluk değerleri halotolerant türlerin üretiminde kontaminasyon riskini elimine etmektedir. *Dunaliella salina*, alglerde tuz etkilerinin araştırılması ve gliserolün rolünün tespit edilmesi amacıyla model organizma olarak kullanılmıştır (Oren ve diğ., 2005)



**Şekil 2.2 :** Alg hücresinin basit olarak yapısının gösterilmesi (*Dunaliella* hücreleri baz alınarak çizilmiştir).

*Dunaliella sp.* türleri yüksek tuzluluk toleransına sahiptir. Tümü tuzlu ortamlarda bulunur fakat optimal büyümeleri farklı tuzluluk konsantrasyonlarındadır. Tuzluluğun farklı *Dunaliella* izolatlarının büyüme hızına etkisini değerlendiren ilk kontrollü deneyler 1930'larda bildirilmiştir (Baas-Becking, 1931). *Dunaliella spp.* suşlarının yetiştirilmesinde en uygun tuz konsantrasyonları değişkenlik göstermektedir. Optimum tuz aralıkları *D.viridis* için 1-4 M (%6-23) NaCl, pH 6-9 aralığında (Baas-Becking, 1931); *D.tertiolectae* için ilk çalışmalarda 0,17 – 1,5 M NaCl, sonraki çalışmalarda 0,05-3 M NaCl (Jahnke ve White, 2003); *D.salina* için 0,05-5 M (Santin-Montanya, 2007) veya %12 civarında (L. J. Borowitzka, 1981); farklı olarak Büyük

Tuz Gölü izolatlarında %10-15 hatta %19 civarında olduğu bildirilmiştir (Brock, 1975; Van Auken ve McNulty, 1973). Çoğu izolatin %2 ile %8 tuzluluk aralığında en iyi büyüme gösterdiği, %15'in üzerinde yavaş büyüme gösterdiği bulunmuştur (Lerche, 1937).

Ginzburg ve diğ., (1990) ise aynı hücre hattının ani tuz değişimleri uygulanmamak şartıyla geniş tuz konsantrasyonlarında yaşamını devam ettirebildiğini göstermişlerdir. Kullanılan türler 26 °C, 150-200  $\mu\text{E cm}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğu, 14 saat aydınlık; 10 saat karanlık parametrelerinde büyütülmüştür. Tuz konsantrasyonundaki ani değişimlerden sonra yapılan canlılık testlerine göre, *D.parva* 19/9 için hayatta kalma oranı 3,5 M'dan 0,5 M NaCl konsantrasyonuna 0,5 M'lık ani geçişlerde %0,01; yine 0,5 M artışlarla 0,5 M'den 3,5 M NaCl konsantrasyonuna geçişlerde ise %20 olarak tespit edilmiştir. 0,5 M'den 3,5 M NaCl konsantrasyona doğru değişimde tüm hücreler 48 saate kadar yaşayabilirken konsantrasyonu yukarıdan aşağı doğru olan değişimde bu sürenin sadece 1,5 saat olduğunu belirlemiştir.

Ginzburg (1993), ışık yoğunluğunun *Dunaliella parva*'da yüksek tuz konsantrasyonlarına adaptasyonda güçlü etkisi olduğunu bulmuştur. Kültürler 22 °C sıcaklık, 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğu ve 14 saat aydınlık- 10 saat karanlıkta büyütülmüştür. 5, 20, 75, 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık yoğunlukları ve 0,5, 1,5, 2,5, 3,5 M NaCl değerleri kullanılmıştır. Yüksek ışık yoğunluklarında tuz konsantrasyonlarındaki artışa paralel olarak gliserol sentezi olurken, düşük ışık yoğunluklarında gliserol sentezi olmamıştır. Tuz konsantrasyonları arttıkça büyüme için gerekli ışık yoğunluğunun da artırılması gerektiğini göstermiştir.

*Dunaliella*'nın değişken tuzluluklara sahip sulara plazma zarı içerisindeki iyon pompaları ile tuzluluk değişimi etkisiyle ürettiği plazma membran proteinleri protoplazmadan sodyum çıkararak hücrenin iyon seviyelerini kontrol eder ve hücrenin yaşamasını sağlar (Fisher ve diğ., 1994). Ayrıca *Dunaliella* hücreleri hücre duvarlarının olmaması nedeniyle tuzluluk artış ve azalışlarında küçülerek veya şişerek tepki gösterir (Berube ve Dodge, 1999). Yüksek tuzluluğa maruz kaldığı zaman hücre içi gliserol miktarı %50'nin üzerine çıkar ve bu oran gerekli osmotik basıncın sağlanması için yeterlidir. Bu durumda gliserol, enzimleri hem inaktivasyon hem de inhibisyona karşı koruyan uyumlu bir çözünen madde olarak davranır (Hosseini ve



Shariati, 2009). Tuzluluk değişimlerine yanıt olarak doğal lipit biyosentezi ve karotenoid aşırı birikimi yapabilirler (Sadka ve diğ., 1989).

Kültür koşullarında hücre yeteneklerine göre *Dunaliella* hücreleri kırmızı ya da turuncu renk alırlar (Massyuk 1973; Preisig 1992), ancak aralarında değişim göstermeyerek daima yeşil kalan hücreler de mevcuttur. Teodoresco, *D.salina* için biraz daha büyük hücrelere sahip olduğunu ve uygun koşullarda yüksek miktarda karotenoid pigmenti sentezlediğini ve hücrelerinin parlak kırmızı renk aldığını; *D. viridis*'in ise asla böyle kırmızı hücreleri üretmediğini bildirmiştir. Blanchard (1891) ve Hamburger (1905) yeşil hücreleri kırmızı hücrelerin gençlik evreleri olarak kabul etmiştir. Labbé (1921), bu renk değişimlerinin ortamdaki tuz konsantrasyonlarından kaynaklandığı görüşündedir.

Farklı pigmentler, farklı dalga boylarındaki ışığı absorbe ederler. Bu farklılığa pigmentin kimyasal yapısı neden olur. Işık, algler için büyümeyi ve üremeyi kısıtlayabilen kritik bir faktördür. Tüm oksijenik fotosentetik organizmalar fotosentez boyunca ışığı kullanarak kimyasal enerjiye çevirir. Fotosentezin enerji kaynağı olan ışık yoğunluğu fotosentezin hızını da belirleyen bir etmendir. Yüksek ışık şiddetine tepki olarak, klorofil-a ve diğer pigmentlerin azalması nedeniyle fotosentez azalır ve hücreyi aşırı ışıktan korumak amacıyla sekonder karotenoidlerin miktarı artış gösterir. Düşük ışık şiddetine tepki olarak, genellikle klorofil-a ve ışığı tutabilen pigmentler artar (Ben-Amotz ve Avron, 1983). Ayrıca lipit üretimi yüksek ışıpta maksimum olmaktadır (Weldy ve Huesemann, 2007).

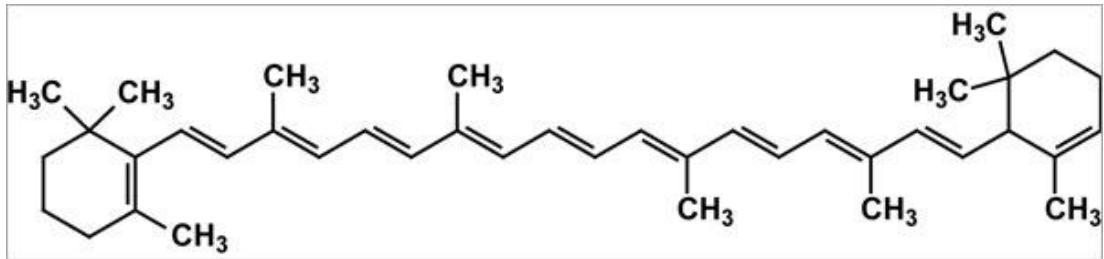
Mikroalglerin pigment üretim miktarları tarımsal ürünlerle elde edilen üretimle kıyaslandığında oldukça yüksektir. Mikroalgler bölünerek çoğaldıklarından hızlı bir şekilde biyokütle artışı sağlarlar (Wichuk ve diğ., 2014). Mikroalglerde optimum üreme ve büyüme koşulları altında primer karotenoidler kloroplastta sentezlenir; stres koşullarında ise sekonder karotenoidler kloroplast dışında sitoplazmada sentezlenir. Başlıca stres faktörü, ışık türü ve yoğunluğu, N ve P besinsel kısıtlılığıdır.

Stres ürünü pigmentlerden biri olan karotenoid doğada yaygındır. Sarı, kırmızı ve turuncu renklidirler. Bu nedenle bu bölgedeki ışığı absorbe edemezler, yansıtırlar (Kommareddy ve Anderson, 2003). Karotenoid artışı; ışığın miktar ve çeşidine, makro elementlerin miktarına ve hücrelerin CO<sub>2</sub> asimilasyonuna bağlıdır. Başka bir deyişle

stres durumlarında mikroalglerin karotenoid üretimleri tetiklenmektedir. Bu etkiler büyüme grafiklerinde durağan fazda gerçekleşmektedir (Cifuentes ve diğ., 1996).

Alglerdeki en yaygın karoten  $\beta$ -karotendir (Lee, 2008) ve güneş ışınlarının iyonize enerji etkilerine karşı korunma amacıyla üretilirler (Schlipalius, 1991). A vitamini öncüsü olan  $\beta$ -karotenin doğal üretiminde *Dunaliella* türleri kullanılmaktadır (Borowitzka ve diğ., 1990; Markovits ve diğ., 1993). Bazı suşlarda  $\beta$ -karoten üretimi alg kuru ağırlığının %14'ünden fazla olabilmektedir. Bu miktar havuçtaki miktarın 10 ila 100 katıdır. Ticari olarak kullanılan  $\beta$ -karoten'in doğal ve sentetik formları vardır. Sağlık alanında Jayappriyan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada sentetiklere göre doğal olan  $\beta$ -karoten prostat kanseri hücrelerinde yüksek apoptoz oranı sağlamıştır (Jayappriyan ve diğ., 2013). Ayrıca güçlü antioksidan özelliklere sahiptir. Kanser ve kardiyovasküler rahatsızlıklara karşı kullanılmaktadır. Kimyasal yapıları yağda çözünmeye uygundur. Ayrıca organik çözücülerde (aseton, alkol, kloroform, etil asetat ve diklorometan vb) kolayca çözünebilirler. Suda çözünmezler (Nguyen ve Schwartz, 1998).  $\beta$ -karoten'in kimyasal yapısı Şekil 2.3'te gösterilmiştir.

Borowitzka ve diğ., (1990) *Dunaliella salina*'nın üç izolatında ani tuzluluk değişiminin büyüme ve karotegenesis üzerine etkisini araştırmıştır. 26 °C sıcaklıkta, 180  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğunda üssel olarak artan tuzluluk değerlerinde total karotenoid yanıtları incelenmiştir. Tuzluluğun ani artışının büyüme fazlarında gecikmelere neden olduğunu ve fazların uzunluğunun tuzluluk değişimlerine bağlı olduğunu tespit etmişlerdir. %10 - 15 w/v NaCl'de gecikme olmadığını, %30 w/v NaCl'de 4 günlük gecikme olduğunu rapor etmişlerdir. %20 tuzlulukta iki günlük büyüme gecikmesi ile beraber toplam karotenoid miktarında anlamlı bir artış gözlemlenmiştir.



Şekil 2.3 :  $\beta$ -karotenin kimyasal yapısı.

Markovits ve diğ. (1993), dört *Dunaliella* spp. suşunu 25°C sıcaklıkta, pH  $8 \pm 0.5$  değerinde ve 200 W/m<sup>2</sup> sürekli aydınlatmada büyütürken bu türler arasında en iyi  $\beta$ -

karoten üretimi yapan türü belirlemiştir. Spesifik büyüme oranlarının 0,093 gün<sup>-1</sup> ile 0,234 gün<sup>-1</sup> arasında değiştiğini, kuru ağırlığının %3 ile %6 lipit, lipit içeriğinin %50 ile %80'inin karotenoidler olduğunu belirlemiştir.

Çelekli ve Dönmez, (2006) Tuz Gölünden izole ettikleri *Dunaliella sp.*'nin hangi koşullarda en iyi büyüme ve β-karoten birikimi yaptığını belirlemiştir. Örnekleri Johnson ortamında 20 ± 2 °C sıcaklıkta, soğuk beyaz florasan 32 kerg cm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> aydınlatmada petri kapları içerisinde inkübe etmişlerdir. Optimal ışık yoğunluğu, pH, tuz ve azot konsantrasyonlarını belirlemiştir. İlk deney seti %10, 15, 20 (w/v) NaCl tuz konsantrasyonlarına ve 6, 7, 8, 9 pH değerlerinde gerçekleştirilerek büyüme ve β-karoten üretimi için uygun koşullar belirlemiştir. Diğer bir deneyde ise ışık değerinin büyüme, β-karoten içeriği ve farklı konsantrasyonlarda NaNO<sub>3</sub> (1, 5, 10, 17 Mm)'ün etkisi belirlenmiştir. Işık deneylerinde en yüksek hücre sayısı ve β-karoten içeriği, pH 9, %20 NaCl konsantrasyonu, 48 kerg cm<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> ışık yoğunluğu koşullarında görülmüştür. β-karoten içeriği bu ışık yoğunluğunda 0,177 ile 1,095 mg/ml arasında, azot sınır değeri altında ise hücre bazında 0,119 ile 0,261 ng/hücre arasında değişmiştir. Yapılan bu çalışmanın sonucunda en yüksek β-karoten birikimi ve hücre sayısı, pH 7, 5 mM NaNO<sub>3</sub> ve %20 NaCl konsantrasyonu koşulunda sırasıyla 0,261 ng/hücre, 4.2 x 10<sup>6</sup> hücre/ml dir.

Fazeli ve diğ. (2005), Urmia Tuz Gölünden izole edilen *Dunaliella tertiolecta* DCCBC26 suşunda farklı tuzluluk değerlerinin (0,05 – 3 M NaCl) büyüme kinetikleri, toplam karotenoid ve β-karoten üzerine etkilerini incelemiştir. Suş 25 °C, 14:10 saat aydınlık/karanlık, 50 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> ışık yoğunluğu koşullarında büyütülmüştür. Tür ITS-2 sekanslaması ile tanımlanmıştır. Aynı koşullarda ışık yoğunluğu 150 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> olarak değiştirilip farklı tuzluluk konsantrasyonunda büyütülerek sekizinci ve yirmisekizinci günlerde örnek alınmış ve karotenoid miktarları tespit edilmiştir. Sabit büyüme fazı esnasında 28. günde 0,5 M NaCl tuzluluğunda en yüksek karotenoid üretimini (11,73 mg/L) gözlemlemiştir.

Narváez-Zapata ve diğ. (2011), üç *Dunaliella salina* (DUN-1, DUN-2 ve DUN-3) izolatında (CLBM-Universidad del Mar, Mexico) farklı tuzluluk değerlerinde büyüme ve metabolit üretimini incelemiştir. Kültür koşulları f/2 ortamında, 22±1° C, 150–180 μmol foton.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> şeklindedir. DUN-1 ve DUN-2 kırmızı iken DUN-3 yeşil renkte gözlenmiştir. % 3,5, 10, 15, 20 ve 30 (w/v) NaCl tuzluluklarına akline edilerek 24

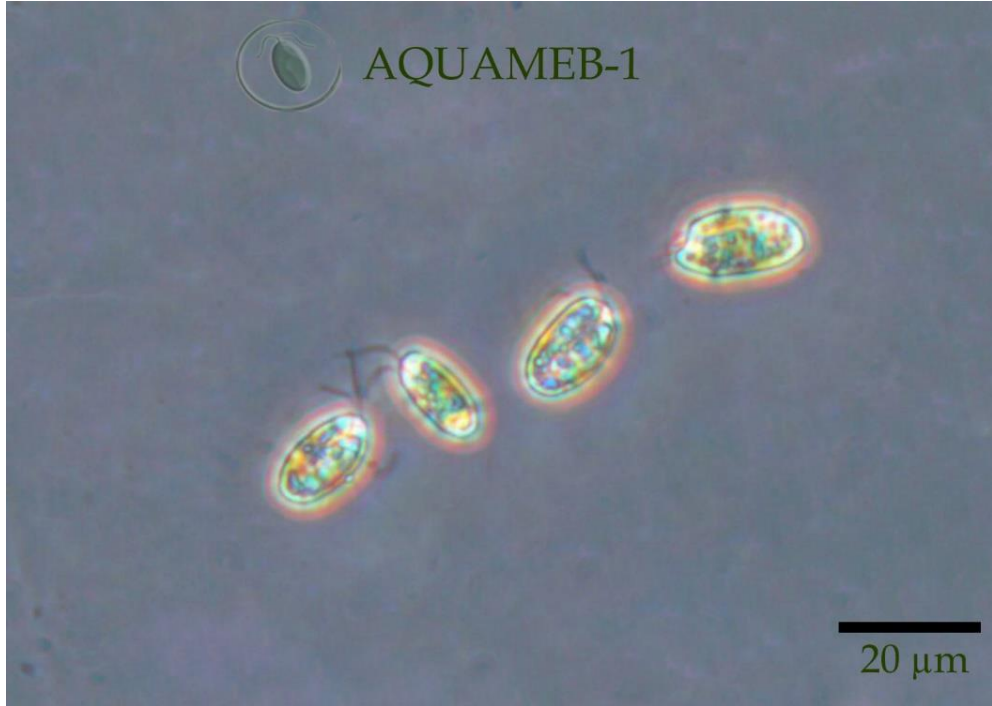
günlük büyümeleri takip edilmiştir. Tür tanımları için rRNA ITS bölgelerini kullanmışlardır. Maksimum büyüme %30 (w/v) NaCl'de gözlenmiştir. DUN-2 için gliserol içeriği 380 mg.L<sup>-1</sup>, karoten içeriği 5,9 mg.L<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. DUN-2 ve DUN-3 rRNA gen dizileri benzer olmasına rağmen, DUN-2'nin gliserol içeriği 0,3 kat, karoten içeriği 10 kat DUN-3'ten daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

*Dunaliella* spp. suşlarının büyüme yanıtları tuzluluk, sıcaklık ve ışık yğunluğu gibi bir çok etmenin etkileşimine bağlıdır. *Dunaliella viridis* için optimum sıcaklık 14 °C ile 30 °C aralığında, hayatta kalabildiği üst sıcaklık değeri 35 °C olarak belirlenmiştir (Gibor, 1956). *Dunaliella bioculata* ve *D. primolecta* denizel türleri için optimum sıcaklık 25 °C ile 29 °C arasında iken, *D. tertiolecta*'nın optimum büyümesi 30 °C'de gözlenmiştir (Goldman, 1977). *Dunaliella salina* 10-30 °C arasındaki sıcaklığa tolerans gösterebilmektedir (Santin-Montanya ve diğ., 2007).

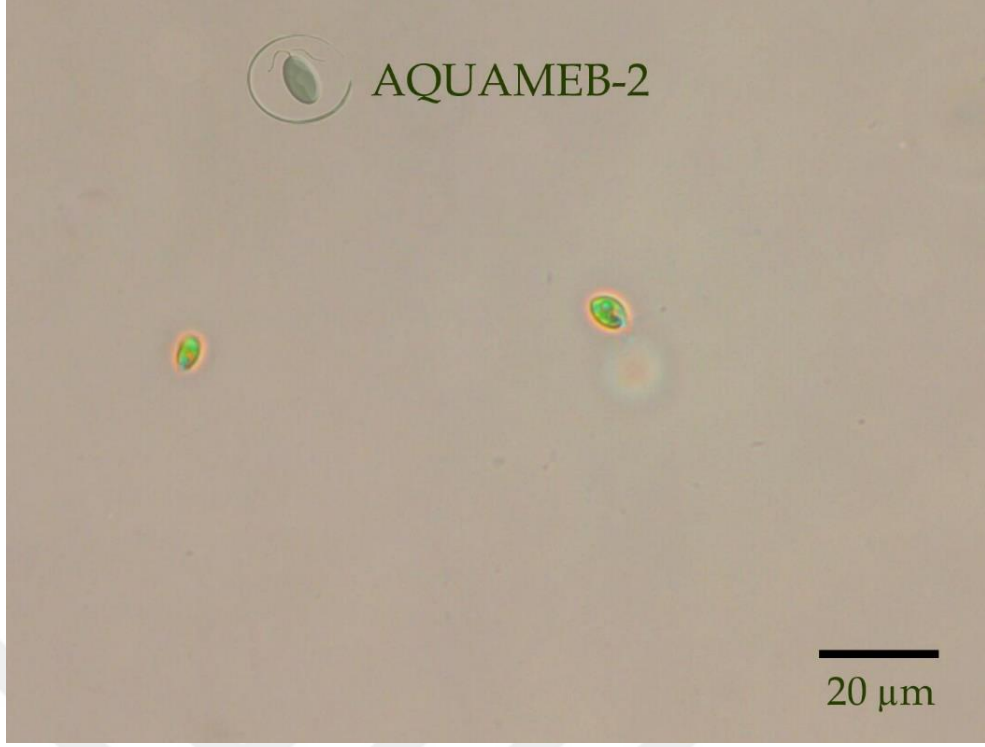
### 3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

#### 3.1 Mikroalg Suşları ve Kültür Ortamları

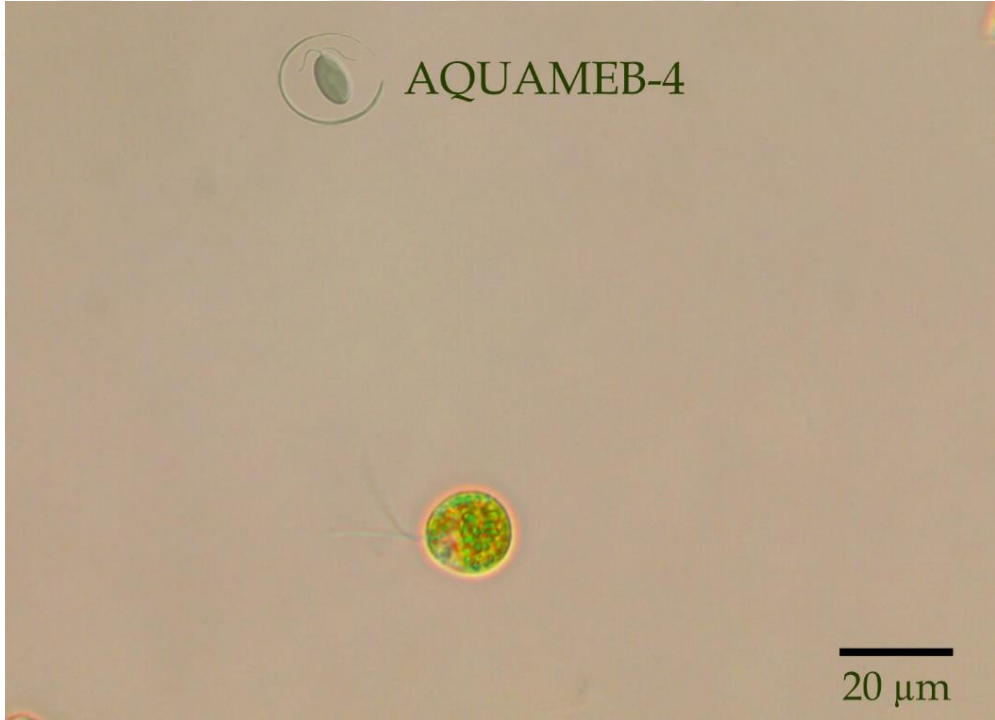
Bu tez çalışmasında 114Z274 no'lu TÜBİTAK projesi kapsamında izole edilmiş ve projede oluşturulan Bursa Teknik Üniversitesi Alg ve Siyanobakteri Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilmiş 20 mikroalg suşu kullanılmıştır. Bu suşlar şunlardır: *Crptophyceae*. AQUAMEB-1, *Dunaliella* sp AQUAMEB-2, *Dunaliella* sp AQUAMEB-4, *Dunaliella* sp AQUAMEB-5, *Dunaliella* sp AQUAMEB-6, *Dunaliella* sp AQUAMEB-7, *Dunaliella* sp AQUAMEB-8, *Dunaliella* sp AQUAMEB-9, *Dunaliella* sp AQUAMEB-11, *Dunaliella* sp AQUAMEB-12, *Dunaliella* sp AQUAMEB-13, *Dunaliella* sp AQUAMEB-14, *Dunaliella* sp AQUAMEB-15, *Dunaliella* sp AQUAMEB-16, *Tetraselmis* sp. AQUAMEB-17, *Dunaliella* sp AQUAMEB-18, *Dunaliella* sp AQUAMEB-20, *Dunaliella* sp AQUAMEB-21, *Tetraselmis* sp AQUAMEB-22, *Dunaliella* sp AQUAMEB-49'dir (Şekil 3.1 - 3.20).



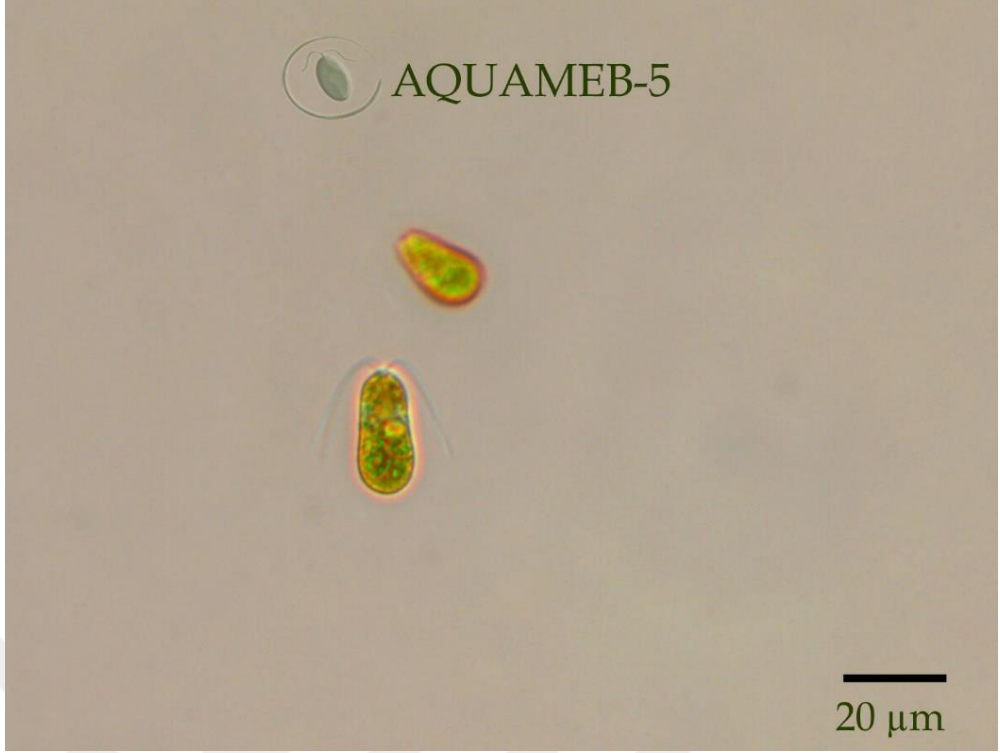
**Şekil 3.1** : AQUAMEB-1, *Cryptophyceae* , mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir türdür, 75 ppt tuzluluktan izole edilmiştir.



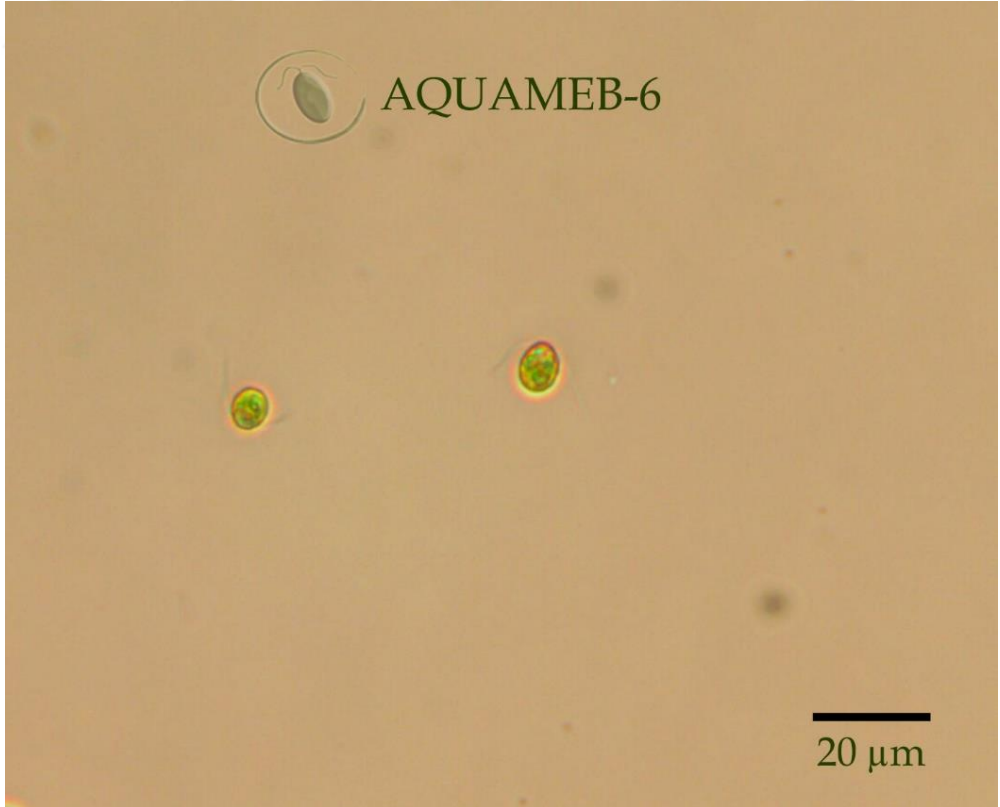
**Şekil 3.2** : AQUAMEB-2, *Dunaliella sp.*, mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir türdür, 165 ppt tuzluluktan izole edilmiştir.



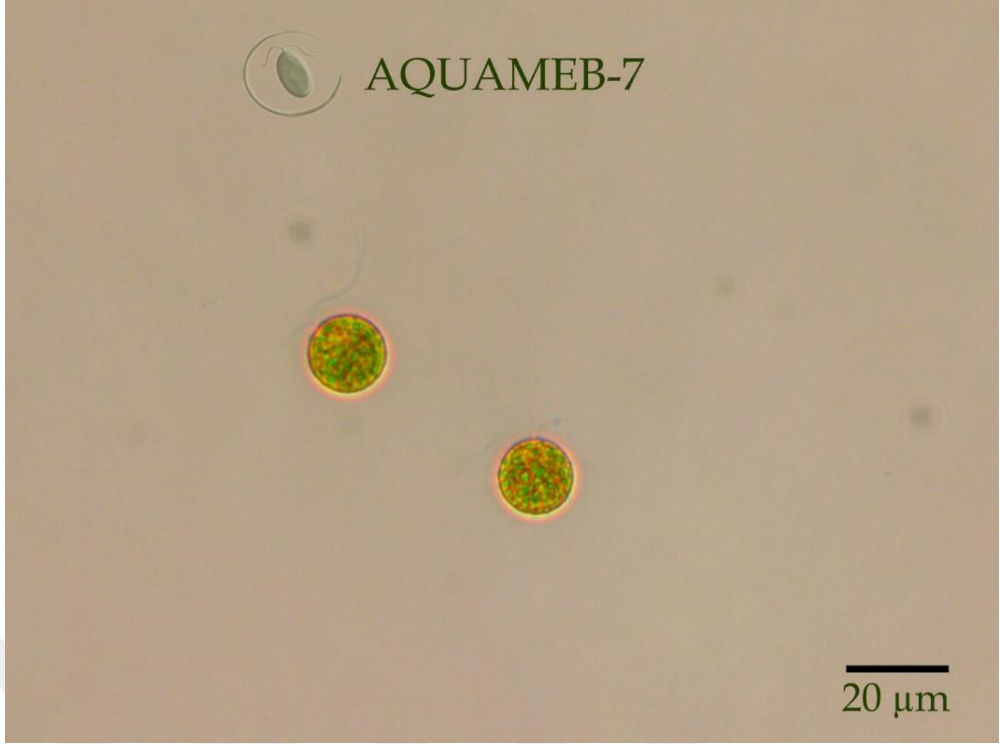
**Şekil 3.3** : AQUAMEB-4, *Dunaliella sp.*, mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir suştur, 163 ppt tuzluluktan izole edilmiştir.



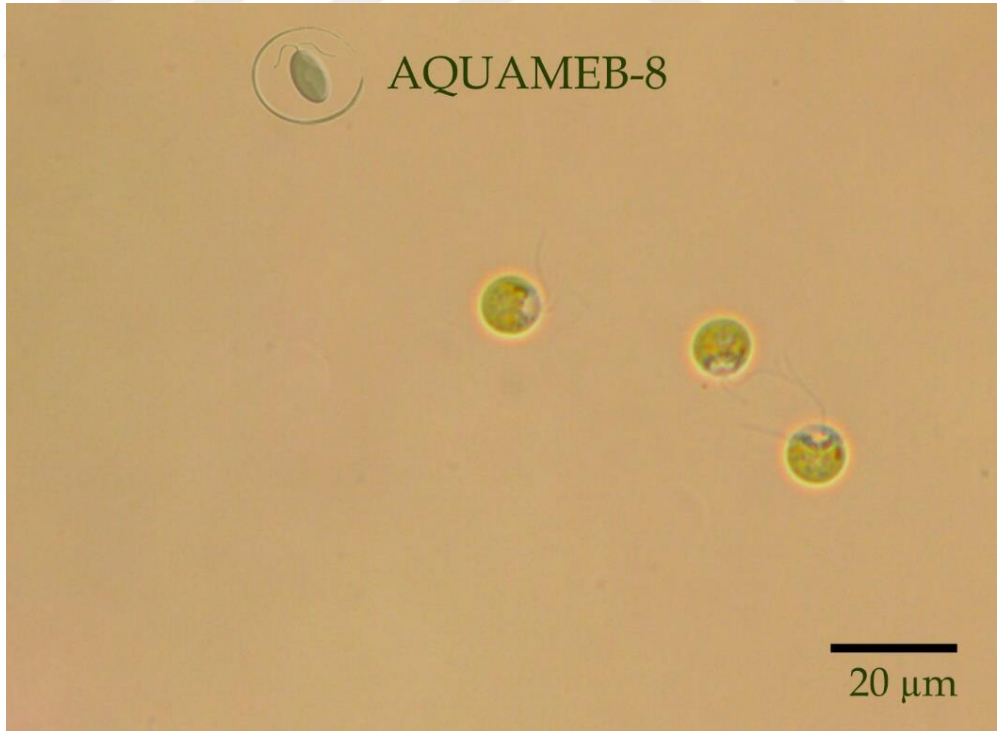
**Şekil 3.4** : AQUAMEB-5, *Dunaliella* sp., mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir suştur, 152 ppt tuzluluktan izole edilmiştir.



**Şekil 3.5** : AQUAMEB-6, *Dunaliella* sp., mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir suştur, 178 ppt tuzluluktan izole edilmiştir.

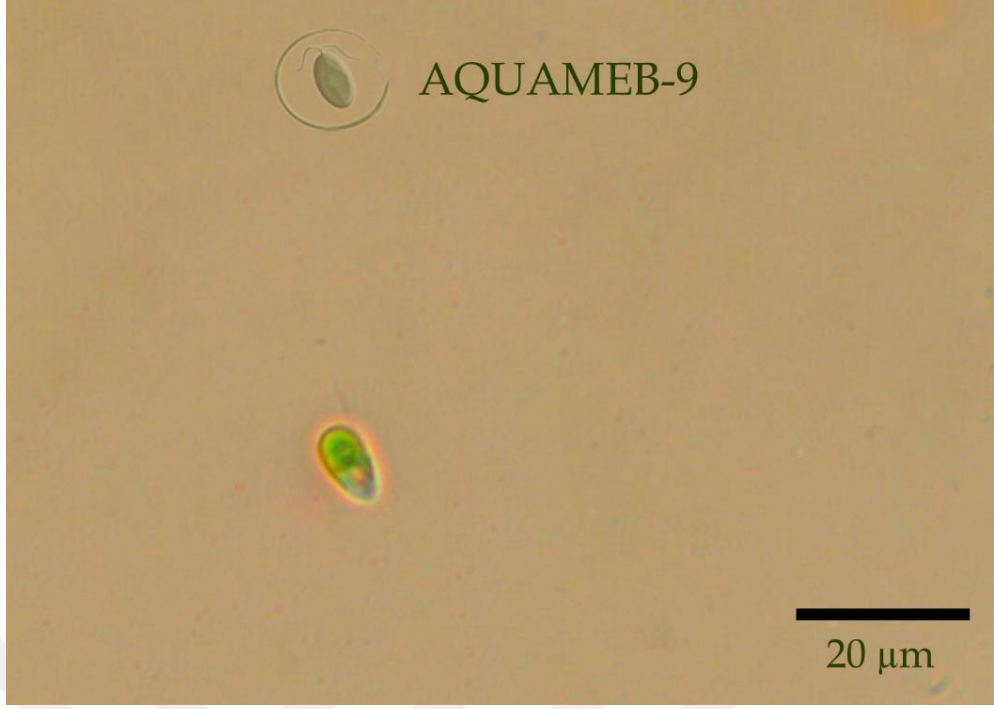


**Şekil 3.6 :** AQUAMEB-7, *Dunaliella sp.*, mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir suştur, 178 ppt tuzluluktan izole edilmiştir.

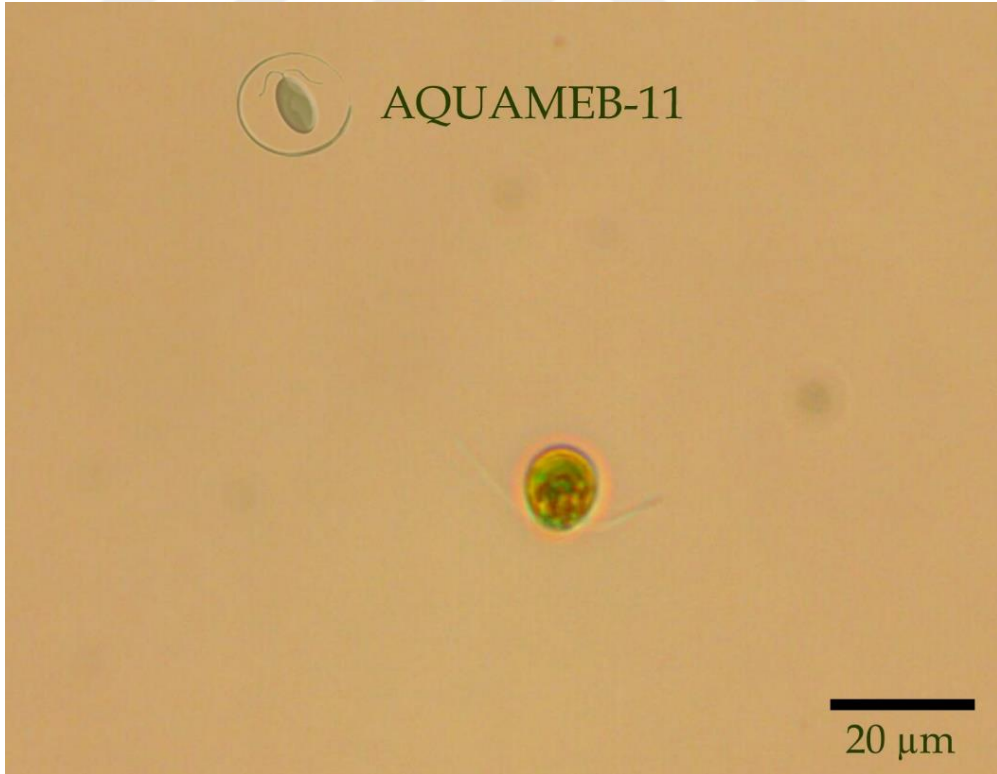


**Şekil 3.7 :** AQUAMEB-8, *Dunaliella sp.*, mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir suştur, 285 ppt tuzluluktan izole edilmiştir.

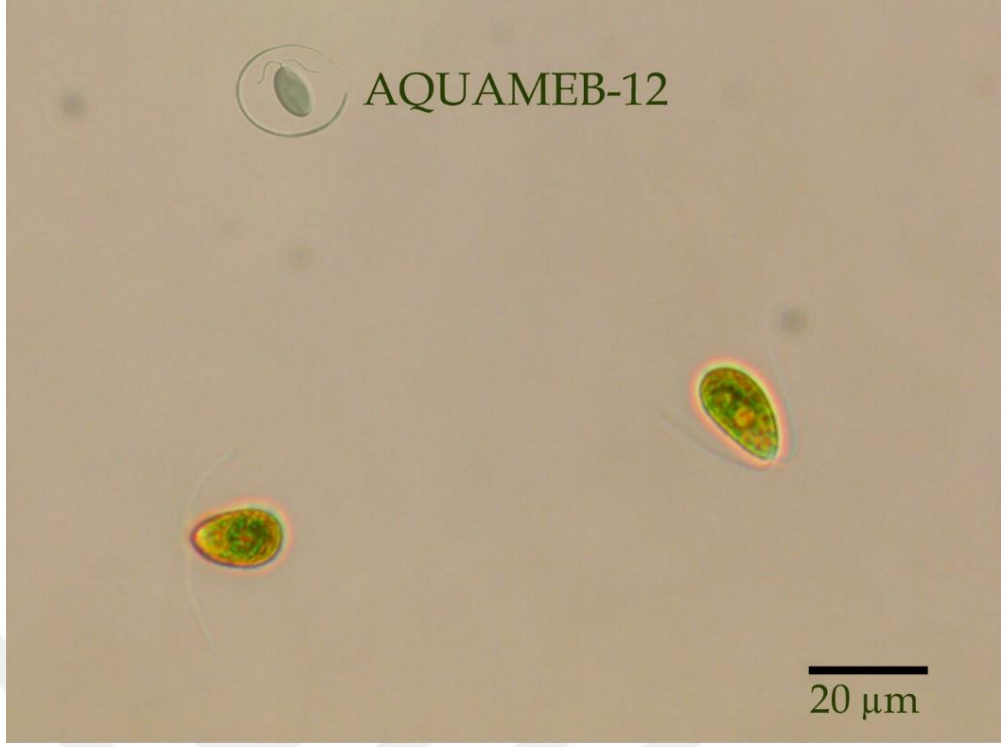




**Şekil 3.8 :** AQUAMEB-9, *Dunaliella sp.*, mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir suştur, 285 ppt tuzluluktan izole edilmiştir.



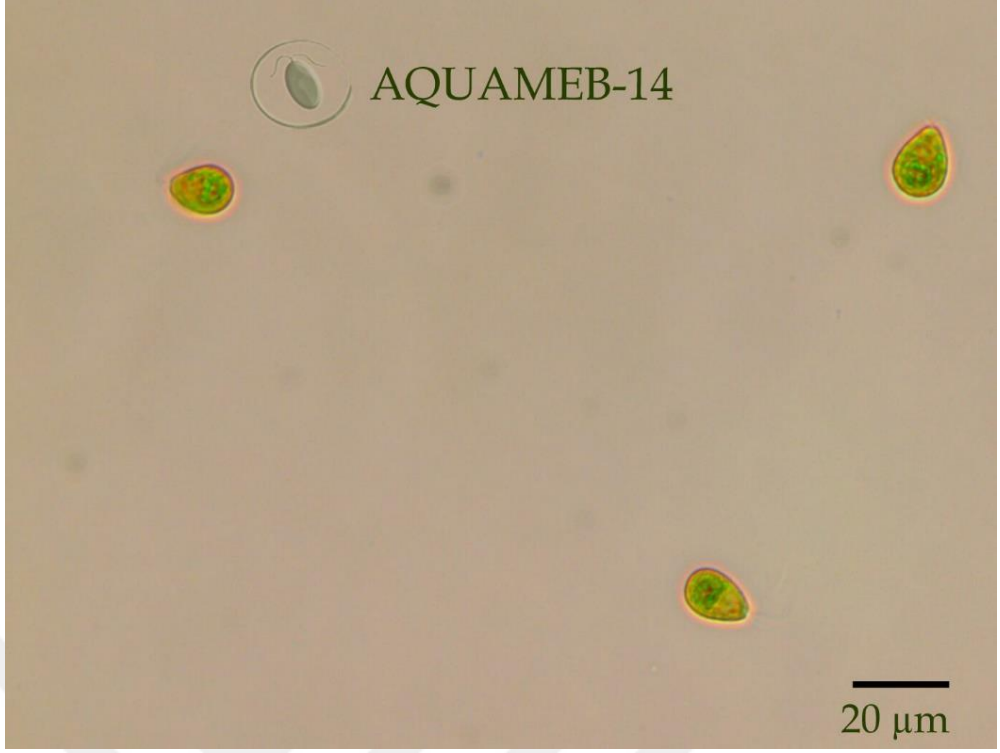
**Şekil 3.9 :** AQUAMEB-11, *Dunaliella sp.*, mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir suştur, 285 ppt tuzluluktan izole edilmiştir.



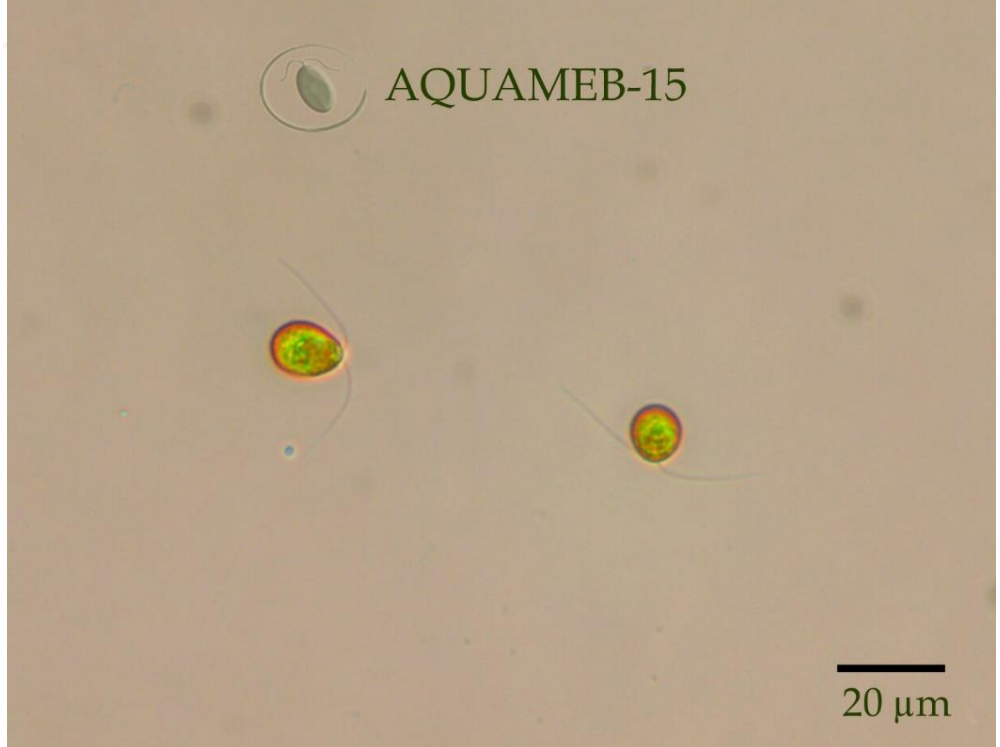
**Şekil 3.10** : AQUAMEB-12, *Dunaliella sp.*, mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir suştur, 98 ppt tuzluluktan izole edilmiştir.



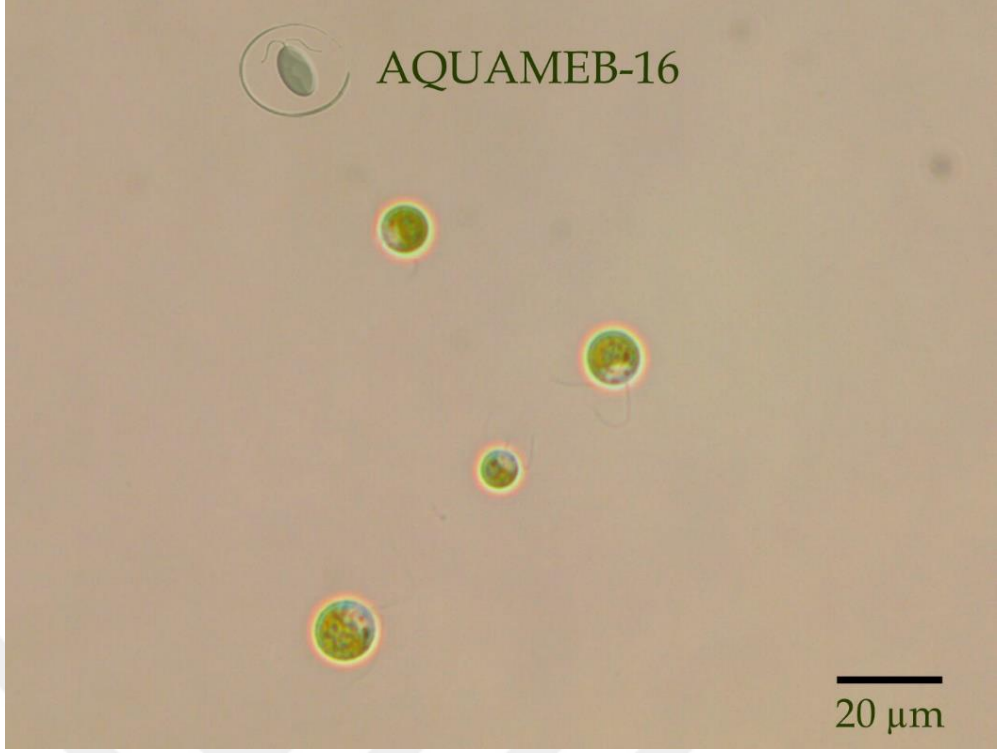
**Şekil 3.11** : AQUAMEB-13, *Dunaliella sp.*, mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir suştur, 98 ppt tuzluluktan izole edilmiştir.



**Şekil 3.12** : AQUAMEB-14, *Dunaliella sp.*, mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir suştur, 274 ppt tuzluluktan izole edilmiştir.



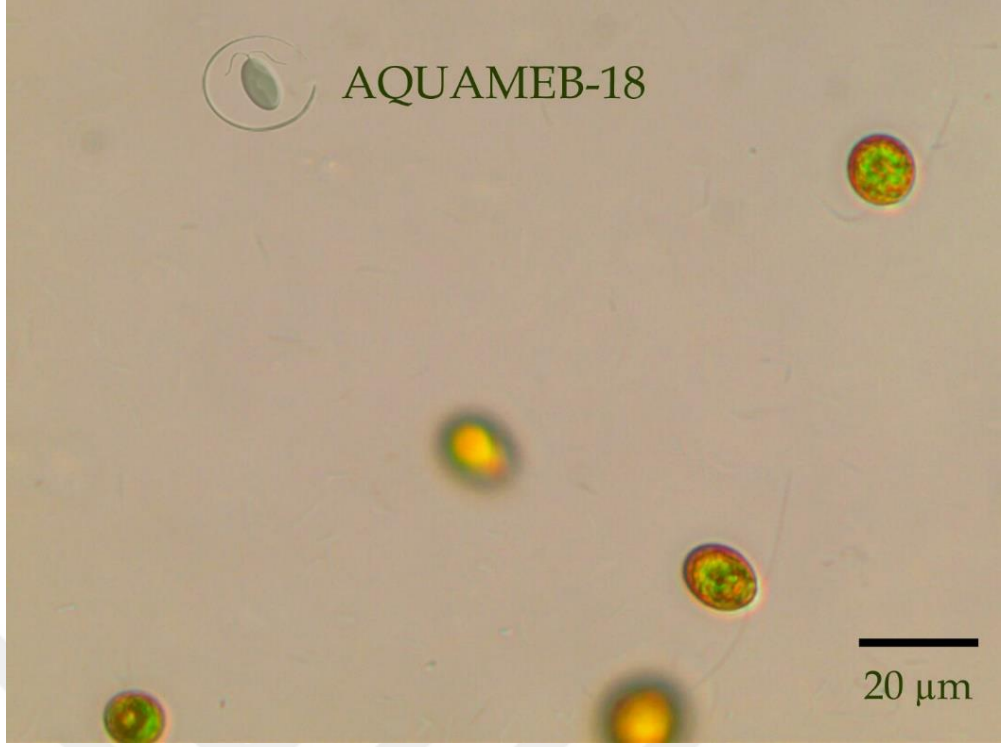
**Şekil 3.13** : AQUAMEB-15, *Dunaliella sp.*, mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir suştur, 274 ppt tuzluluktan izole edilmiştir.



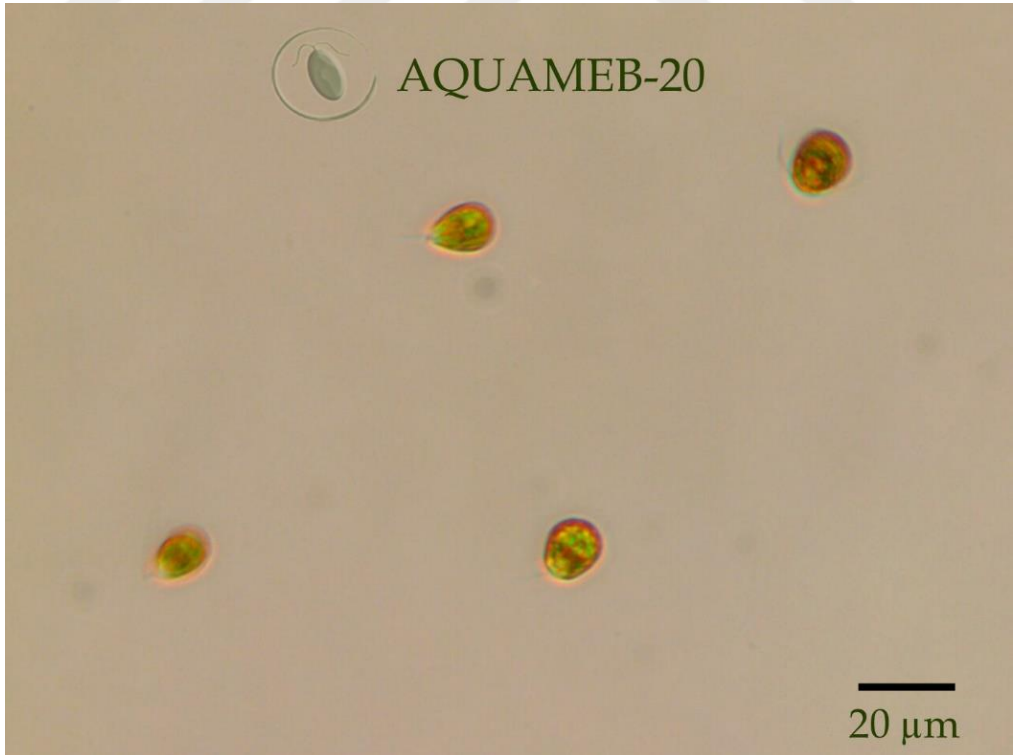
**Şekil 3.14** : AQUAMEB-16, *Dunaliella sp.*, mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir türdür, 270 ppt tuzluluktan izole edilmiştir.



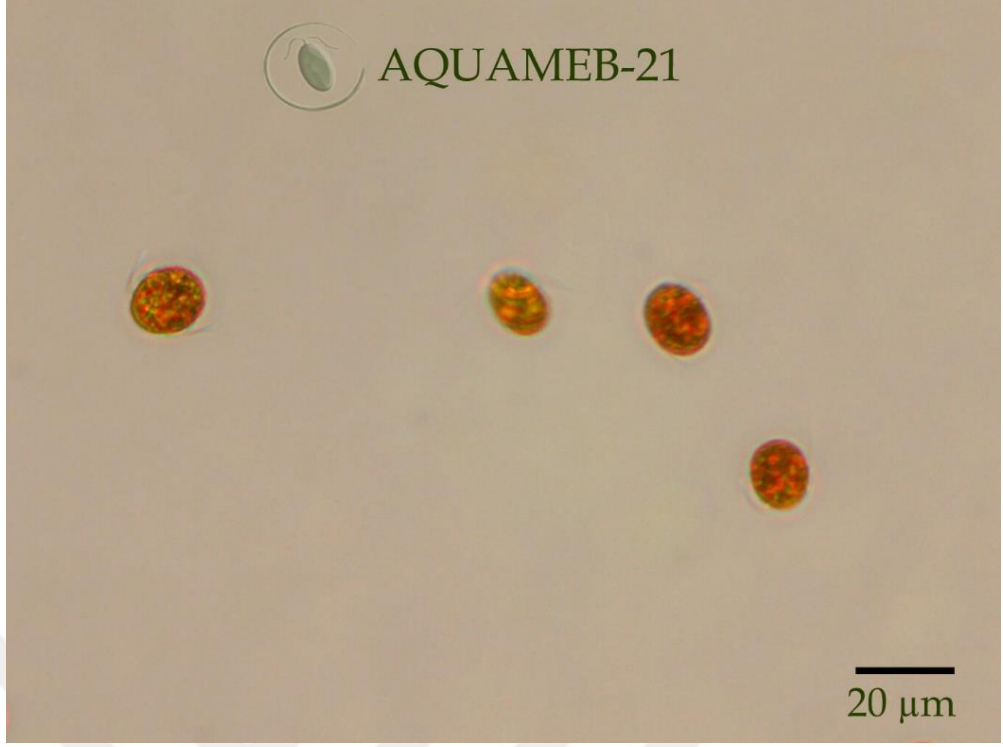
**Şekil 3.15** : AQUAMEB-17, *Tetraselmis sp.*, mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir türdür.



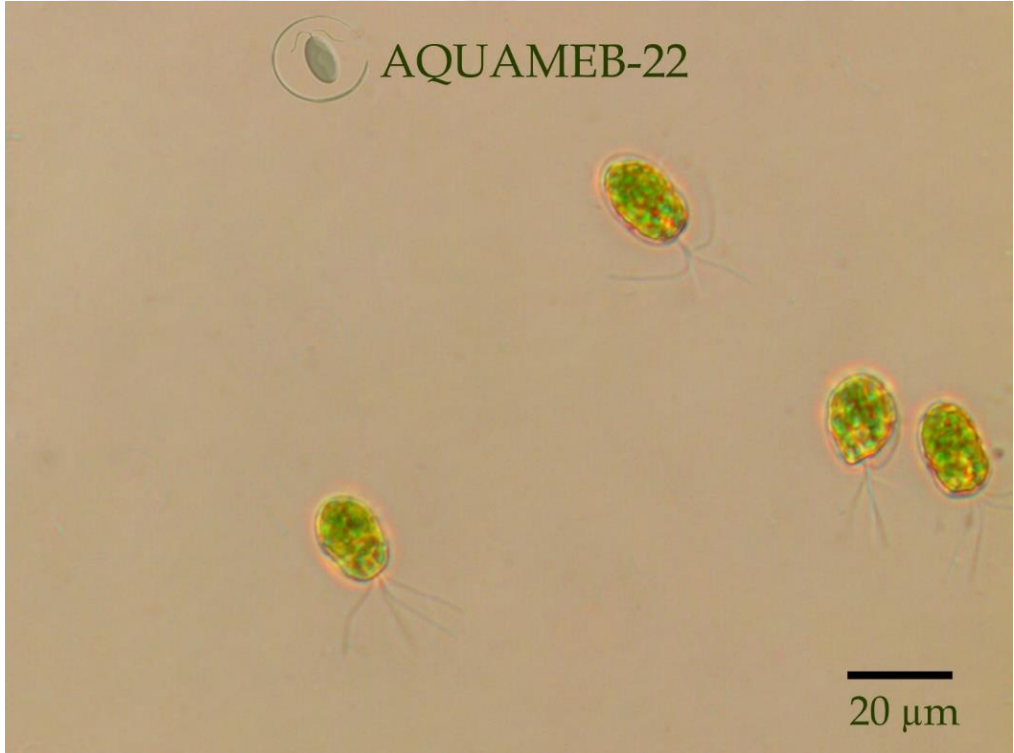
**Şekil 3.16** : AQUAMEB-18, *Dunaliella sp.*, mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir suştur.



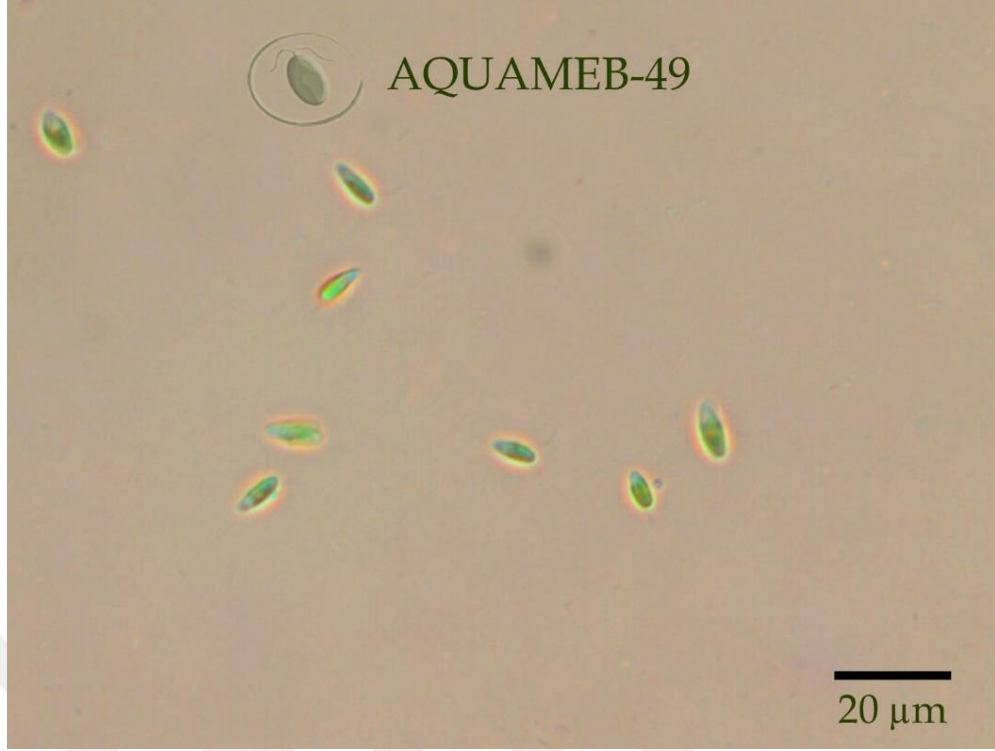
**Şekil 3.17** : AQUAMEB-20, *Dunaliella sp.*, mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir suştur Tuz Gölünden izole edilmiştir.



**Şekil 3.18** : AQUAMEB-21, *Dunaliella sp.*, mikroskop görüntüsü. Halotolerant bir suştur Tuz Gölünden izole edilmiştir.



**Şekil 3.19** : AQUAMEB-22, *Tetraselmis sp.*, mikroskop görüntüsü.



**Şekil 3.20 :** AQUAMEB-49, *Dunaliella sp.*, mikroskop görüntüsü.

Plymouth Erdscheriber (PES) (Tompkins ve diğ., 1995) ortamı içerisinde bulunan bu kültürler L1 (Guillard ve Hargraves, 1993) ortamına akline edilerek deneyler yapılmıştır. Fizyolojik çalışmalarda içeriği tam olarak bilinen kültür ortamları tercih edilmektedir (Ör: L1). Plymouth Erdscheriber ortamı içinde toprak özütü bulunduğu ve toprağın kompozisyonu tam olarak bilinmediğinden deneylerde L1 ortamı tercih edilmiştir.

Ayrı olarak hazırlanan çözeltilerin birleştirilmesi ile elde edilen L1 kültür ortamının içeriği Çizelge 3.1’de verilmiştir. Deniz suyu Marmara Denizi, Mudanya kıyı şeridinden temin edilmiştir. Sırasıyla 1,2  $\mu\text{m}$  ve 0,2  $\mu\text{m}$ ’lik filtrelerden geçirilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. Stok 3 ve 4 hazırlandıktan sonra 121  $^{\circ}\text{C}$  ‘de 15 dakika otoklavlanmış ve bu solüsyonlar steril olarak saklanmıştır. Stok 5 içerisine Stok 1 ve 3 eklenerek pH 8’e ayarlanmıştır. Aynı sıcaklık ve sürede otoklavlanarak steril hale getirilmiştir. Otoklav sonrası soğutularak steril kabin içerisinde Stok 1, 2 ve 4 ilave edilmiştir. Fizyolojik deneyler farklı tuzluluklarda gerçekleştirildiğinden tuzluluk artırmaları farklı miktarlarda eklenen NaCl ile sağlanmıştır. Bu denemelerde kullanılan ortamların tuzluluk değerleri 37 ppt ile 175 ppt arasında değişmiştir. Eklenecek NaCl ve deniz suyu miktarları Çizelge 3.2’de gösterildiği şekilde

belirlenmiştir. Tuzluluk değerleri bir YSI prob ile ölçülerek kontrol edilmiştir (YSI Professional Plus, YSI Incorporated, Ohio, ABD).

**Çizelge 3.1 : L1 Ortamı (Guillard ve Hargraves, 1993)**

<b>Stok</b>	<b>/ 1000 ml</b>
Stok 1 NaNO <sub>3</sub> + NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1 ml
Stok 2 Vitamin Solüsyonu	0,5 ml
Stok 3 Eser Elementler	1 ml
Stok 4 NaCl (4 M)	X
Stok 5 Filtre Deniz suyu	X
	<b>50 ml dH<sub>2</sub>O</b>
Stok 1 NaNO <sub>3</sub>	3,75 gr
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,283 gr
	<b>100 ml dH<sub>2</sub>O</b>
Stok 2 Thiamine-HCl	10 mg
Vitamin B <sub>12</sub>	100 µl (10 ml'de 5 mg)
Biotin	100 µl (10 ml'de 5 mg)
	<b>gr /1000 ml dH<sub>2</sub>O</b>
Stok 3 Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	4,36 gr
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	3,15 gr
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,245 gr
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,0023 gr
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0119 gr
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0025 gr
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,0199 gr
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,00173 gr
NiSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,00263 gr
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	0,00184 gr
K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>	0,00194 gr
	<b>/1000 ml</b>
Stok 4 NaCl (4 M)	236,48 gr

Tuzluluk hesaplamaları için toplam hacimden Stok 1, 2 ve 3 çıkarılmıştır. NaCl gr/lt miktarları baz alınarak konsantrasyonları hesaplanmıştır. 35 ppt 33,03 gr/lt NaCl olarak kabul edilmektedir. Deniz suyu tuzluluğunda bulunan suşlar kullanılmadığı için deniz suyu tuzluluğundaki ortamların hesaplamaları verilmemiştir. Temel olarak NaCl stoğu kullanılmadan sadece deniz suyuna diğer Stok çözeltiler eklenerek elde edilmiştir.

Ayrıca az miktarda kullanılacak ortamlar için fazla miktarlarda ortam hazırlamak yerine yüksek tuzluluk değerinde ve düşük tuzluluk değerindeki ortamlardan alınarak ara tuzluluk ayarlamaları yapılmıştır. Ayarlamalarda istenilen hacim ve tuzluluk değeri belirlenerek (denklem 3.1) düşük ve yüksek konsantrasyondaki ortamlardan ne kadar kullanılarak istenilen tuzluluk elde edileceği hesaplanmıştır.



$$M_s V_s = M_1 \cdot V_1 + M_2 \cdot V_2 \quad (3.1)$$

$M_s$  = İstenilen tuzluluk değeri (ppt)

$V_s$  = İstenilen hacim (ml)

$M_1$  = Düşük konsantrasyondaki tuzlulukta hazırlanan ortam

$V_1$  = Kullanılması gereken hacim (ml) (Düşük konsantrasyondaki ortamın)

$M_2$  = Yüksek konsantrasyondaki tuzlulukta hazırlanan ortam

$V_2$  = Kullanılması gereken hacim (ml) (Yüksek konsantrasyondaki ortamın)

Örnek olarak 40 ml 100 ppt tuzluluk değerinde ortama ihtiyacımız var bunun için elimizde hazır olarak bulunan 37 ppt ve 175 ppt tuzluluk değerlerinde ortamlar bulunmaktadır. Bu iki ortamdan hangi miktarlarda alınarak 100 ppt tuzluluğun elde edileceği bu formül yardımı ile hesaplanabilmektedir. 100 ppt tuzluluk değeri istenilen tuzluluk değeri ( $M_s$ ), 40 ml istenilen hacim ( $V_s$ ), 37 ppt düşük tuzluluk konsantrasyonda hazırlanmış ortam ( $M_1$ ), ne kadar kullanılacağı belirlenmesi istenilen bilinmeyen hacim ( $V_1$ ), 175 ppt yüksek tuzluluk konsantrasyonunda hazırlanmış ortam ( $M_2$ ) ve belirlenmesi istenilen diğer bilinmeyen hacim ( $V_2$ ) şeklindedir. Denklem de iki bilinmeyen olmaması için  $V_2$ ,  $V_1$  cinsinden yazılır. Yani  $V_2 = 40 - V_1$  olarak alınır.  $V_1$  değeri bulunduktan sonra bu eşitlikten de  $V_2$  değeri hesaplanır. Hesaplamalara göre bu değerlerde ortamlardan karıştırılarak istenilen tuzluluk değerindeki ortam elde edilir.

**Çizelge 3.2 :** L1 ortamı tuzluluk değerleri hesaplamalarına göre stok çözelti miktarları

Tuzluluk Değeri	Stok 1	Stok 2	Stok 3	Stok 4	Stok 5
37 ppt	1 ml	0,5 ml	1 ml	45,594 ml	951,910 ml
50 ppt	1 ml	0,5 ml	1 ml	104,500 ml	893,000 ml
75 ppt	1 ml	0,5 ml	1 ml	217,820 ml	779,680 ml
100 ppt	1 ml	0,5 ml	1 ml	331,080 ml	666,420 ml
125 ppt	1 ml	0,5 ml	1 ml	444,350 ml	553,150 ml
150 ppt	1 ml	0,5 ml	1 ml	557,610 ml	439,890 ml
175 ppt	1 ml	0,5 ml	1 ml	670,880 ml	326,600 ml

## 3.2 Moleküler Analizler

### 3.2.1 Genomik DNA izolasyonu

Tezde kullanılan *Dunaliella* spp. suşlarına ait kültürlerin 2 mL'si bir Beckmann Microfuge santrifüjde (Beckman Kaliforniya, ABD) 14000 xg'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Peletlerden genomik DNA izolasyonu Promega Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Wisconsin, ABD) kullanılarak yapılmıştır. İzolasyon için kitle sağlanan protokol takip edilmiştir.

Kit Protokülü;

- 1) Peletler üzerine 600 µl Nuclei Lysis Solution eklenmiş ve vortekslenmiştir.
- 2) Tüpler 65 °C de 15 dakika inkübe edilmiştir.
- 3) Tüplere 3 µl RNase solüsyonu eklenerek, tüp aşağı yukarı çalkalanarak karıştırılmıştır.
- 4) Örneklerin oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir.
- 5) Tüplere 200 µl Protein Precipitation Solution eklenerek, yüksek hızda 20 saniye vortekslenmiştir.
- 6) Tüpler 13.000 xg'de 3 dakika santrifüjlenmiştir.
- 7) Pelete dikkat edilerek süpernatant atılmıştır. Üzerine oda sıcaklığında 600 µl izopropanol eklenerek karıştırılmıştır.
- 8) 13.000 xg'de oda sıcaklığında 1 dakika santrifüjlenerek süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır.
- 9) Oda sıcaklığında 600 µl %70 etanol eklenerek tüp birkaç kez karıştırılarak DNA'nın yıkanması sağlanmıştır.
- 10) 13.000 xg'de oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj yapılarak etanol uzaklaştırılmıştır. 15 dakika etanolün uçması için beklenilmiştir.
- 11) 100 µl DNA Rehydration Solüsyonu eklenerek 65 °C de 1 saat inkübe edilmiştir (Promega, 2009).

Genomik DNA miktarları Biotek Epoch mikropilaka okuyucusunda Take3 plakası kullanılarak belirlenmiştir. Hazır olan DNA -20 °C'de saklanmıştır.

### 3.2.2 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

*Dunaliella* spp. suşlarına ait genomik DNA'lar kullanılarak bu canlıların genomlarındaki ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgesinin tespiti ve çoğaltılması polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile gerçekleştirilmiştir. ITS bölgesi için Goff ve diğ. 1994'te verilen primer çifti tercih edilmiştir (TW81 ve AB28). TW81, rRNA küçük alt grubunun 3' ucuna; AB28 ise rRNA büyük alt grubunun 5' ucuna bağlanarak arada kalan ITS1, 5.8S rRNA ve ITS2 bölgelerini çoğaltmaktadır. PZR reaksiyonları BioRad T100 thermal cycler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bir PZR reaksiyonu toplam 25 µL hacimde 2,5 µL 10X tampon solüsyonu (Promega, Wisconsin, ABD), 2 µL 25 mM MgCl<sub>2</sub> solüsyonu, her birinden 0,5 µL 10 mM dNTP solüsyonu (Promega, Wisconsin, ABD), 10 pmol.µL<sup>-1</sup>lik primerlerden 1'er µL, 1,25 U Taq DNA polimeraz (Promega, Wisconsin, ABD), 1µL genomik DNA ve 16,75 µL steril su içermiştir. TW81 ve AB28 primerleri ile ITS bölgesi için yapılan PZR reaksiyonunda şu program kullanılmıştır: 95 °C, 5 dk, 5 döngü: 90 °C, 1 dk, 50 °C, 2 dk, 1 döngü:72 °C, 1 dk, 30 döngü, 90 °C, 1 dk, 60 °C, 1 dk, 72 °C, 1 dk, son çoğaltma 72 °C, 10 dk (Gonzalez vd. 1999). PZR sonrası ürünler %1,5'lük agaroz jelde yürütülmüş, Promega Diamond Nucleic Acid dye ile 1 saat boyanmış ve Avegene Slite 200W görüntüleme cihazında görüntülenmiştir. Uygun boyuttaki PZR ürünleri jellerden Promega Gel Extraction Kit (Promega, Wisconsin, ABD) veya Thermo GeneJET Gel Extraction Kit (ThermoFisher, Massachusetts, ABD) ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan PZR ürünleri hizmet alımı yoluyla dizilenmiştir. Dizileme, PCR'da kullanılan primerlerle çift yönlü yapılmıştır.

### 3.3 Biyoinformatik Analizler

Elde edilen ITS gen (544 bp) dizileri Mega 6 yazılımı (Tamura ve diğ., 2013) kullanılarak manuel olarak düzeltilmiştir. Tez çalışmasında kullanılan türlerin yakın ve uzak akrabalarına ait gen dizileri National Center for Biotechnology Information (NCBI) veri bankasında bulunan Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) ile elde edilmiştir. Gen dizilerinin hizalanması Mega 6 yazılımında bulunan Muscle (Edgar, 2004) yardımıyla yapılmıştır. Yanına birleştirme (Neighbour-Joining- NJ) ağaçları maksimum kompozit olabilirlik yöntemi kullanılarak 2000 yeniden örnekleme (bootstrapping) ile yapılmıştır. Maksimum olabilirlik (Maximum

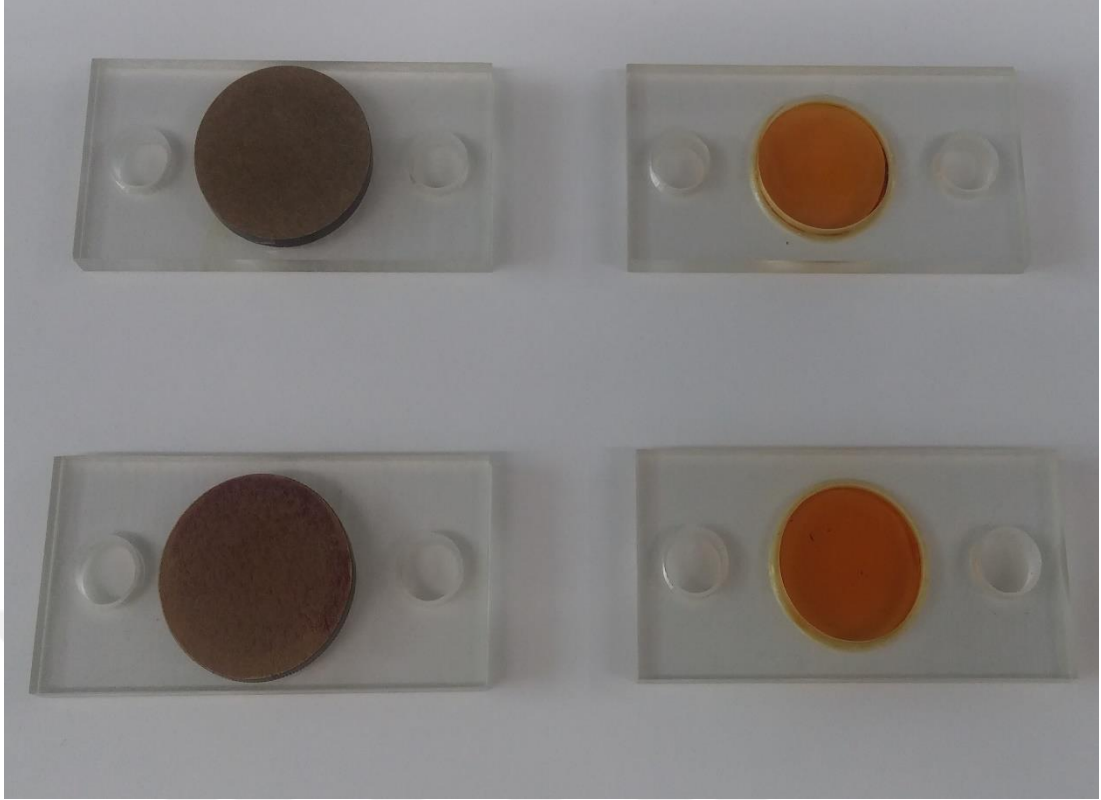
Likelihood- ML) analizi için en uygun nükleotid değişim modeli Mega 6 yazılımındaki model seçme özelliği ile belirlenmiştir (Tamura ve diğ., 2013). Belirlenen bu model kullanılarak ML ağaçları 2000 yeniden örnekleme (bootstrapping) ile oluşturulmuştur.

### 3.4 Mikroalg Kültürlerinin Farklı Tuzluluklara Aklimasyonu

Tez çalışmasında gerçekleştirilecek morfolojik ve fizyolojik denemeler için bahsedilen AQUAMEB suşları farklı tuzluluklardaki L1 kültür ortamına aklime edilmiştir. Aklimasyonlar kültür tuzluluklarının artırılması veya azaltılması ile yapılmıştır. Ön denemelerde ve yapılan literatür araştırmasında kültür ortamı tuzluluklarındaki ani değişimlerin hücrelerin %90'dan fazlasının ölmesine neden olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla aklimasyon sırasındaki duraklama fazı daha uzun sürmektedir. Bu nedenle, Ginzburg vd. (1990) ile Ginzburg ve Ginzburg, (1993)'teki aklimasyon stratejileri temel alınarak bu tez çalışması için bir aklimasyon stratejisi geliştirilmiştir. Bu strateji kültürlerin tuzluluklarının aşamalı olarak azaltılması veya artırılması esasına dayanmaktadır (Çizelge 3.3 ve Şekil 3.22). Bu doğrultuda PES kültür ortamından L1 kültür ortamına aklime olmuş 20 mikroalg suşunun hücre sayıları belirlenmiştir. Her suştan alınan 1 mL üzerine 20 µl lügol solüsyonu ilave edilmiş ve kültürler Utermohl haznelерinde çöktürülmüştür (Şekil 3.21). Olympus CKX41 inverted mikroskopta (Olympus, Tokyo, Japonya) Utermohl haznelерinden 20 rastgele görüntü alınmıştır. Elde edilen 20 fotoğraftaki hücre sayıları Image J programı ile belirlenmiştir (Hötzel ve Croome, 1999). Orijinal kültürlerin birim hacmindeki hücre sayısı Şekil 3.2'de verilen formül ile hesaplanmıştır. Aklimasyon denemeleri her suşun her tuzluluğu için hücre sayıları aynı olacak şekilde başlatılmıştır (70000 hücre. mL<sup>-1</sup>). Dolayısıyla her suştan, nihai 70000 hücre.mL<sup>-1</sup> sayısını sağlamak için, belirli bir hacim alınmış; 3000 xg'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Toplam hücre sayısı formülü denklem 3.2'de verilmiştir. Eski kültür ortamı uzaklaştırılmış ve peletin üzerine taze kültür ortamı ilave edilmiştir. İlave edilecek taze kültür ortamı hacmi ve tuzluluk değişimlerinin nasıl yapılacağına dair örnek Şekil 3.22'de gösterilmiştir. Her tuzluluk grubu için bu şekilde aklimasyon tabloları oluşturulmuştur.

$$\text{Toplam hücre sayısı} = \frac{(\text{sayılan hücre sayısı} \times \text{Utermöhl toplam taban alanı})}{(\text{Bir fotoğraf alanı} \times \text{sayımlanan fotoğraf sayısı} \times \text{çöktürülen hacim})}$$

(3.2)



**Şekil 3.21** : Utermöhl görüntüsü.

Deney ortamlarının tuzluluk artırımı 247.7 ppt stok L1 ile seyreltilmesi ise 0 ppt stok L1 ile yapılmıştır. Toplamda ulaşılan son hacim 20 ml olarak belirlenmiş ve bu hacme 12 saat aralıklarla aşamalı olarak eklenen 0 ppt ve 247. 7 ppt stok ortamlar ile ulaşılmıştır.

**Çizelge 3.3** : Aşamalı olarak gerçekleştirilen tuzluluk değişimleri. Koyu olarak belirtilenler başlangıç tuzluluk değerleridir.

Tuzluluk Değerlerinin Aşamalı Artış ve Azalışları						
37 ppt ↑	37 ppt ↑	37 ppt ↑	37 ppt ↑	37 ppt ↑	37 ppt ↑	37 ppt ↑
50 ppt	50 ppt	50 ppt	50 ppt	50 ppt	50 ppt	50 ppt
<b>59.6 ppt</b>	75 ppt	75 ppt	75 ppt	75 ppt	75 ppt	75 ppt
75 ppt	<b>76.7 ppt</b>	100 ppt	100 ppt	100 ppt	100 ppt	100 ppt
100 ppt	100 ppt	<b>121.45 ppt</b>	125 ppt	125 ppt	125 ppt	125 ppt
125 ppt	125 ppt	125 ppt	150 ppt	150 ppt	150 ppt	150 ppt
150 ppt	150 ppt	150 ppt	<b>162.55 ppt</b>	<b>166.77 ppt</b>	<b>171.25 ppt</b>	170 ppt
175 ppt ↓	175 ppt ↓	175 ppt ↓	175 ppt ↓	175 ppt ↓	175 ppt ↓	175 ppt
						<b>176.7 ppt</b>

Tez çalışmasında kullanılan mikroalg suşlarının farklı tuzluluklara aklimasyonu esnasındaki morfolojik değişimleri incelemek için ilk olarak hedeflenen tuzluluk

değerlerine ulaşıldığında, sonrasında ise 4 gün boyunca her gün kültürlerden 1,5 ml alt-örnek alınmıştır. Alınan örnekler üzerine lügol çözeltisi (1,5 mL içi 30 µl lügol çözeltisi) eklenerek hücreler fikse edilmiştir. Fikse edilen örnekler hücrelerin aklımasyon esnasında en-boy ölçümleri için kullanılmıştır.

Hücrelerin en, boy ve flagella uzunluklarını belirlemek, yapısal değişimleri saptamak amacıyla inverted Olympus mikroskopta 40X büyütmede rastgele 30 farklı hücrenin fotoğrafı çekilmiştir. Morfolojik ölçümler ölçekli fotoğraflar üzerinden Image J programı ile yapılmıştır.

Başlangıç tuzluluk	76.7 ppt	Başlangıç tuzluluk	76.7 ppt	Başlangıç tuzluluk	76.7 ppt
Hedef tuzluluk	75 ppt	Hedef tuzluluk	50 ppt	Hedef tuzluluk	37 ppt
Pelet üzerine eklenecek 76.7 ppt mL'si	19.557 mL	Pelet üzerine eklenecek 76.7 ppt mL'si	13.038 mL	Pelet üzerine eklenecek 76.7 ppt mL'si	9.648mL
Tuzluluk ayarlaması için eklenecek ilk 0 ppt L1 hacmi (HEMEN)-50 ppt	0.443 mL	Tuzluluk ayarlaması için eklenecek ilk 0 ppt L1 hacmi (HEMEN)-50 ppt	6.962 mL	Tuzluluk ayarlaması için eklenecek ilk 0 ppt L1 hacmi (HEMEN)-50 ppt	5.152 mL
				Tuzluluk ayarlaması için eklenecek ikinci 0 ppt L1 hacmi (12 saat sonra)- 37 ppt	5.2 mL

Şekil 3.22 Düşük tuzluluk değerlerine aklımasyon sırasında kullanılan strateji örneği.<sup>1</sup>

### 3.5 Işık Etkisinde Renk Değişimlerinin Saptanması

Tez çalışmasında kullanılan mikroalg suşlarının taksonomik olarak tanımlanmasında yol göstermesi için bu suşların kültür esnasında renk değişimleri incelenmiştir. Bu doğrultuda her suşun 75 ppt tuzluluğa aklime olmuş kültürleri kullanılmıştır. Aynı büyüme fazında kültürler alınarak  $120 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğu, 12:12 saat aydınlık-karanlık döngüsü ve  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  sıcaklıkta büyütülmüştür. Renk değişimlerini

<sup>1</sup> 76.7 ppt orijinal tuzluluktaki örneklerin nasıl seyreltileceği gösterilmiştir.

saptamak amacıyla iki günde bir fotoğraf çekilerek gözlem yapılmıştır. Deneye 4 hafta boyunca devam edilmiştir. Işık düzeni Şekil 3.22’de gösterilmiştir.



**Şekil 3.23** : Tez çalışmasında kullanılan mikroalg suşlarının renk değişimlerini saptamak amacıyla oluşturulan ışık deneyi düzeni.

### **3.6 Seçilen *Dunaliella* spp. Suşlarının Farklı Tuzluluklarda Büyüme Özellikleri**

Genetik olarak en farklı dokuz *Dunaliella* spp. suşu seçilerek farklı tuzluluklarda büyümeleri incelenmiştir. Bu amaçla kısım 3.1’de 37 ppt’den 175 ppt’ye akline edilmiş suşlar kullanılmıştır. Seçilen suşlar şunlardır: AQUAMEB-2, -4, -6, -8, -13, -14, -18, -21, -49. Deneyler üçlü tekrarlar halinde, L1 kültür ortamında ve 50 mL hacimde gerçekleştirilmiştir. Büyüme deneyleri bir Panasonic 352RH iklim kabininde (Panasonic, Osaka, Japonya) 14 saat aydınlık, 10 saat karanlıkta  $120 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğunda  $23 \text{ }^\circ\text{C}$ ’de gerçekleştirilmiştir. *Dunaliella* spp. hücrelerinin büyümesi iki günde bir alınan örneklerin (300  $\mu\text{l}$ ) 750 nm’de optik yoğunluk ölçümleri ile takip edilmiştir. Optik yoğunluk ölçümleri Biotek Epoch Mikroplate Spektrofotometre (Biotek, Winooski, Vermont, ABD) ile yapılmıştır. Deneyler 30-35 gün arasında sürdürülmüş; ölçüm sonuçlarına göre her suşun büyüme grafikleri elde edilmiştir.

Ayrıca başlangıç ve son günde 10'ar ml örnek alınarak suşların  $\beta$ -karoten üretimleri hesaplanmıştır (Bknz kısım 3.5). Kültür kaplarının iklim kabini içerisindeki görüntüsü Şekil 3.23'de gösterilmiştir.



**Şekil 3.24** : Dokuz *Dunaliella* spp. suşunun farklı tuzluluklarda büyümelerinin incelendiği deneylerde kültür kaplarının iklim kabini içerisindeki görüntüsü.

### **3.7 Total Karotenoid Miktarının Belirlenmesi**

Kültürlerden alınan 10'ar mL örnek Beckman Allegra (Beckman, Kaliforniya, ABD) santrifüjde 4000 xg'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Peletler özütlemeye kadar -20 °C'de saklanmıştır. Özütleme işlemi için çözücü madde olarak saf aseton kullanılmıştır. Tüm özütleme işlemi soğukta gerçekleştirilmiştir. Vorteks ile çözgenin örnek ile iyice nüfuz



edebilmesi sağlanmıştır. İşlem sonunda özütler 4 °C’de 4000 xg’de 10 dk santrifüjlenerek süpernantant ölçüm için ayrılmıştır. Örneklerin spektrofotometrede 470 nm, 644.8 nm ve 661.6 nm’de ölçümü yapılmıştır. Ölçüm değerleri aşağıdaki formüllerde yerlerine yazılarak total karotenoid miktarları hesaplanmıştır. Ölçümler VWR UV-1600 PC Spektrofotometrede (VWR, Pensilvanya, ABD) yapılmıştır.

470 nm’de temel olarak karotenoidlerin absorpsiyonu gözlemlenirken çok az miktarda klorofil-a ve klorofil-b’nin de absorpsiyonu gözlemlenmektedir. Bu nedenle total karotenoid miktarı hesaplamalarında klorofil-a ve klorofil-b miktarları da formülden faydalanarak hesaplanmıştır ve 470 nm’deki absorbans değerinden hesaplanmış olan katsayılarla çarpılarak çıkarılmıştır (Pisal ve Lele, 2005). Hesaplamalar için denklemler 3.3 ile 3.6 arasında verilmiştir.

$$C_a = 11.24 \times A_{661.6} - 2.04 \times A_{644.8} \quad (3.3)$$

$$C_b = 20.13 \times A_{644.8} - 4.19 \times A_{661.6} \quad (3.4)$$

$$C_{a+b} = 7.05 \times A_{661.6} - 18.09 \times A_{644.8} \quad (3.5)$$

$$C_{x+c} = 1000 \times A_{470} - 1.90 \times C_a - 63.14 \times C_b \quad (\text{Lichtenthaler, 1987}) \quad (3.6)$$

$C_a$ , klorofil a konsantrasyonunu ( $\mu\text{g/mL}$ ),

$C_b$ , klorofil b konsantrasyonu ( $\mu\text{g/mL}$ ),

$C_{(x+b)}$ , total karotenoid konsantrasyonunu ( $\mu\text{g/ml}$ ) göstermektedir.

### **3.8 *Dunaliella* spp. Suşlarına Işık Yoğunluğu, Sıcaklık ve Tuzluluğun Etkilerinin İncelendiği Faktöriyel Deney Tasarımı**

Tezde incelenen *Dunaliella* spp. suşlarından 5 tanesi, geniş tuzluluk aralıklarına sahip olmaları, iyi büyümeleri, pigmentasyon ve genetik farklılıkları göz önüne alınarak bu kısımdaki deneyler için seçilmiştir. Bu türler sıcaklık, ışık yoğunluğu ve tuzluluk etkilerinin bir arada incelendiği ‘tüm etkenlerin incelendiği’ deney tasarımı metodu (full factorial design) ile incelenmiştir. Her faktör (ışık, sıcaklık ve tuzluluk) için üç seviye belirlenmiş ve  $3^3 = 27$  farklı ortam koşulunun mikroalglerin büyümesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu deney tasarımı hem her bir faktörün mikroalg büyümesi üzerindeki etkisinin hem de bu faktörlerin beraber etkilerinin ortaya çıkarılmasını sağlamıştır. Tez başlangıcında denemelerin 50 mL hacimde

gerçekleştirilmesi planlanmıştır. Ancak kısım 3.4'deki denemelerde hücrelerin sıklıkla plastik kültür kaplarına yapıştığı gözlenmiştir. Her ne kadar hücrelerin kazınması yoluyla bunun önüne geçilmeye çalışılmışsa da, bu durum optik yoğunluk ölçümlerinde hata paylarını artırmıştır. Benzer durum cam kültür kapları için de gözlenmiştir. Dolayısıyla bu kısımdaki denemeler için alternatif kültür yöntemlerinin kullanılması planlanmıştır. Yapılan ön çalışmalar, mikropalakalarda küçük ölçekte gerçekleştirilen büyütme deneylerinin 50 mL hacimdeki denemelere yakın sonuçlar verdiğini göstermiştir. Mikropalakadaki kültürler her ölçüm öncesi mikropipet ile karıştırılmış ve ölçüm için homojen bir karışım elde edilmiştir. Ayrıca mikropalaka kullanımı ile büyük hacimdeki kültür kapları birbirini gölgelediği için, ışık yoğunluğu daha doğru dağıtılabilmektedir. Bu doğrultuda tüm etkenlerin incelendiği deney tasarımı yönteminde 96 kuyucuklu mikropalakalar kullanılmıştır. Böylece hem daha fazla deneme aynı anda başlatılabilmiş hem de deneyler daha fazla tekrarlı gerçekleştirilebilmiştir. Her çevresel koşula ait deneyler iki farklı plakada 3'er tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan tuzluluklar 50 ppt, 100 ppt ve 150 ppt olarak belirlenmiştir. Işık yoğunlukları 50, 150 ve 300  $\mu\text{mol. foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  olmuştur. İklim kabini tek bir sıcaklığa ayarlanabildiği için seçilen her bir sıcaklık ( 23 °C, 27 °C ve 31 °C) ayrı ayrı uygulanabilmiştir. Dolayısıyla sıcaklık rastgele dağıtılamamıştır.

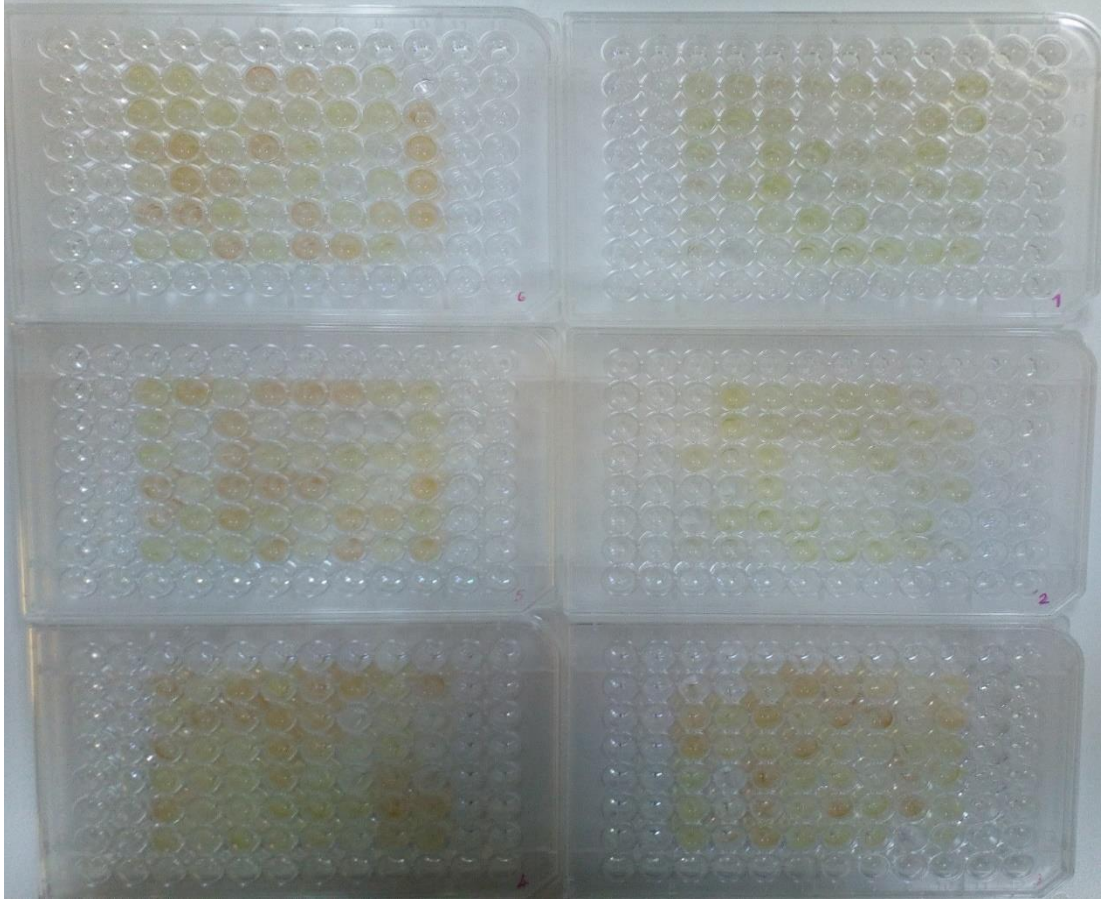
Tüm denemeler 250  $\mu\text{l}$  hacimde gerçekleştirilmiş, mikropalakaların kenar hücreleri kullanılmamıştır (Şekil 3.25 ve 3.26). Kenar hücrelerde gaz alış verişinin daha fazla olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle diğer mikropalaka hücrelerine göre daha farklı bir büyüme gözlenmektedir. Ayrıca kenar kuyularda buharlaşmanın da daha fazla olduğu gözlenmiştir (Pacheco ve diğ., 2013). Deneylerde orta hücrelerdeki buharlaşmayı azaltmak için kenar hücreler saf su ile doldurulmuştur. İklim kabinin nem oranı da %85'e ayarlanarak buharlaşmanın en az seviyede olması sağlanmıştır. Örnekler orta kuyucuklara rastgele dağıtılmıştır. Bu sebeple kullanılacak kuyucuklara numaralar atanmış, rastgele sayılar oluşturularak örnek dağıtımı yapılmıştır. İklim kabinindeki ışık yoğunlukları gözenekli perdeler ile ayarlanmıştır. Plaka konumları bir Li-Cor ışık sensörü (Li-Cor, Nebraska, ABD) ile ölçülerek ayarlanmıştır.

Plate Düzenneği

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Saf su	Saf su	Saf su	Saf su	Saf su	Saf su	Saf su	Saf su	Saf su	Saf su	Saf su	Saf su
B	Saf su	Saf su	AQUA-4-100 ppt	AQUA-4-100 ppt	AQUA-21-100 ppt	AQUA-21-50 ppt	AQUA-8-150 ppt	AQUA-21-50 ppt	AQUA-49-50 ppt	AQUA-2-100 ppt	Saf su	Saf su
C	Saf su	Saf su	AQUA-8-50 ppt	AQUA-8-50 ppt	AQUA-4-150 ppt	AQUA-49-50 ppt	AQUA-49-150 ppt	AQUA-49-100 ppt	AQUA-4-150 ppt	AQUA-8-100 ppt	Saf su	Saf su
D	Saf su	Saf su	AQUA-4-100 ppt	AQUA-49-100 ppt	AQUA-2-150 ppt	AQUA-8-100 ppt	AQUA-21-150 ppt	AQUA-4-50 ppt	AQUA-2-150 ppt	AQUA-49-150 ppt	Saf su	Saf su
E	Saf su	Saf su	AQUA-21-50 ppt	AQUA-4-150 ppt	AQUA-2-100 ppt	Saf su	AQUA-21-150 ppt	AQUA-4-50 ppt	AQUA-21-100 ppt	AQUA-8-50 ppt	Saf su	Saf su
F	Saf su	Saf su	AQUA-4-50 ppt	AQUA-49-100 ppt	AQUA-8-150 ppt	AQUA-2-150 ppt	AQUA-8-100 ppt	Saf su	AQUA-49-150 ppt	AQUA-21-150 ppt	Saf su	Saf su
G	Saf su	Saf su	AQUA-21-100 ppt	Saf su	AQUA-49-50 ppt	AQUA-2-50 ppt	AQUA-2-100 ppt	AQUA-2-50 ppt	AQUA-8-150 ppt	AQUA-2-50 ppt	Saf su	Saf su
H	Saf su	Saf su	Saf su	Saf su	Saf su	Saf su	Saf su	Saf su	Saf su	Saf su	Saf su	Saf su

Şekil 3.25 : 23 °C, 50 ppt ve 50 µmol ışık yoğunluğundaki denemede kullanılan plaka yerleşimi. Kenar kuyucuklar saf su ile doldurulmuştur.

Her bir büyüme deneyi 2 hafta devam ettirilmiştir. Büyüme her bir kuyucuktaki optik yoğunluk ölçümleri ile takip edilmiş ve 750 nm'deki ölçümler Biotek Epoch mikrolaka okuyucusunda belirlenmiştir. Ölçüm öncesinde her kuyucuk içindeki hücreler steril bir ortamda çok kanallı pipet ile karıştırılmış ve yapışan hücreler dağıtılmıştır. Ön denemelerde, karıştırma sonrasında bazı suşlara ait hücrelerin çok çabuk şekilde gruplandığı gözlenmiştir. Bu durum kuyucuk içinde bölgesel yoğunlaşmalara neden olmuştur. Biotek Epoch mikrolaka okuyucusu normal ayarında sadece kuyucuğun ortasından okuma yapmaktadır. *Dunaliella* spp. hücrelerinin kuyucuk içinde gruplanma ihtimali ve yanlış okumanın önüne geçmek için cihaz 9 noktadan okuma yapılması için ayarlanmıştır. Bu 9 noktanın ortalama 750 nm değeri o günün ölçüm değeri olarak kabul edilmiştir. Kör (Blank) olarak kullanılan tuzluluktaki kültür ortamı kullanılmış ve 750 nm'de ölçülen değer çıkarılmıştır.



**Şekil 3.26** : Faktöriyel dizayn deneyinde kullanılan türlerin plate içerisindeki gösterimi

### 3.9 İstatiksel Analizler

R istatistiksel hesaplama ve grafikleri için bilgisayar programı olup aynı zamanda bir programlama dilidir. Yeni Zelanda Auckland Üniversitesinden Ross Ihaka ve Robert Gentleman tarafından ortaya çıkarılan R her geçen gün daha da gelişmekte ve farklı amaçlara hizmet edebilmektedir (Ihaka ve Gentleman, 1996). İçerisinde farklı işlem için uygun olarak kullanılabilen paketler içerir. Bu paketlerden biri olan ggplot2'un basit temel ilkeleri bulunur ve az sayıda özel durum içermektedir. Ham verileri gösteren bir katmanla başlayarak ek açıklama ve istatistiksel özetlerin eklenmesi ile devam eden katmanlı bir çalışma prensibine sahiptir (Wickham, 2009).

Faktöriyel tasarım deneylerindeki verilerin analizi için bir plakadaki örnekler tekrar (replikasyon); diğer plakadaki örnekler ise bağımsız tekrarlar olarak kabul edilmiştir. Böylece her tuzluluk, sıcaklık ve ışık yoğunluğu denemesi iki kez tekrar edilmiştir (n=2). Bir plakaya ait veriler üç tekrar arasındaki varyasyonu göstermiştir.

Grafikler R programının arayüzü olan R Studio'da yapılmıştır. Grafiklerin oluşturulmasında ggplot2 paketi kullanılmıştır. Grafikler hem ortalamayı hem de her tekrara ait büyüme eğrisini gösterecek şekilde sunulmuştur. Ayrıca her ortalamaya ait güven aralıkları sunulmuştur. Böylece gerek tekrarlar arasındaki varyasyon, gerekse de güven aralıklarına bağlı olarak farklı sıcaklık-tuzluluk-ışık yoğunluğu uygulamaları arasındaki farklar gözlenebilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1 Morfolojik ve Genetik Özelliklerine Göre AQUAMEB *Dunaliella* spp. Suşlarının Karakterizasyonu

Tez çalışmasında kullanılan *Dunaliella* spp. suşlarının farklı tuzluluklara aklime olma aşamasında 4 gün boyunca her gün hücrelerin morfolojik ölçümleri için örnekler alınmıştır. Yapılan ön denemelerde, tuzluluğa aklime esnasında 4. günden sonra hücrelerin morfolojik karakterlerinin sabitlendiği belirlendiği için bu ölçümler 4. güne kadar yapılmıştır. Çizelge 4.1’de her *Dunaliella* spp. suşu için 37 ppt ile 175 ppt arasında ölçülen boy ve en uzunluk aralıkları verilmiştir. Suşlar boy ve en aralıklarına göre 3 gruba ayrılmıştır. Büyük suşların (n= 11) boy aralığı 8-20 µm arasında değişirken, en aralıkları 6-18 µm arasında değişmiştir. Orta boyuttaki suşlarda (n= 4) ise boy ve en aralıkları, sırasıyla, 4-12 µm ve 3-10 µm olarak ölçülmüştür. Küçük suşlarda ise (n=2) boy aralıkları 4-10 µm arasında değişirken, en aralıkları 3-7 µm olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.1). *Dunaliella* spp. suşlarında flagella sayısı ikidir.

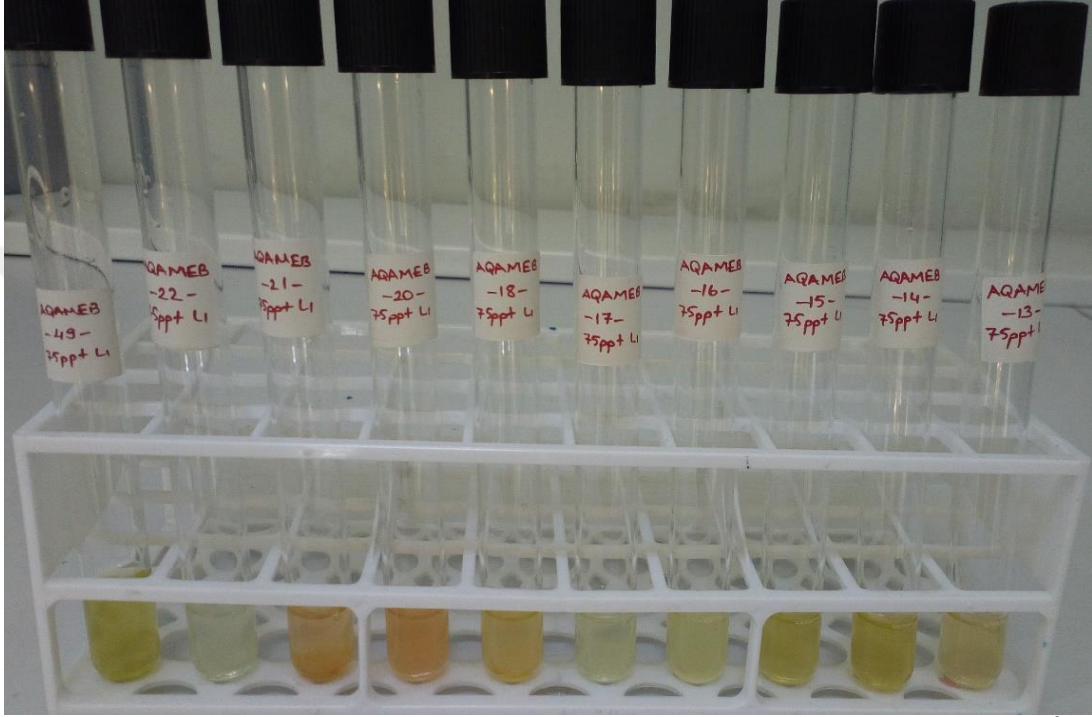
Borowitzka ve Siva 2007, *Dunaliella* spp. suşlarının taksonomik sınıflandırmasında kültür esnasında hücre renklerindeki değişimlerin de (pigmentasyon farklılıklarının) kullanılması gerektiğini belirtmiştir. Bu doğrultuda tezde kullanılan tüm suşlar 4 hafta boyunca bir kültür denemesine tabii tutulmuştur. Kültür ortamları arasındaki tuzluluk farklarından kaynaklanabilecek etkileri ortadan kaldırmak için 75 ppt tuzluluğa aklime edilmiş 20 tür L1 kültür ortamı içinde, 120 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> ışık yoğunluğunda ve 24±2 °C’de büyütülmüştür (16 saat aydınlık: 8 saat karanlık). Denemeler benzer hücre sayısıyla başlatılmış ve kültürlerdeki renk değişimleri, kültür tüplerini iki günde bir fotoğraflayarak takip edilmiştir. Bunların yanı sıra farklı tuzluluklarda büyüme deneylerine tabi tutulan suşlar ile kültür koleksiyonundaki yaşlanmış kültürlerin renkleri de tespit edilerek hücrelerin farklı tuzluluklardaki ve zamana bağlı olarak renk değişimleri analizlere eklenebilmiştir. Tezde kullanılan *Dunaliella* ve *Tetraselmis* suşlarının kültürleri esnasında gözlenen pigmentasyon renkleri Çizelge 4.1’de sunulmuştur. Morfolojik özelliklerine göre büyük boyutta olan *Dunaliella* spp. suşları kültürlerinin erken evrelerinde yeşil renkte olsa da, kültür yaşlandıkça veya

**Çizelge 4.1** : BTÜ Alg ve Siyanobakteri Kültür Koleksiyonu *Dunaliella* spp. *suşlarından* tez çalışmasında kullanılanların bazı morfolojik ve fizyolojik özellikleri.<sup>2</sup>

Kültür Koleksiyonu Numaraları	Hücre eni (µm)	Hücre boyu (µm)	Flagella uzunluğu (µm) /Sayısı	Kültür rengi	İdeal tuzluluk değeri (23 °C, ve 120 µm.foton.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> )	Maksimum total karotenoid içeriği /OD (µg/ml)/Tuzluluk	Tanımlama
AQUAMEB-2	4-10	3-7	3-13/2	Kahverengi-Turuncu	75 ppt	17.53/125 ppt	<i>Dunaliella viridis</i>
AQUAMEB-4	8-20	6-18	9-22/2	Kahverengi-Turuncu	75 ppt	41.95/175 ppt	<i>Dunaliella salina</i>
AQUAMEB-5	8-19	6-15	7-21/2	Kahverengi-Turuncu	-	-	<i>Dunaliella salina</i>
AQUAMEB-6	5-11	4-10	4-16/2	Yeşil	37, 125, 150 ppt	20.86/175 ppt	<i>Dunaliella</i> sp.
AQUAMEB-7	9-20	7-15	10-25/2	Kırmızı	-	-	<i>Dunaliella salina</i>
AQUAMEB-8	5-12	3-9	5-17/2	Yeşil	37, 50, 75 ppt	18.54/175 ppt	<i>Dunaliella</i> sp.
AQUAMEB-9	4-10	4-9	7-18/2	Yeşil	-	-	<i>Dunaliella</i> sp.
AQUAMEB-11	8-17	6-13	7-22/2	Turuncu	-	-	<i>Dunaliella salina</i>
AQUAMEB-12	8-18	6-15	8-24/2	Kahverengi-turuncu	-	-	<i>Dunaliella salina</i>
AQUAMEB-13	6-17	4-12	7-24/2	Kahverengi-turuncu	37-50, 150-175 ppt	48.61/175 ppt	<i>Dunaliella salina</i>
AQUAMEB-14	6-18	6-14	8-23/2	Sarı-yeşil	75 ppt	36.35/50 ppt	<i>Dunaliella salina</i>
AQUAMEB-15	6-16	5-13	9-23/2	Sarı-yeşil	-	-	<i>Dunaliella salina</i>
AQUAMEB-16	5-11	3-8	6-15/2	Yeşil	-	-	<i>Dunaliella</i> sp.
AQUAMEB-17	10-29	8-24	7-23/2	Yeşil	-	-	<i>Tetracelmis</i> sp.
AQUAMEB-18	8-19	7-13	10-23/2	Kahverengi-turuncu	37-125, 175 ppt	33.54/50 ppt	<i>Dunaliella salina</i>
AQUAMEB-20	9-19	8-15	7-22/2	Kırmızı	-	-	<i>Dunaliella salina</i>
AQUAMEB-21	7-19	7-17	8-19/2	Kırmızı	37 ppt	214.48/50 ppt	<i>Dunaliella salina</i>
AQUAMEB-22	10-21	8-19	11-21/4	Yeşil	-	-	<i>Tetracelmis</i> sp.
AQUAMEB-49	4-10	3-6	4-13/2	Sarı-yeşil	100 ppt	20.69/100 ppt	<i>Dunaliella viridis</i> -benzeri

<sup>2</sup> Tez çalışmasında elde edilen sonuçlara göre tür ismi belirlenenler de çizelgede belirtilmiştir. Hücre eni, boy ve flagella uzunlukları 7 farklı tuzlulukta yetiştirilmiş ve ölçümü yapılmış 30 hücrenin boyut aralıklarını yansıtmaktadır.

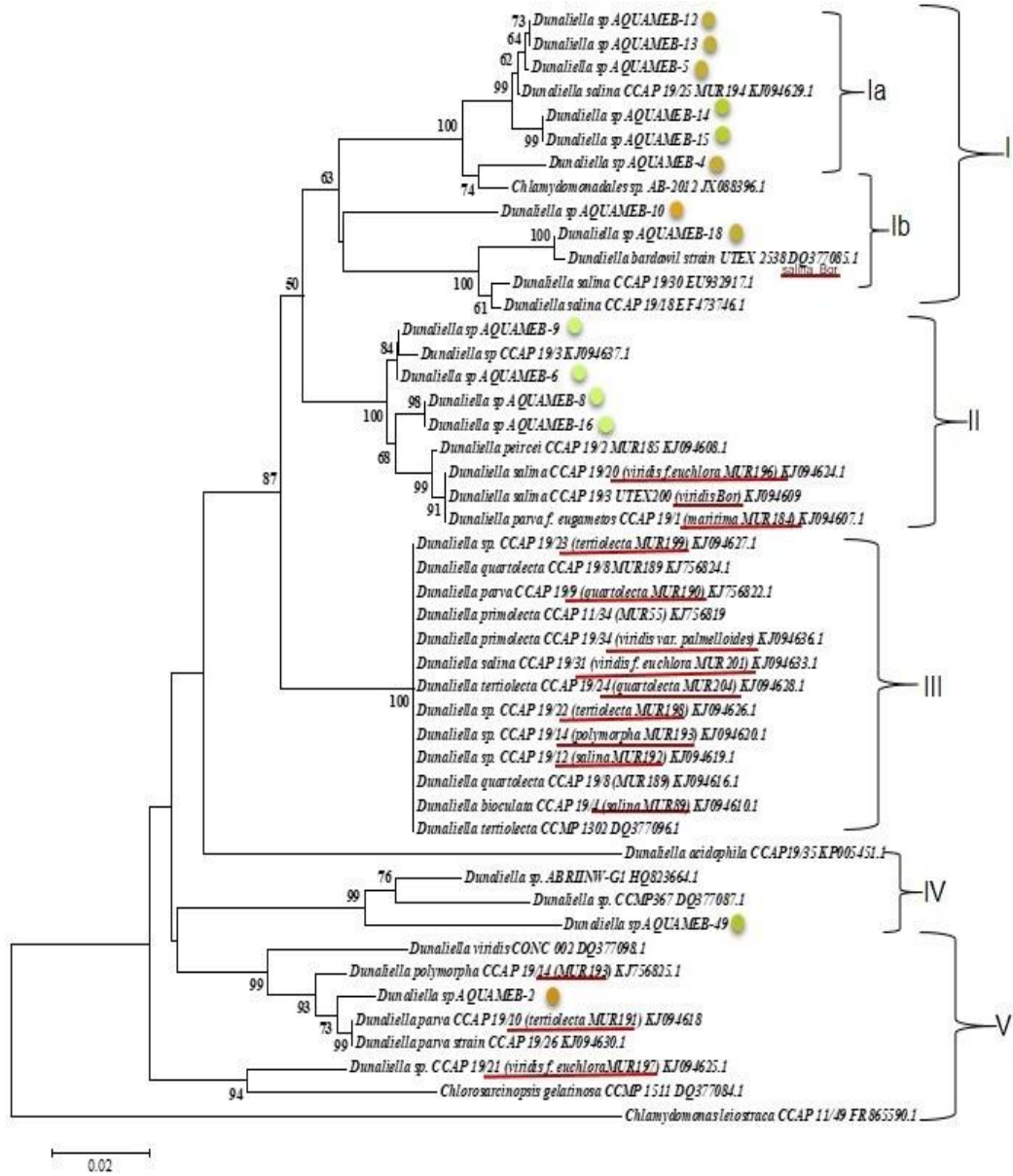
yüksek ışık yoğunluğuna maruz bırakıldığında turuncu, kahve-turuncu ve turuncu-kırmızı renklere sahip olmuştur. Özellikle AQUAMEB 20 ve 21 suşlarının sürekli turuncu-kırmızı renge sahip olduğu görülmüştür. Orta boyuttaki *Dunaliella* spp. suşları ise sürekli yeşil formda kalmıştır. Küçük formdaki *Dunaliella* spp. suşlarından AQUAMEB-2 kahve-turuncu bir renge ulaşmış, AQUAMEB-49 ise kültür yaşlandıkça sarı-yeşil bir renge sahip olmuştur.



**Şekil 4.1** : Bazı AQUAMEB *Dunaliella* sp. suşlarının 4 hafta  $120 \mu\text{mol. foton. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ışığa maruz bırakıldıktan sonra çekilmiş fotoğrafı.

Tez çalışmasında kullanılan *Dunaliella* spp. suşlarının birbirleriyle ve dünyadaki diğer suşlarla genetik benzerliklerini incelemek için ITS dizilemeleri yapılmıştır. ITS filogenetik analizleri için tür tanımlaması güvenilir olan ve özellikle Borowitzka ve Silva (2007) ile Gonzalez ve diğ. (2001)'de verilen suşlar kullanılmıştır. Gerek NJ (Şekil 4.2) gerekse ML (Şekil 4.3) ağaçları benzer sonuçlar vermiştir. Dolayısıyla sonuçlar ML ağacı baz alınarak sunulmuştur. ITS genleri için nükleotid değişim modellerinin ML uyumu Çizelge 4.2'de verilmiştir. ML ITS ağacında *Dunaliella* spp. suşlarının 5 temel grupta toplandığı gözlenmiştir. Birinci grubun içinde yüksek bootstrap değerine sahip iki alt grup vardır (Ia ve Ib). *Dunaliella* sp. AQUAMEB-4, -5, -12, -13, -14, -15 suşları bir *D. salina* suşu ile Ia alt grubunda yer almıştır. AQUAMEB-4 suşu Ia alt grubu içinde diğer suşlara komşu seviyesindedir. Bu suşun





**Şekil 4.2 :** *Dunaliella* sp. AQUAMEB suşlarının ITS genlerine dayalı NJ yöntemi ile elde edilen filogenetik ağacı.<sup>3</sup>

Ia alt grubundaki diğer AQUAMEB suşlarına ITS gen dizisi benzerliği %96 seviyesindeyken, diğer suşların kendi içindeki benzerliği %99 seviyesinde olmuştur.

*Dunaliella* sp. AQUAMEB-18 suşu ise yine *D. salina* suşları ile Ib alt grubunda yer almıştır. AQUAMEB-18'in Ia alt grubundaki AQUAMEB suşlarına ITS gen dizisi

<sup>3</sup> Ağaç ölçekli çizilmiştir ve dal uzunlukları bölge başına baz değişimini gösterir. Analizde 47 dizi ve veri setinde 544 baz pozisyonu vardır. Tüm analizler Mega 6'da yapılmıştır (Tamura vd. 2013). Analizde 2000 yeniden örnekleme (bootstrap) yapılmıştır. %50'nin altındaki bootstrap değerleri gösterilmemiştir. AQUAMEB suşları yanlarında pigmentasyon rengini gösteren yuvarlak şekillerle belirtilmiştir. Altı kırmızı çizgili suşlar Borowitzka ve Siva (2007)'nin önerdiği tür isimleridir.

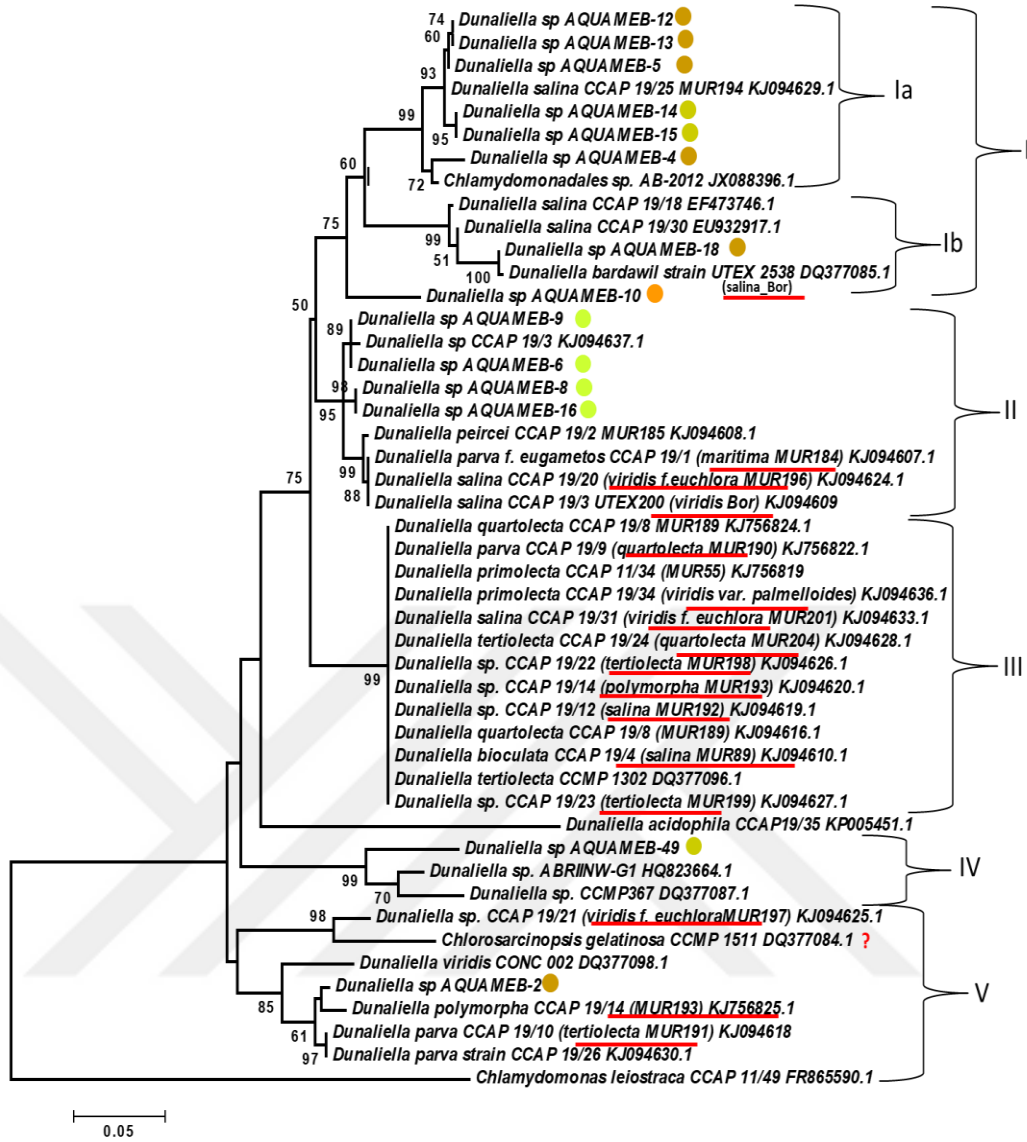
benzerliği %92 seviyesinde olmuştur. *Dunaliella* sp. AQUAMEB-10, Ia ve Ib alt gruplarına komşu olarak konumlanmıştır.

ITS genlerine dayalı ML filogenetik ağaıda 2. grup AQUAMEB-9, -6, -8 ve -16 suşlarının *D. peircei*, *D. maritima* ve *D. viridis* suşları ile gruplanmasından oluşmuştur. İkinci grubun üyeleri arasındaki ITS gen dizisi benzerliği %98'in üzerindedir.

**Çizelge 4.2** : ITS genleri için 24 farklı nükleotid değişim modelinin Maksimum Olabilirlik uyumu.<sup>4</sup>

Model	#Param	BIC	AICc	lnL
K2+G	93	6788,804479	6031,808215	-2922,560259
K2+G+I	94	6795,856042	6030,727455	-2921,012471
T92+G	94	6803,824516	6038,695929	-2924,996708
TN93+G	97	6808,018374	6018,493771	-2911,872928
T92+G+I	95	6810,753542	6037,492791	-2923,387651
TN93+G+I	98	6815,821119	6018,164827	-2910,700731
HKY+G	96	6818,888812	6037,496056	-2922,381716
GTR+G	100	6820,329606	6006,410413	-2902,807835
HKY+G+I	97	6825,858843	6036,33424	-2920,793162
GTR+G+I	101	6828,060887	6006,010482	-2901,599906
K2+I	93	6879,70521	6122,708945	-2968,010624
T92+I	94	6894,400862	6129,272275	-2970,284881
TN93+I	97	6904,488365	6114,963762	-2960,107923
GTR+I	100	6916,281821	6102,362628	-2950,783942
JC+G	92	6982,628574	6233,764791	-3024,545876
JC+G+I	93	6989,562412	6232,566148	-3022,939226
JC+I	92	7064,766525	6315,902742	-3065,614852
K2	92	7154,351388	6405,487604	-3110,407283
TN93	96	7154,873045	6373,480289	-3090,373833
GTR	99	7168,445817	6362,657996	-3081,93951
T92	93	7168,558691	6411,562427	-3112,437365
HKY	95	7182,09821	6408,837459	-3109,059985
HKY+I	96	7192,240147	6410,847391	-3109,057384
JC	91	7331,344965	6590,613822	-3203,977642

<sup>4</sup> Bayezyan Bilgi Kriteri ( BIC) skorları en düşük olan modellerin değişim kalıplarını en iyi açıkladığı kabul edilmiştir. Her model için Düzeltmiş Akaike Bilgi Kriteri ( AICc) ve ML (lnL) değerleri de gösterilmiştir.



**Şekil 4.3 :** *Dunaliella* sp. AQUAMEB suşlarının birbirleriyle ve dünyadaki benzerleri ile ilişkilerini gösteren ve ITS gen dizilerine dayalı ML filogenetik ağacı.<sup>5</sup>

ITS genlerine dayalı ML filogenetik ağaçta 3. grup *D. salina*, *D. primolecta*, *D. quartoelecta* gibi farklı türlere ait dizilerden oluşmuştur. Üçüncü grupta kültür koleksiyonlarının halihazırda kullandığı tür isimleri ile Borowitzka ve Silva (2007)'nin önerdiği düzeltmeler (altı kırmızı çizili) arasındaki farklılıklar göze

<sup>5</sup> Bu suşlara en uygun model Mega 6'da belirlenmiştir (Kimura-2 parametre modeli ve Gama dağılımı [ +G= 0.4151]). Filogenetik ilişkiler bu modeli kullanarak ML yöntemi ile belirlenmiştir. En yüksek log olasılığa sahip ağaç gösterilmiştir (-2926.0559). Ağaç ölçekli çizilmiştir ve dal uzunlukları bölge başına baz değişimini gösterir. Analizde 47 dizi ve veri setinde 544 baz pozisyonu vardır. Tüm analizler Mega 6'da yapılmıştır (Tamura vd. 2013). Analizde 2000 yeniden örnekleme (bootstrap) yapılmıştır. %50'nin altındaki bootstrap değerleri gösterilmemiştir. AQUAMEB suşları yanlarında pigmentasyon rengini gösteren yuvarlak şekillerle belirtilmiştir. Altı kırmızı çizgili suşlar Borowitzka ve Siva (2007)'nin önerdiği tür isimleridir. *Chlamydomonas* dış grup olarak kullanılmıştır. GenBankasından alınan suşların ulaşım kodları eklenmiştir.

çarpmaktadır. Bu grup üyeleri analizde kullanılan ITS bölgesi için %100 gen dizisi benzerliğine sahiptir ve her iki isimlendirmenin de sorunlu olduğu belli olmaktadır. Dördüncü grupta *Dunaliella* sp. AQUAMEB-49 suşu iki *Dunaliella* sp. suşu ile yer almıştır. Diğer taraftan *Dunaliella* sp. AQUAMEB-2 ise 5. grupta *D. parva*, *D. tertiolecta* ve *D. viridis* ile beraber yer almıştır.

*Dunaliella* sp. AQUAMEB-2 ve -49 ML ITS ağacında diğer AQUAMEB suşlarına en uzak seviyededir. AQUAMEB-2 ve -49'un birbirlerine ITS gen dizi benzerliği %88'dir.

AQUAMEB-11, -20 ve -21 suşlarının ITS dizilemeleri 2 kez tekrarlanmasına rağmen başarılı olmamıştır. Bu suşlara ait elde edilen gen dizilemeleri karışık pikler halinde elde edilmiştir. Bunun sebebi her kültür içinde farklı gentotipten suşlar olabileceği gibi kullanılan primerlerin farklı gen bölgelerini de tanınması olabilir.

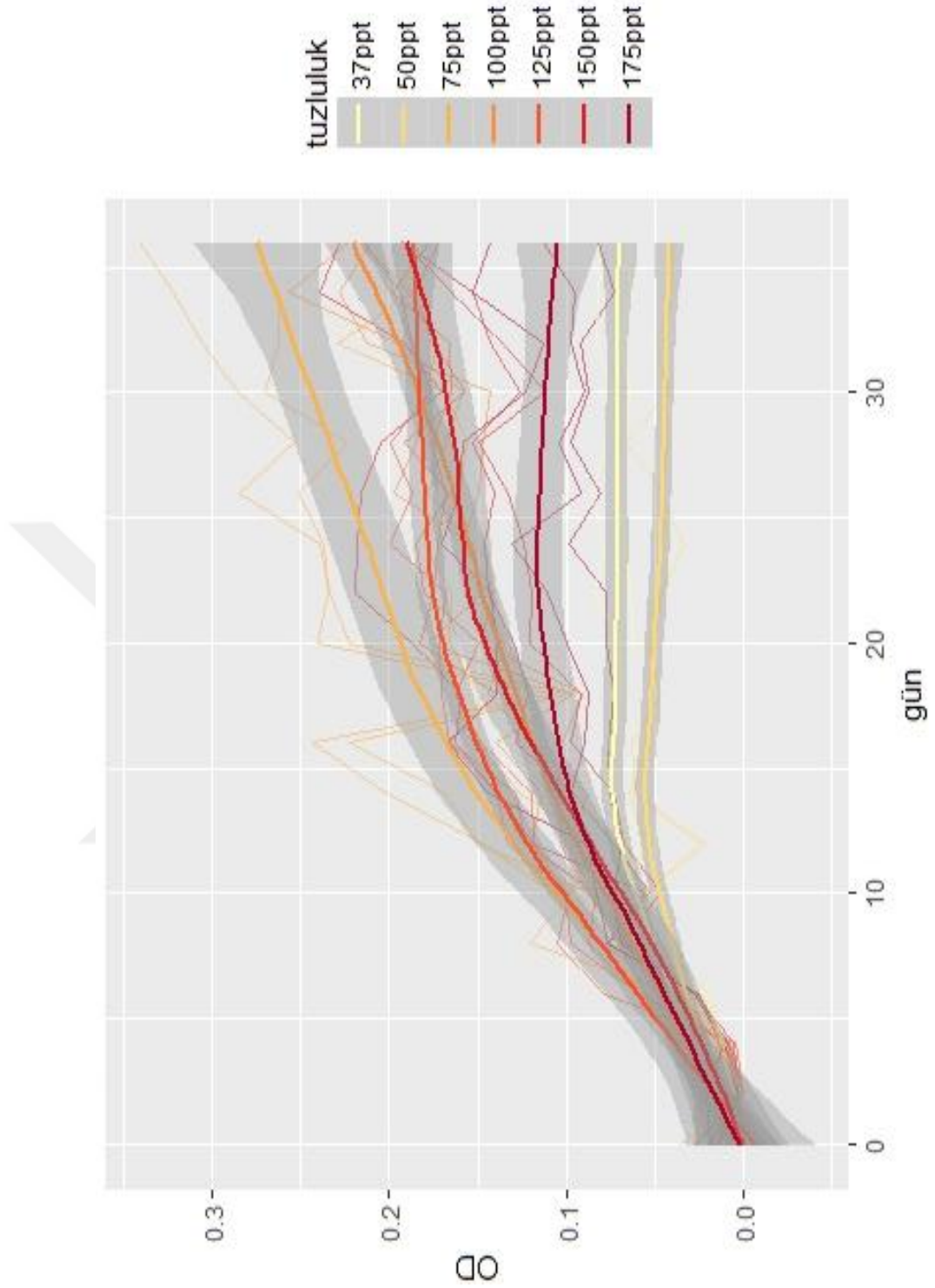
## **4.2 *Dunaliella* spp. AQUAMEB Suşlarının Fizyolojik Özellikleri**

### **4.2.1 Suşların farklı tuzluluklarda büyüme özellikleri**

Morfolojik ve genetik özelliklerine göre farklılık gösteren ve tuz toleransı geniş 9 *Dunaliella* spp. suşu farklı tuzluluklarda büyüme özelliklerinin belirlenebilmesi için seçilmiştir. Seçilen suşlar AQUAMEB-2, -4, -6, -8, -13, -14, -18, -21 ve -49 olmuştur. Otuz yedi ppt'den 175 ppt'ye kadar 7 farklı tuzluluğa aklime edilmiş 9 *Dunaliella* spp. suşunun 30-35 gün boyunca büyümeleri takip edilmiştir.

*Dunaliella* sp. AQUAMEB-2 suşunun farklı tuzluluklardaki kültürüne 36 gün boyunca devam edilmiştir (Şekil 4.7). Kültürlerin logaritmik büyümeleri 10-15 gün arası devam etmiş; sonrasında kültürler durgunluk fazına girmeye başlamıştır. *Dunaliella* sp. AQUAMEB-2 37 ppt, 50 ppt ve 175 ppt'de iyi bir büyüme göstermemiştir. Güven aralıkları göz önüne alındığında en iyi büyüme 75 ppt'de gerçekleşmiştir. Yine güven aralıklarına göre 100 -150 ppt aralığındaki kültürler ise birbirlerine benzer bir büyüme göstermiştir.

*Dunaliella* sp. AQUAMEB-4 suşunun farklı tuzluluklardaki kültürüne 34 gün boyunca devam edilmiştir (Şekil 4.8). En az büyüme 50 ppt ve 175 ppt tuzluluklarda görülürken, en iyi büyüme 75 ppt tuzlulukta gözlenmiştir. Diğer tuzluluklardaki büyüme eğrileri 75 ppt'ye yakındır ve birbirleri arasında anlamlı bir farklılık



**Şekil 4.4 :** *Dunaliella* sp. AQUAMEB-2 suşunun 750 nm'deki optik yoğunluklarına (OD) göre farklı tuzluluklarda büyüme eğrileri.<sup>6</sup>

<sup>6</sup> Grafikte tuzluluk artışına bağlı olarak seri renkleri sarıdan kırmızıya doğru koyulaşmaktadır. İnce çizgiler her bir tekrarda elde edilen bireysel büyüme eğrisini gösterirken, kalın çizgiler ortalama değeri göstermektedir. Gri tonlama tekrarların varyansını yansıtan güven aralığını göstermektedir.

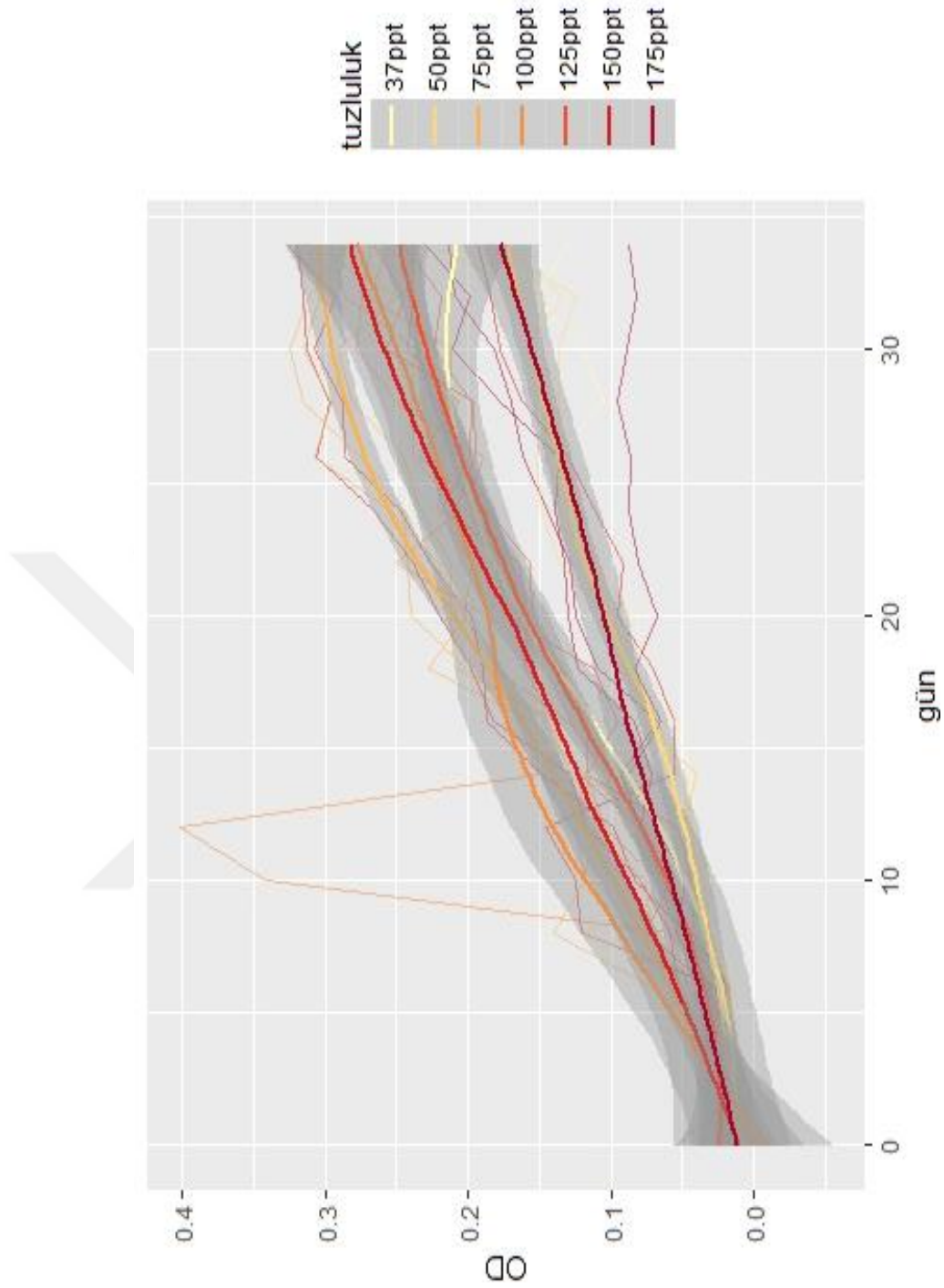
gözlenmemiştir. Otuz dört günlük kültür periyodu sonunda 37 ppt ve 75 ppt'deki kültürler hariç diğerlerinin biyomasında artışın devam ettiği gözlenmiştir.

*Dunaliella* sp. AQUAMEB-6 suşunun farklı tuzluluklardaki kültürüne 30 gün boyunca devam edilmiştir (Şekil 4.9). Kültürlerin logaritmik büyümeleri 10-12 gün arası sürmüştür, ancak 37 ppt'deki kültürlerin 30 gün sonunda dahi büyümeye devam ettiği gözlenmiştir. En iyi büyüme değerleri 37 ppt, 125 ppt ve 150 ppt tuzluluk değerlerinde gözlenmiştir. En düşük büyüme 75 ppt ve 175 ppt tuzluluk değerlerinde görülmüştür.

*Dunaliella* sp. AQUAMEB-8 suşunun farklı tuzluluklardaki kültürüne 30 gün boyunca devam edilmiştir (Şekil 4.10). Kültürlerin logaritmik büyümeleri 10-14 gün arası sürmüş, en iyi büyüme 37 ppt, 50 ppt ve 75 ppt tuzluluk değerlerinde gözlenmiştir. En düşük büyüme 100 ppt tuzlulukta görülürken, 125 ppt, 150 ppt ve 175 ppt tuzluluk değerlerindeki büyümeler benzerdir. Otuz yedi ppt ve 75 ppt hariç tüm tuzlulukta kültürler durgunluk fazına girmişken, bu iki tuzluluk değerindeki kültürlerin büyümesinin 30. günde de devam ettiği gözlenmiştir.

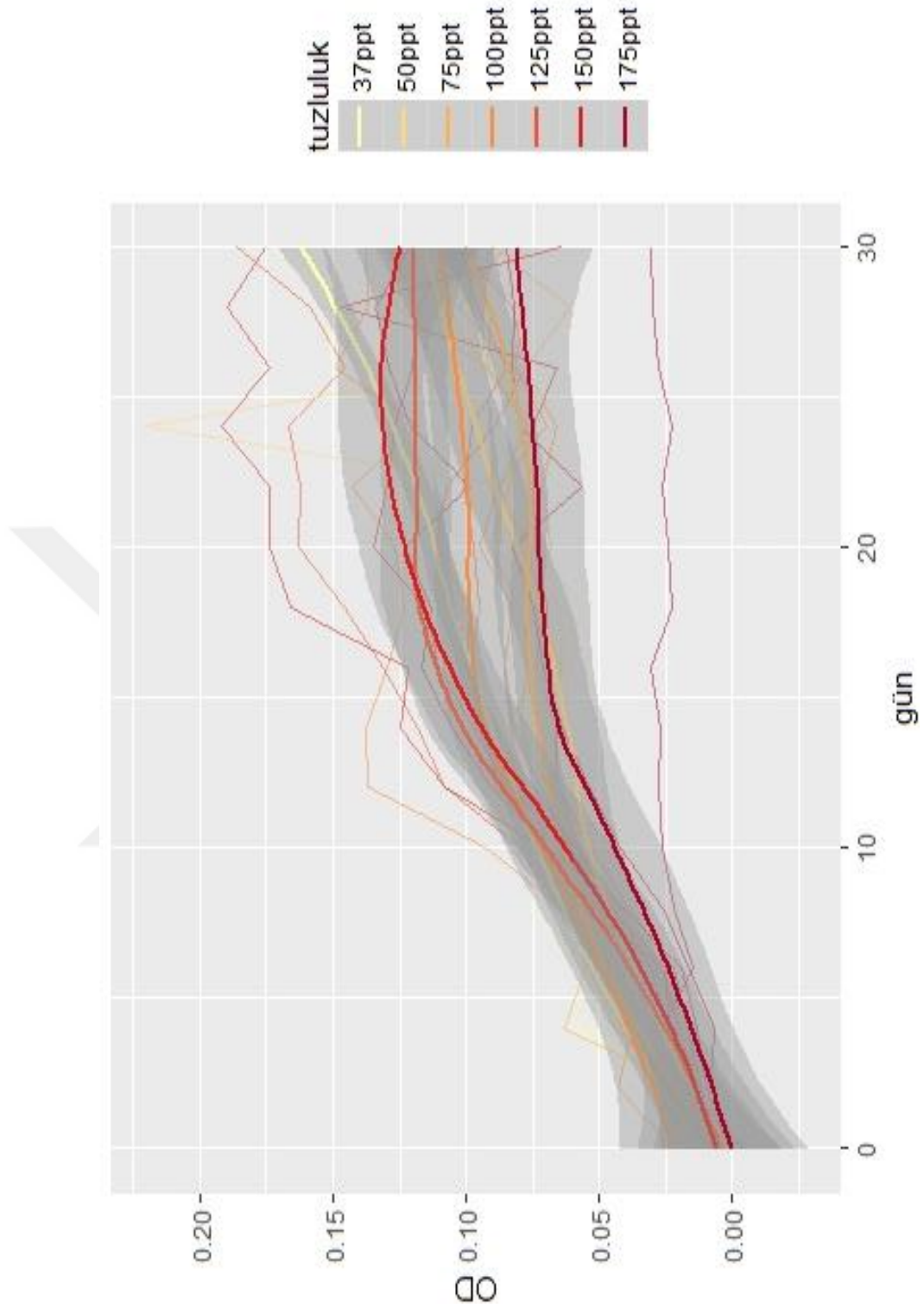
*Dunaliella* sp. AQUAMEB-13 suşunun farklı tuzluluklardaki kültürüne 34 gün boyunca devam edilmiştir (Şekil 4.11). Kültürlerin logaritmik büyümeleri 11-15 gün arası sürmüş, en yüksek biyomasa 37 ppt tuzlulukta ulaşılmıştır. Tüm kültür periyodu göz önüne alındığında en iyi büyüme üç tuzluluk değerlerinde 37 ppt-50 ppt ve 150 ppt-175 ppt'de gözlenmiştir. 37 ppt ve 50 ppt tuzlulukta kültürler 16-20. günler arasında durgunluk fazına girmişken, 150 ppt ve 175 ppt'deki kültürler durgunluk fazına girmeye başlamış olsa da 34. günde dahi büyümeleri devam etmiştir. Diğer taraftan 75 ppt ve 150 ppt tuzlulukta kültürler en yüksek biyomasa 16-17. günlerde ulaşmış sonra hızlı bir ölüm fazına girmiştir.

*Dunaliella* sp. AQUAMEB-14 suşunun farklı tuzluluklardaki kültürüne 34 gün boyunca devam edilmiştir (Şekil 4.12). Yetmişbeş ppt tuzluluk değerindeki kültürler hariç, diğer kültürlerin logaritmik büyümeleri 10-14 gün arası sürmüştür. En iyi büyüme 75 ppt tuzluluk değerinde gözlenmiş ve 34. günde dahi kültür büyümesini sürdürmüştür. İkinci en yüksek biyomasa 50 ppt tuzluluk değerinde ulaşılmış, ancak yaklaşık 15. günde durgunluk fazına giren bu kültürün nihai biyomas değeri 37 ppt ile 100 ppt-175 ppt aralığındaki kültürlere benzer olmuştur.



**Şekil 4.5 :** *Dunaliella* sp. AQUAMEB-4 suşunun 750 nm'deki optik yoğunluklarına (OD) göre farklı tuzluluklarda büyüme eğrileri.<sup>7</sup>

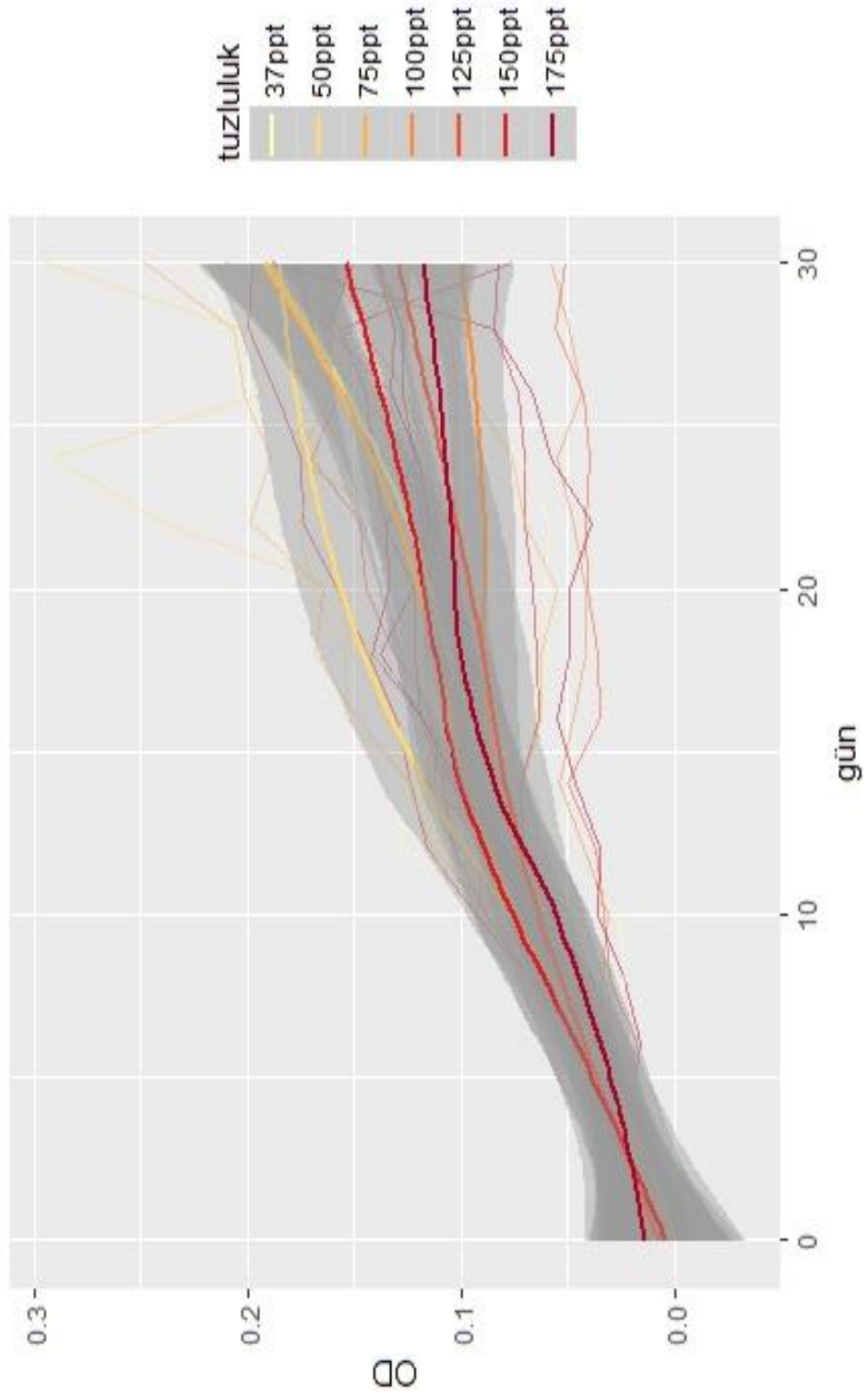
<sup>7</sup> Grafikte tuzluluk artışına bağlı olarak seri renkleri sarıdan kırmızıya doğru koyulaşmaktadır. İnce çizgiler her bir tekrarda elde edilen bireysel büyüme eğrisini gösterirken, kalın çizgiler ortalama değeri göstermektedir. Gri tonlama tekrarların varyansını yansıtan güven aralığını göstermektedir.



**Şekil 4.6 :** *Dunaliella* sp. AQUAMEB-6 susunun 750 nm'deki optik yoğunluklarına (OD) göre farklı tuzluluklarda büyüme eğrileri<sup>8</sup>

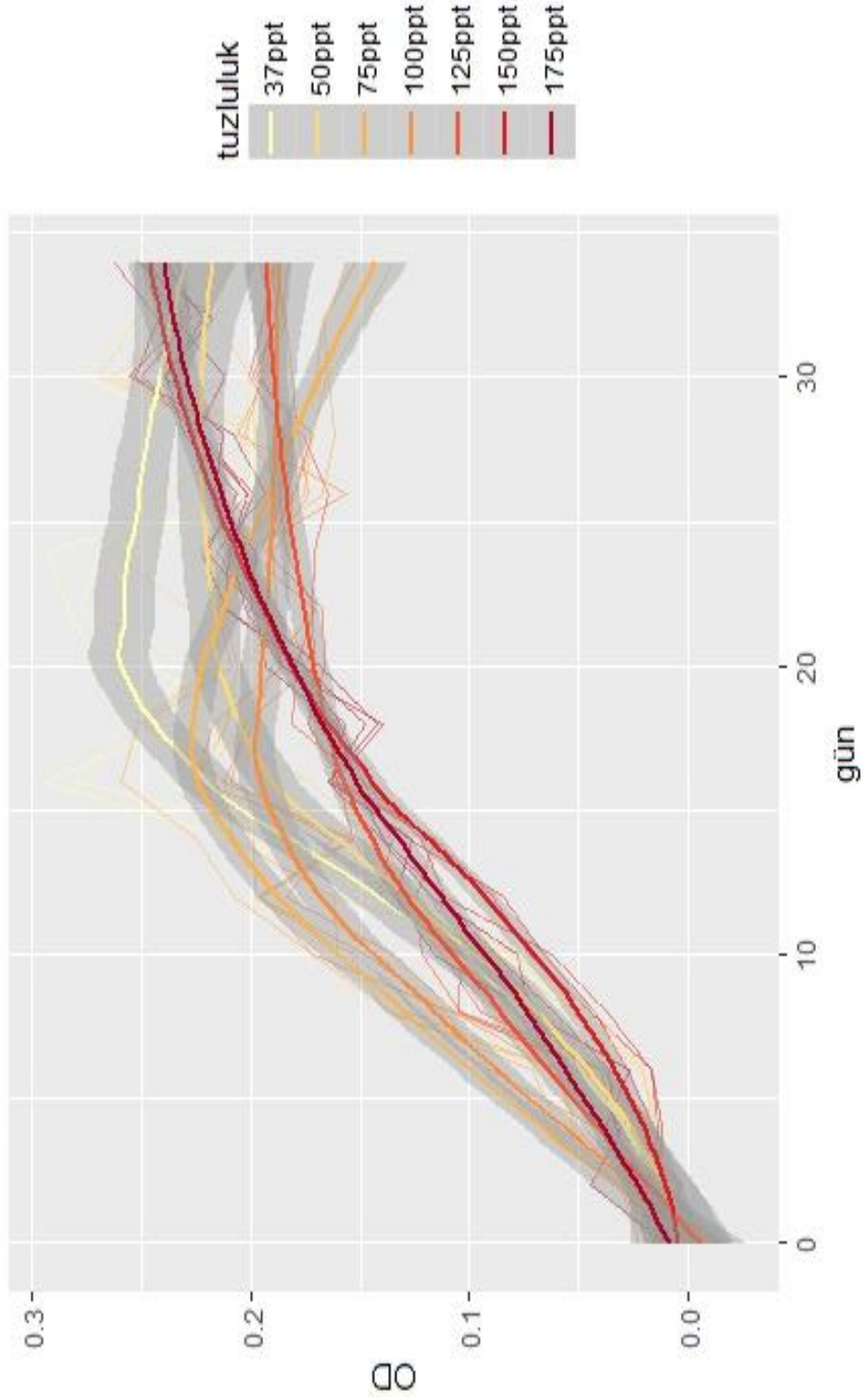
<sup>8</sup>. Grafikte tuzluluk artışına bağlı olarak seri renkleri sarıdan kırmızıya doğru koyulaşmaktadır. İnce çizgiler her bir tekrarda elde edilen bireysel büyüme eğrisini gösterirken, kalın çizgiler ortalama değeri göstermektedir. Gri tonlama tekrarların varyansını yansıtan güven aralığını göstermektedir.





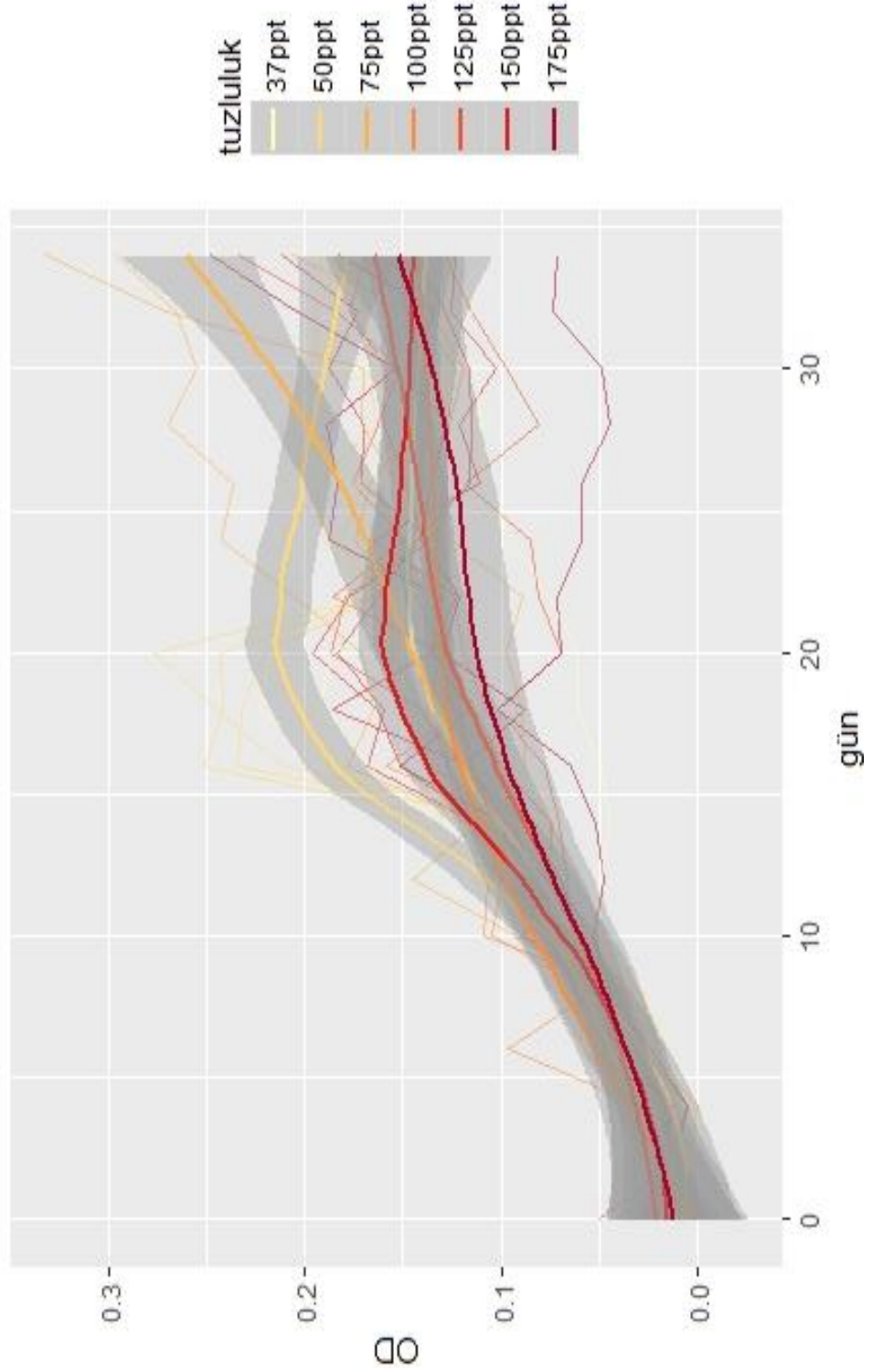
**Şekil 4.7 :** *Dunaliella sp.* AQUAMEB-8 suşunun 750 nm'deki optik yoğunluklarına (OD) göre farklı tuzluluklarda büyüme eğrileri.<sup>9</sup>

<sup>9</sup> Grafikte tuzluluk artışına bağlı olarak seri renkleri sarıdan kırmızıya doğru koyulaşmaktadır. İnce çizgiler her bir tekrarda elde edilen bireysel büyüme eğrisini gösterirken, kalın çizgiler ortalama değeri göstermektedir. Gri tonlama tekrarların varyansını yansıtan güven aralığını göstermektedir



**Şekil 4.8 :** *Dunaliella* sp. AQUAMEB-13 suşunun 750 nm’deki optik yoğunluklarına (OD) göre farklı tuzluluklarda büyüme eğrileri.<sup>10</sup>

<sup>10</sup> Grafikte tuzluluk artışına bağlı olarak seri renkleri sarıdan kırmızıya doğru koyulaşmaktadır. İnce çizgiler her bir tekrarda elde edilen bireysel büyüme eğrisini gösterirken, kalın çizgiler ortalama değeri göstermektedir. Gri tonlama tekrarların varyansını yansıtan güven aralığını göstermektedir.



**Şekil 4.9 :** *Dunaliella sp.* AQUAMEB-14 suşunun 750 nm'deki optik yoğunluklarına (OD) göre farklı tuzluluklarda büyüme eğrileri.<sup>11</sup>

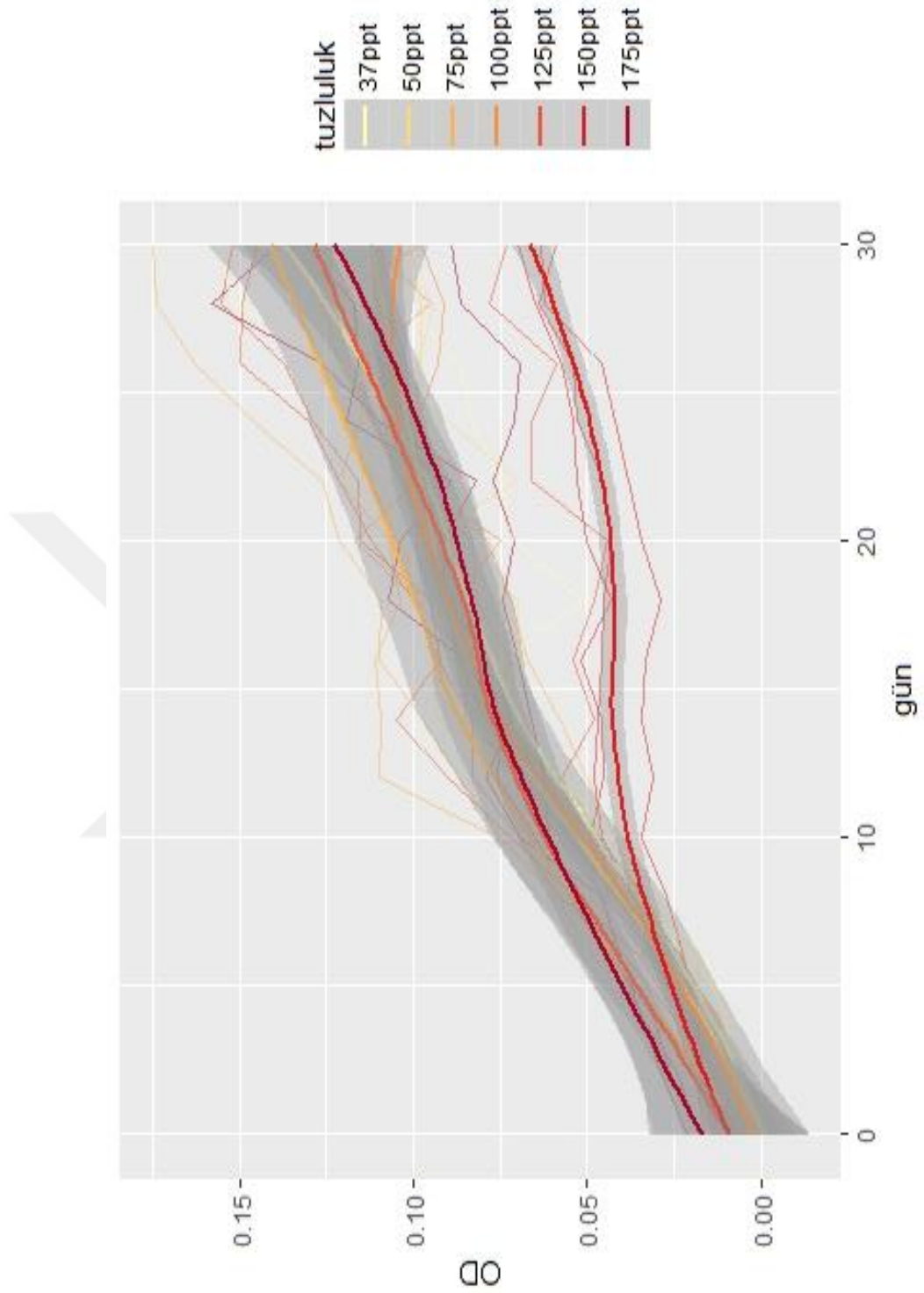
<sup>11</sup> Grafikte tuzluluk artışına bağlı olarak seri renkleri sarıdan kırmızıya doğru koyulaşmaktadır. İnce çizgiler her bir tekrarda elde edilen bireysel büyüme eğrisini gösterirken, kalın çizgiler ortalama değeri göstermektedir. Gri tonlama tekrarların varyansını yansıtan güven aralığını göstermektedir.

*Dunaliella* sp. AQUAMEB-18 suşunun farklı tuzluluklardaki kültürüne 30 gün boyunca devam edilmiştir (Şekil 4.13). Kültürlerin logaritmik büyümeleri 8-15 gün arası sürmüştür, sonrasında büyüme yavaşlamıştır. 150 ppt tuzluluktaki kültür hariç, tüm tuzlukların benzer bir büyüme gösterdiği gözlenmiştir.

*Dunaliella* sp. AQUAMEB-21 suşunun farklı tuzluluklardaki kültürüne 34 gün boyunca devam edilmiştir (Şekil 4.14). Tüm tuzluluktaki kültürlerin büyüme eğrileri birbirine benzerdir ancak büyüme eğrilerinin eğimleri farklıdır. Dolayısıyla en iyi büyüme ve en yüksek biyomas 37 ppt tuzluluktaki kültürlerde gözlenmiştir. Diğer tuzluluklardaki büyüme değerleri birbirine benzer ancak 37 ppt'den anlamlı olarak düşüktür.

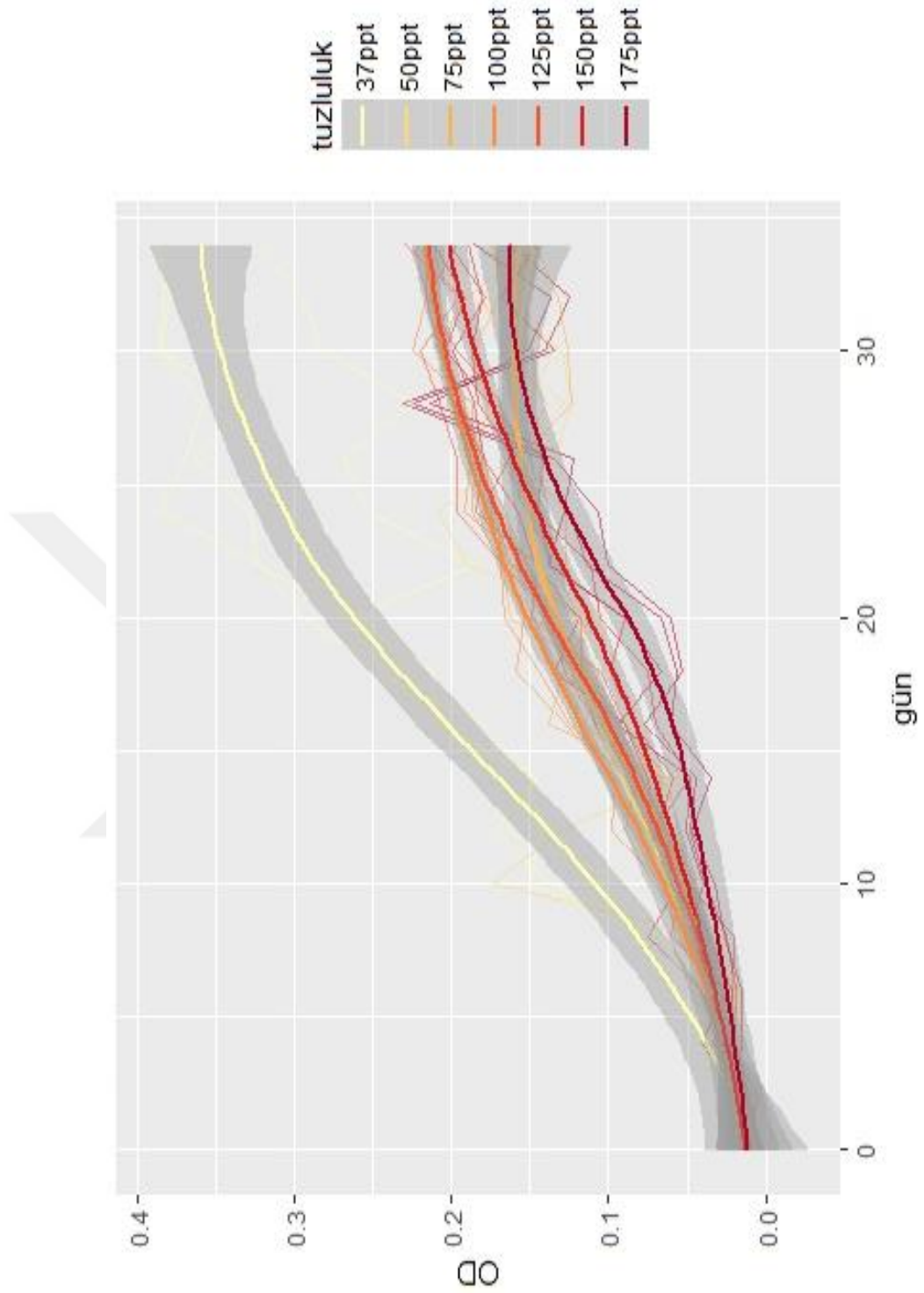
*Dunaliella* sp. AQUAMEB-49 suşunun farklı tuzluluklardaki kültürüne 34 gün boyunca devam edilmiştir (Şekil 4.15). Yüz ppt tuzluluk değeri hariç tüm tuzluluk değerlerindeki kültürler yaklaşık 15. günden itibaren durgunluk fazına girmeye başlamıştır. En iyi büyüme 100 ppt tuzluluk değerinde görülmüş, 34. günde dahi bu tuzluluk değerindeki kültürler büyümeye devam etmiştir. İkinci en yüksek biyomasa 37 ppt tuzluluk değerinde ulaşılmıştır. Yüz elli ve 175 ppt tuzluluk değerlerindeki kültürler deney başlangıcında 5 günlük bir duraklama fazı yaşamış, sonrasında logaritmik olarak büyümüş ve 15. günden itibaren duraklama fazına girmeye başlamıştır. Otuz yedi ve 100 ppt tuzluluktaki kültürler hariç diğer kültürlerin ulaştığı maksimum biyomas değerleri benzerdir.

Genel olarak grafiklerin güven aralıkları birbirine yakın olduğu görülmektedir. Fakat *Dunaliella* sp. AQUAMEB-21 suşunun 37 ppt değerinde diğer tuzluluk değerleri ile kıyaslandığında anlamlı bir farklılık gözlenmektedir. Bu tuzluluk değerinde spesifik olarak daha iyi bir büyüme gösterdiği söylenebilir. *Dunaliella* sp. AQUAMEB-2 de bu kadar bariz bir farklılık olmasa diğer tuzluluk değerleri ile kıyaslandığında 75 ppt tuzluluk değerinde anlamsal bir farklılık göstererek daha iyi bir büyümeyi bu değerde göstermiştir.



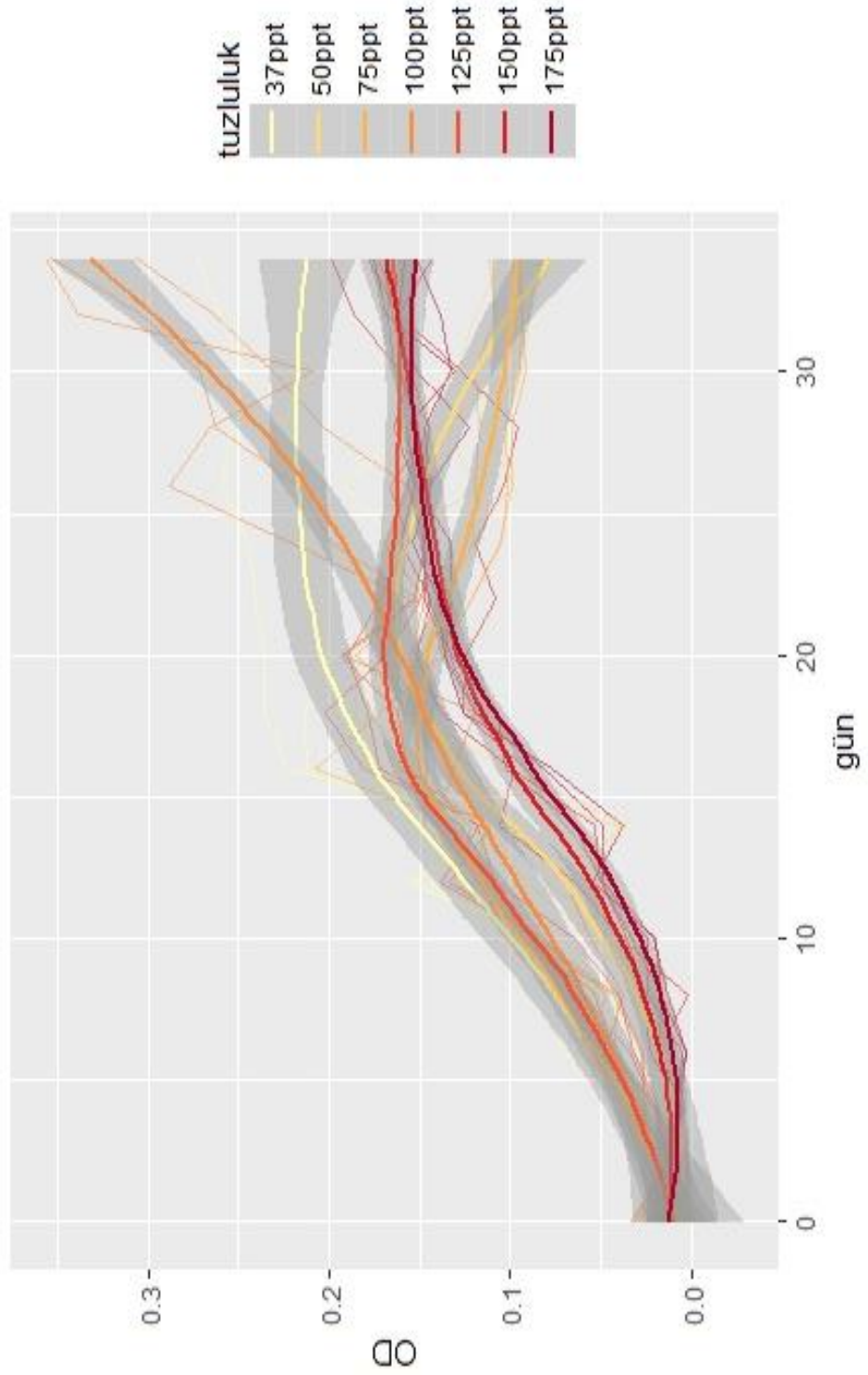
**Şekil 4.10 :** *Dunaliella sp.* AQUAMEB-18 suşunun 750 nm’deki optik yoğunluklarına (OD) göre farklı tuzluluklarda büyüme eğrileri.<sup>12</sup>

<sup>12</sup> Grafikte tuzluluk artışına bağlı olarak seri renkleri sarıdan kırmızıya doğru koyulaşmaktadır. İnce çizgiler her bir tekrarda elde edilen bireysel büyüme eğrisini gösterirken, kalın çizgiler ortalama değeri göstermektedir. Gri tonlama tekrarların varyansını yansıtan güven aralığını göstermektedir.



**Şekil 4.11 :** *Dunaliella sp.* AQUAMEB-21 suşunun 750 nm'deki optik yoğunluklarına (OD) göre farklı tuzluluklarda büyüme eğrileri.<sup>13</sup>

<sup>13</sup> Grafikte tuzluluk artışına bağlı olarak seri renkleri sarıdan kırmızıya doğru koyulaşmaktadır. İnce çizgiler her bir tekrarda elde edilen bireysel büyüme eğrisini gösterirken, kalın çizgiler ortalama değeri göstermektedir. Gri tonlama tekrarların varyansını yansıtan güven aralığını göstermektedir.



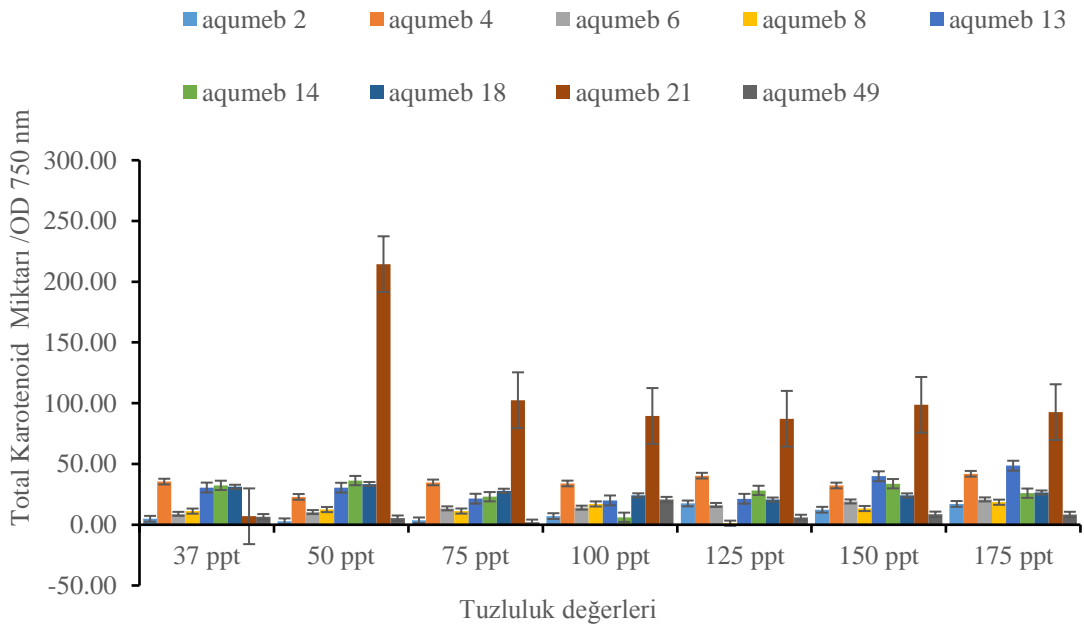
**Şekil 4.12 :** *Dunaliella sp.* AQUAMEB-49 suşunun 750 nm’deki optik yoğunluklarına (OD) göre farklı tuzluluklarda büyüme eğrileri.<sup>14</sup>

<sup>14</sup> Grafikte tuzluluk artışına bağlı olarak seri renkleri sarıdan kırmızıya doğru koyulaşmaktadır. İnce çizgiler her bir tekrarda elde edilen bireysel büyüme eğrisini gösterirken, kalın çizgiler ortalama değeri göstermektedir. Gri tonlama tekrarların varyansını yansıtan güven aralığını göstermektedir.

#### 4.2.2 Total karotenoid ölçümleri

Kısım 4.2.1’de gerçekleştirilen büyüme deneyleri esnasında kültürlerin son gününde örnekler alınarak total karotenoid miktarları hesaplanmıştır. Böylece her suşun tuzluluğa bağlı olarak pigment üretimi belirlenmiştir. Bu hem tür tanımlamasında kullanmak hem de biyoteknolojik olarak pigment üretiminde değerlendirilebilecek suşların tespiti için yapılmıştır.

Biyomasa göre normalize edilmiş total karotenoid miktarları göz önüne alındığında, hücre başına en yüksek total karotenoid üretimi *Dunaliella* sp. AQUAMEB-21’de görülmüştür. Bu suş 37 ppt hariç tüm tuzluluk değerlerinde en yüksek total karotenoid içeriğine sahip olmuştur. Hücre başına en yüksek total karotenoid üretimi ise 50 ppt tuzluluk değerinde elde edilmiştir. Örnek alınan son günde bu suşun en yüksek ortalama OD değeri 37 ppt tuzlulukta görülmüştür ( $OD_{750\text{ nm}}=0,36 \pm 0,036$ ) (Şekil 4.13). Diğer taraftan en yüksek total karotenoid içeriğinin ölçüldüğü 50 ppt tuzluluk değeri en düşük OD değerine sahip tuzluluk denemesi olmuştur ( $OD_{750\text{ nm}}=0,145 \pm 0,002$ ). Bu sonuçlar yüksek karotenoid üretiminin hücre büyümesini yavaşlattığı şeklinde yorumlanabilir. Tüm suşlar göz önüne alındığında *Dunaliella* sp.AQUAMEB-21 suşu diğer suşlardan 2 ile 5 kat daha fazla total karotenoid üretmiştir. *Dunaliella* sp. AQUAMEB-4, -13, -14, ve -18 suşları diğer yüksek karotenoid üreticileri olarak belirlenmiştir.



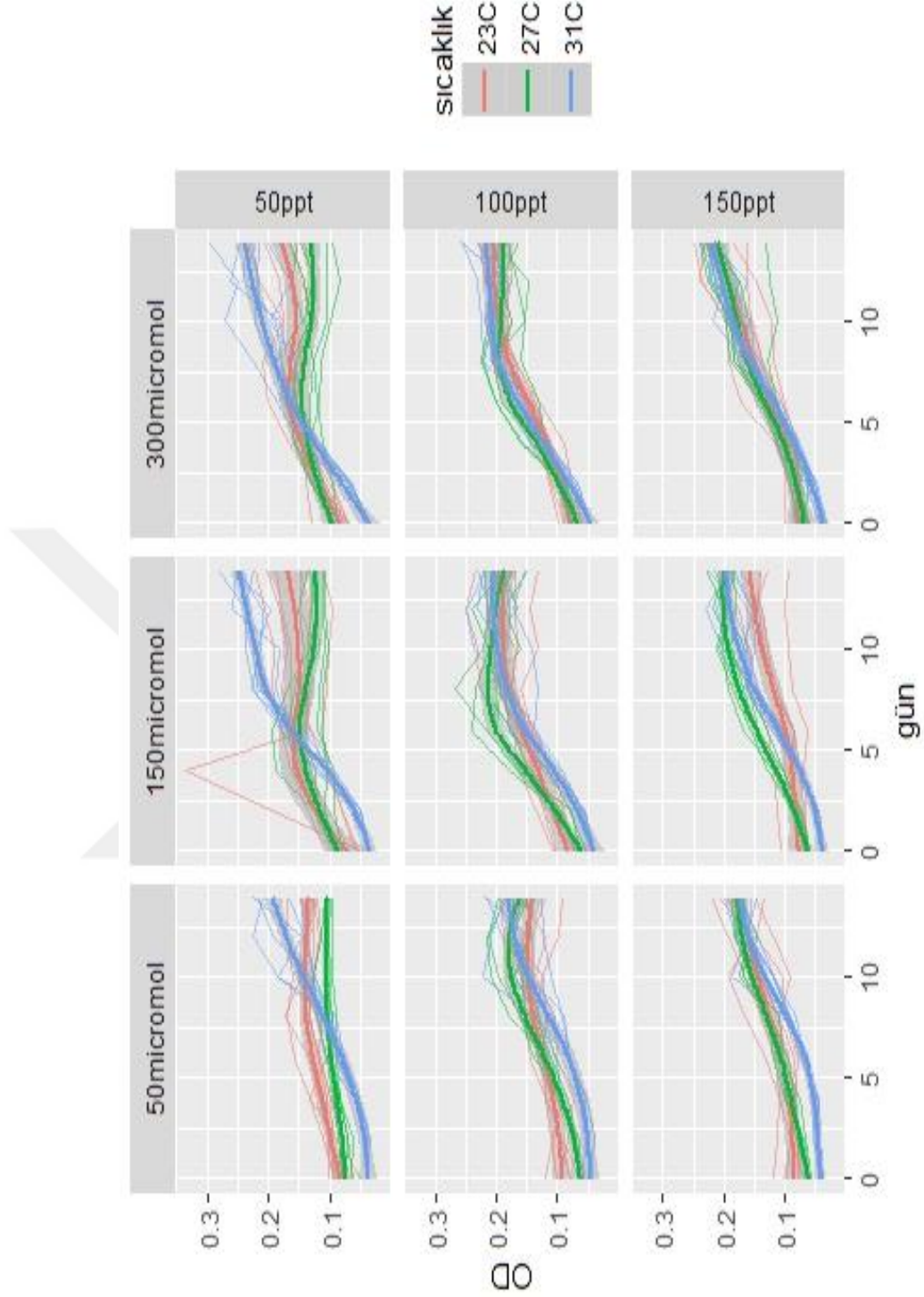
**Şekil 4.13 :** Büyüme deneylerinde alınan örneklerin total karotenoid ölçümleri. Aynı tuzluluktaki her tür farklı renklerle gösterilmiştir.



### 4.3 Işık Yoğunluğu, Sıcaklık ve Tuzluluğun *Dunaliella* spp. AQUAMEB Suşlarının Büyümesine Etkisi

Genetik, morfolojik ve fizyolojik farklılıklara sahip 5 suş sıcaklık, tuzluluk ve ışık yoğunluğunun etkilerinin beraber incelenmesi için seçilmiştir. Bu suşlar *Dunaliella* spp. AQUAMEB-2, -4, -8, -21 ve -49'dur. Onbeş gün boyunca ölçüm alınarak büyüme grafikleri oluşturulmuştur.

*Dunaliella* sp. AQUAMEB-2 suşu iki haftalık kültür periyodu sonunda tüm sıcaklık, tuzluluk ve ışık yoğunluğu kombinasyonlarında durgunluk fazına girmiştir (Şekil 4.14). Sadece tüm sıcaklık denemelerinde 150 ppt ve 300  $\mu\text{mol. foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğu kombinasyonlarında logaritmik artış sürmüştür. Elli ppt tuzlulukta en iyi büyüme tüm ışık yoğunluğu değerleri için 31 °C'de gözlenmiştir. Bu sıcaklık denemelerindeki kültürlerin başlangıç OD'lerinin de diğer sıcaklık uygulamalarındaki kültürlerden düşük olduğu göz önüne alınırsa 31 °C'deki büyüme daha belirgin olmaktadır (Şekil 4.14). Elli ppt tuzluluk ve 50  $\mu\text{mol. foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğundaki kültürler 23 °C'de 27 °C'ye göre daha iyi büyümüşken, diğer ışık yoğunluklarında bu iki sıcaklık grubundaki büyüme birbirine benzerdir. Yüz ppt tuzlulukta en düşük büyüme tüm sıcaklık grupları için 50  $\mu\text{mol. foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğunda gözlenmiştir. Yüz elli ve 300  $\mu\text{mol. foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluklarındaki büyüme eğrileri birbirine yakındır. En yüksek biyomas değerine 0,22 OD ile 100 ppt-150  $\mu\text{mol. foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğu kombinasyonunda 27 °C'de; 100 ppt-300  $\mu\text{mol. foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğu kombinasyonunda ise 31 °C'de ulaşılmıştır. Ancak başlangıç OD'leri göz önüne alındığında 100 ppt'deki kültürlerin tüm ışık yoğunluklarında 31 °C'de biraz daha iyi büyüdüğü grafiklerden anlaşılmaktadır. Yüz elli ppt tuzluluk kombinasyonlarında en düşük büyüme tüm sıcaklık grupları için 50  $\mu\text{mol. foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğunda gözlenmiştir. Bu tuzlulukta 150  $\mu\text{mol. foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğunda, başlangıç OD'leri ve güven aralıkları göz önüne alındığında, 27 °C ve 31 °C'deki kültürler benzer büyüme oranı göstermişlerdir. Yüz elli ppt ve 300  $\mu\text{mol. foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğunda ise tüm kültürlerin her 3 sıcaklık değerinde benzer büyüme oranı gösterdiği ve logaritmik artışlarını devam ettirdikleri gözlenmiştir (Şekil 4.14). *Dunaliella* sp. AQUAMEB-2 suşu için tüm kombinasyonlar değerlendirildiğinde en yüksek optik yoğunluk değerlerine 50 ppt ve 31 °C uygulamalarında ulaşılmıştır. Bu tuzluluk ve sıcaklık değerlerinde 150  $\mu\text{mol. foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$



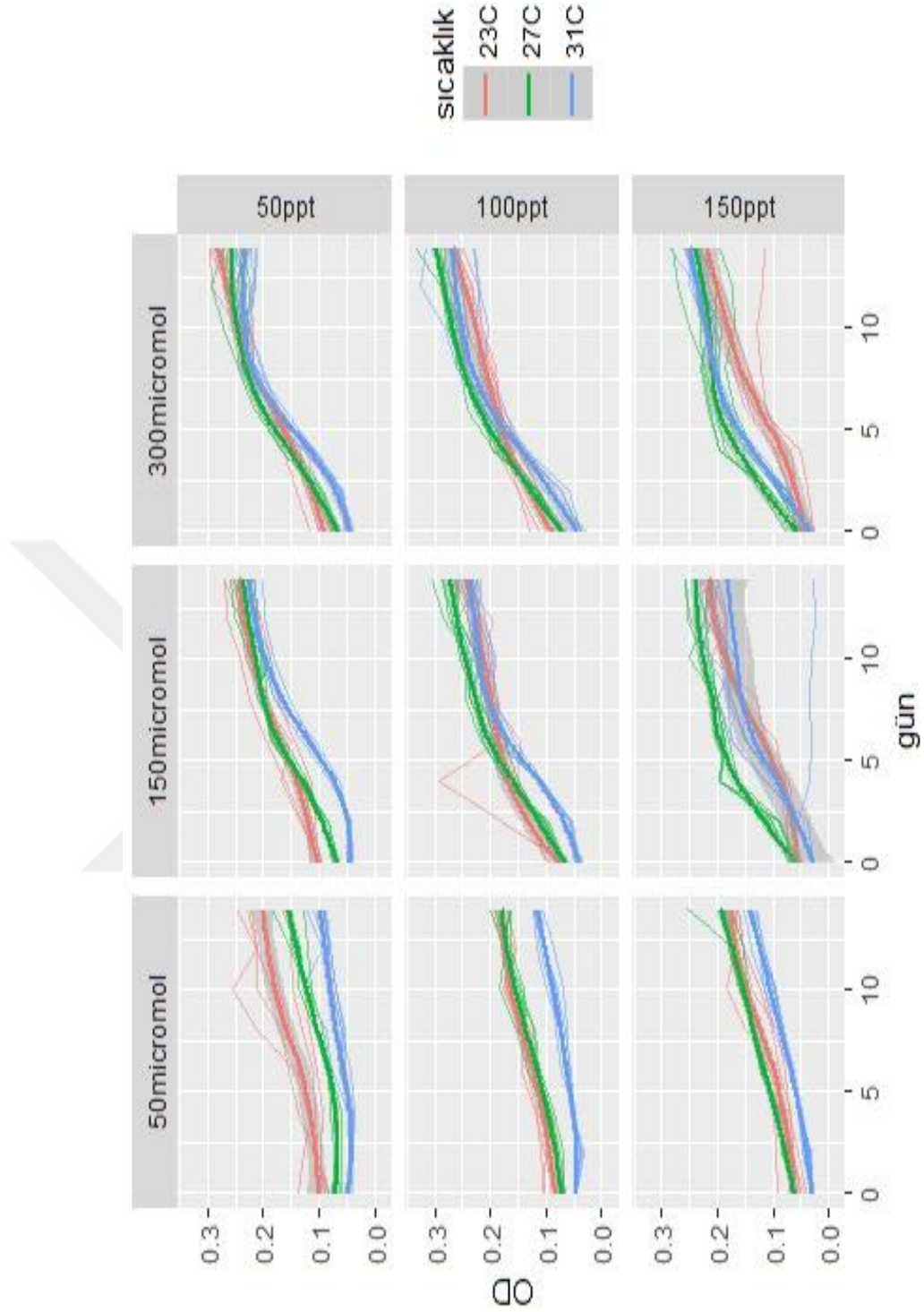
**Şekil 4.14 :** *Dunaliella* sp. AQUAMEB-2 suşunun farklı sıcaklık, ışık yoğunluğu ve tuzluluk değerlerinde büyüme grafikleri.<sup>15</sup>

<sup>15</sup> İnce çizgiler her bir tekrardaki bireysel büyüme eğrilerini gösterirken, kalın çizgiler ortalama değerlerle elde edilen büyüme eğrilerini göstermektedir. Gri tonlama güven aralıklarını göstermektedir. OD, 750 nm’de ölçülen optik yoğunluk değeridir. Micromol, kültür yüzelerine ulaşan ışık yoğunluğunu  $\mu\text{mol. foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  birimiyle göstermektedir.

$2s^{-1}$  ışık yoğunluğunda ulaşılan maksimum optik yoğunluk değeri 0,25 iken, 300  $\mu\text{mol. foton.m}^{-2}.s^{-1}$  ışık yoğunluğunda 0,24'tür.

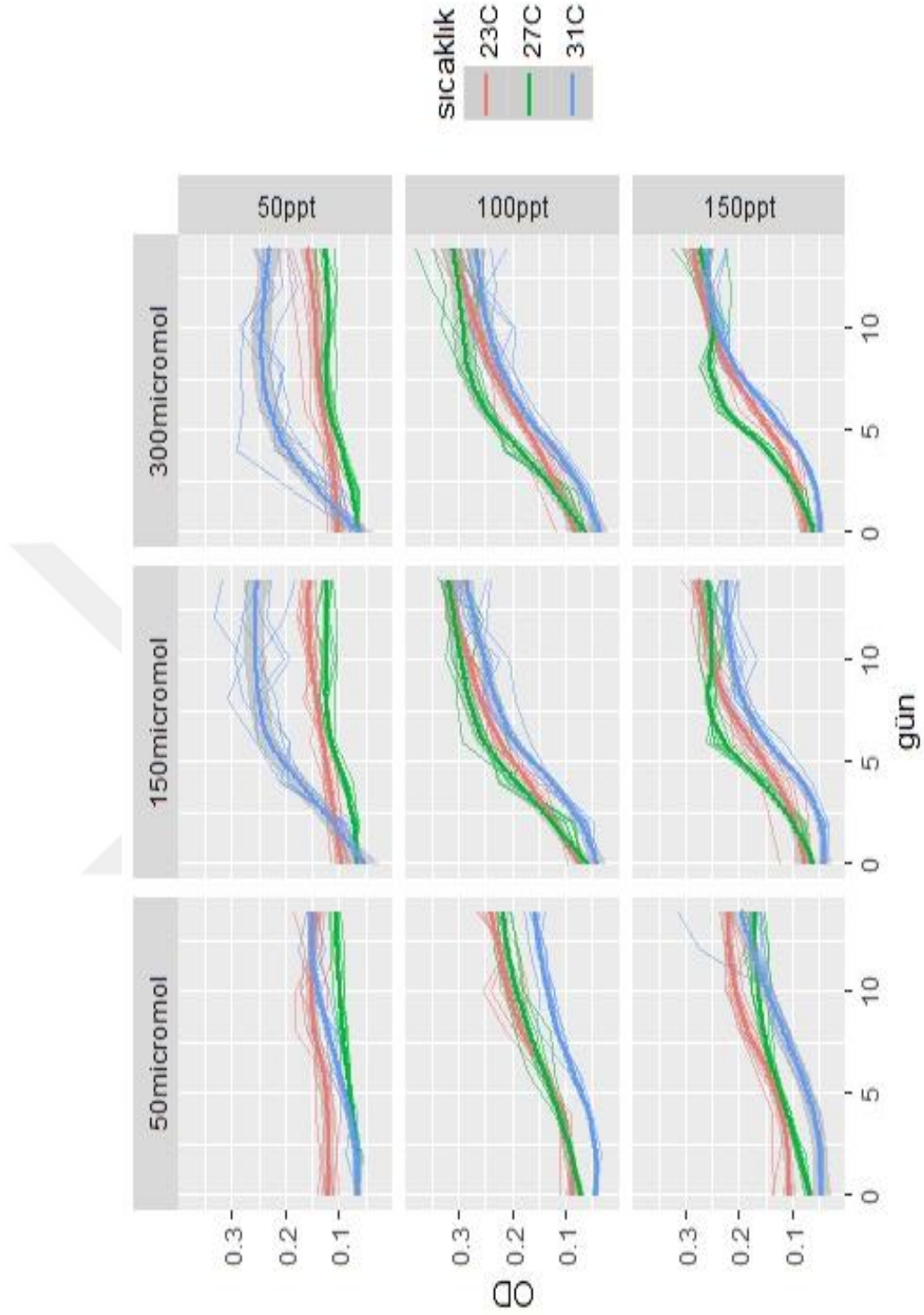
*Dunaliella* sp. AQUAMEB-4 suşu iki haftalık kültür periyodu sonunda tüm sıcaklık, ışık yoğunluğu ve tuzluluk kombinasyonlarında genel olarak durgunluk fazına girmeye başlamıştır. Sadece 50  $\mu\text{mol. foton.m}^{-2}.s^{-1}$  ışık yoğunluğu ve 150 ppt tuzluluktaki kültürlerde logaritmik artış düşük eğimle devam etmiştir. (Şekil 4.15). Elli ppt tuzluluk değerinde en iyi büyüme 150 ve 300  $\mu\text{mol. foton.m}^{-2}.s^{-1}$  ışık yoğunluğu altında görülmüştür. Bu ışık yoğunluklarında tüm sıcaklıklardaki büyüme oranı birbirine benzerdir. Elli  $\mu\text{mol.foton.m}^{-2}.s^{-1}$  ışık yoğunluğunda ise sıcaklık arttıkça kültürlerin büyümesi azalmıştır. Yüz ppt tuzlulukta en düşük büyüme 31 °C sıcaklıkta 50  $\mu\text{mol. foton.m}^{-2}.s^{-1}$  ışık yoğunluğunda gözlenmiştir. Bu tuzluluk ve ışık yoğunluğunda 23 °C ve 27 °C'deki kültürlerin büyümeleri birbirine benzer ancak diğer ışık yoğunluğundaki kültürlerden daha düşüktür. Yüz ppt tuzluluk için 150 ve 300  $\mu\text{mol.foton.m}^{-2}.s^{-1}$  ışık yoğunluklarındaki büyüme eğrileri tüm sıcaklıklar için birbirine yakındır. Yüz elli ppt tuzlulukta 50  $\mu\text{mol.foton.m}^{-2}.s^{-1}$  ışık yoğunluğundaki kültürler diğer ışık yoğunluklarındaki kültürlerle nazaran daha az büyümüştür. Yüz elli  $\mu\text{mol.foton.m}^{-2}.s^{-1}$  ışık yoğunluğu ve 150 ppt tuzluluktaki kültürlerde en iy büyüme 27 °C'de gözlenmiştir. Bu tuzlulukta 300  $\mu\text{mol.foton.m}^{-2}.s^{-1}$  ışık yoğunluğundaki kültürlerin nihai biyomas değerleri ise birbirine yakındır. Tüm kombinasyonlar değerlendirildiğinde en yüksek biyomas değerine 100 ppt tuzluluk, 300  $\mu\text{mol.foton.m}^{-2}.s^{-1}$  ışık yoğunluğu ve 27 C'de 0,3 optik yoğunluk değeri ile ulaşılmıştır. Diğer taraftan 50 ppt tuzluluk, 300  $\mu\text{mol.foton.m}^{-2}.s^{-1}$  ışık yoğunluğu ve 23 °C'de optik yoğunluk 0,28 olmuştur. Yine aynı sıcaklık ve ışık yoğunluğunda 100 ppt'de ise optik yoğunluk değeri 0,27 olarak gözlenmiştir.

*Dunaliella* sp. AQUAMEB-8 suşu iki haftalık kültür periyodu sonunda tüm sıcaklık, ışık yoğunluğu ve tuzluluk kombinasyonlarında durgunluk fazına girmiştir (Şekil 4.16). Bu suşun 50 ppt tuzluluk ve 50  $\mu\text{mol.foton.m}^{-2}.s^{-1}$  ışık yoğunluğundaki kültürleri büyümemiştir. Diğer taraftan bu tuzluluktaki kültürlerde 150 ve 300  $\mu\text{mol.foton.m}^{-2}.s^{-1}$  ışık yoğunluklarında 31 °C'deki kültürler diğer sıcaklıktaki kültürlerle nazaran çok daha iyi bir büyüme göstermiştir. Yüz ppt tuzlulukta 50  $\mu\text{mol.foton.m}^{-2}.s^{-1}$  ışık yoğunluğu altındaki kültürler, bu tuzluluktaki 150 ve 300  $\mu\text{mol.foton.m}^{-2}.s^{-1}$  ışık yoğunluğundaki kültürlerden daha az büyümüştür. Yüz ppt ve 50  $\mu\text{mol.foton.m}^{-2}.s^{-1}$  ışık yoğunluğu altındaki kültürlerde en düşük büyüme 31 °C'de



**Şekil 4.15 :** *Dunaliella* sp. AQUAMEB-4 suşunun farklı sıcaklık, ışık yoğunluğu ve tuzluluk değerlerinde büyüme grafikleri. <sup>16</sup>

<sup>16</sup> İnce çizgiler her bir tekrardaki bireysel büyüme eğrilerini gösterirken, kalın çizgiler ortalama değerlerle elde edilen büyüme eğrilerini göstermektedir. Gri tonlama güven aralıklarını göstermektedir. OD, 750 nm’de ölçülen optik yoğunluk değeridir. Micromol, kültür yüzelerine ulaşan ışık yoğunluğunu  $\mu\text{mol. foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  birimiyle göstermektedir.



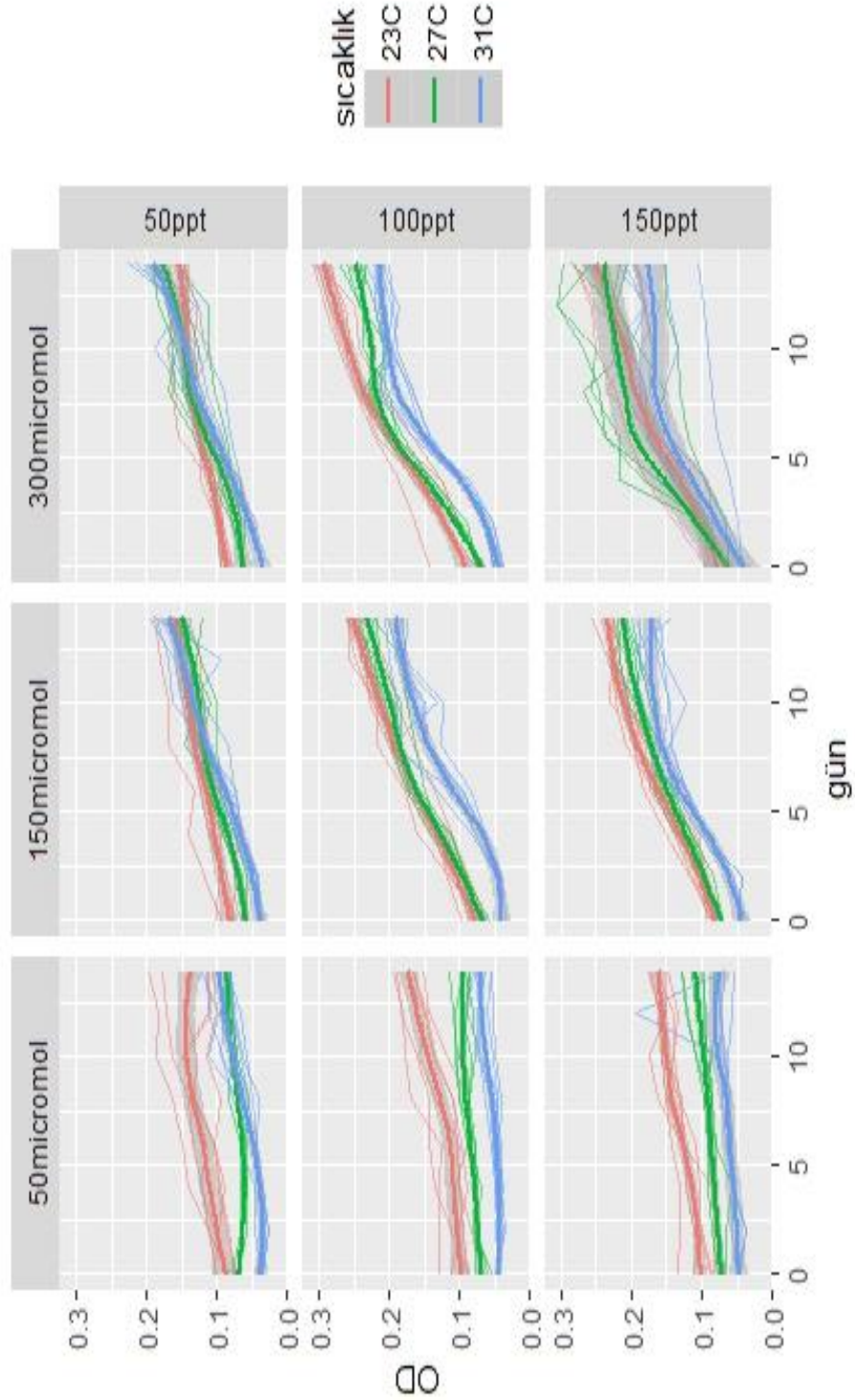
**Şekil 4.16 :** *Dunaliella* sp. AQUAMEB-8 suşunun farklı sıcaklık, ışık yoğunluğu ve tuzluluk değerlerinde büyüme grafikleri.<sup>17</sup>

<sup>17</sup> İnce çizgiler her bir tekrardaki bireysel büyüme eğrilerini gösterirken, kalın çizgiler ortalama değerlerle elde edilen büyüme eğrilerini göstermektedir. Gri tonlama güven aralıklarını göstermektedir. OD, 750 nm’de ölçülen optik yoğunluk değeridir. Micromol, kültür yüzelerine ulaşan ışık yoğunluğunu  $\mu\text{mol. foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  birimiyle göstermektedir.

gözlenirken, 23 °C ve 27 °C'deki kültürlerin büyüme eğrilerinin benzer olduğu görülmüştür. Diğer taraftan bu tuzluluğun 150 ve 300  $\mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğu altındaki kültürlerinin nihai biyomas değerlerinin birbirine yakın olduğu görülmüştür. Yüz elli ppt tuzlulukta da 50  $\mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğu altındaki kültürler diğer ışık yoğunluklarından az büyümüştür. Bu tuzlulukta, başlangıç optik yoğunlukları göz önüne alındığında, 150 ve 300  $\mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluklarında her 3 sıcaklıktaki büyüme değerleri birbirine yakındır. Tüm kombinasyonlar değerlendirildiğinde en yüksek optik yoğunluk değerleri 0,32 ile 100 ppt tuzluluk ve 27 °C'de, 150 ve 300  $\mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluklarında gözlenmiştir.

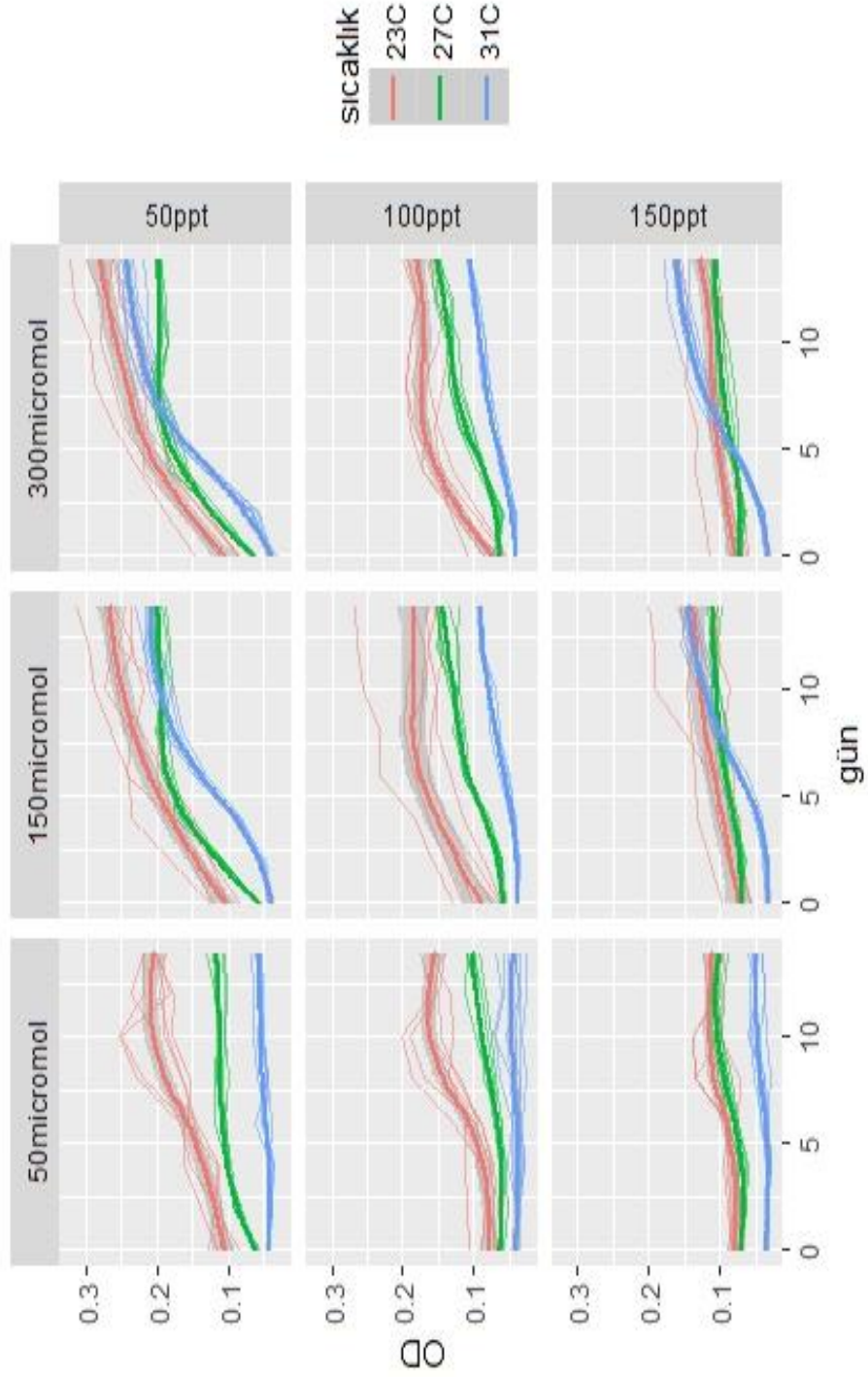
*Dunaliella* sp. AQUAMEB-21 suşu tüm sıcaklık ve tuzluluk gruplarında 50  $\mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğu altında ya çok az bir büyüme göstermiş ya da belirgin bir büyüme göstermemiştir. Bu suşun 50 ppt tuzlulukta tüm sıcaklık grupları gerek 150  $\mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  gerekse 300  $\mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğunda benzer bir büyüme göstermiştir. Yüz ppt tuzlulukta ise 150 ve 300  $\mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluklarında 23 °C ve 27 °C'deki kültürler benzer ve 31 °C'deki kültürlerden daha iyi bir büyüme göstermiştir. Benzer durum 150 ppt'deki kültürler için de gözlenmiştir. En yüksek optik yoğunluk değerine 0,29 ile 23 °C, 100 ppt tuzluluk ve 300  $\mu\text{mol. foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğunda ulaşılmıştır.

*Dunaliella* sp. AQUAMEB-49 suşu 50 ppt ve 100 ppt tuzluluk değerleri ve tüm ışık yoğunluklarında en iyi büyümeyi 23 °C sıcaklıkta göstermiştir (Şekil 4.18). Diğer taraftan bu suşun 150 ppt tuzlulukta tüm sıcaklık ve ışık yoğunluğu kombinasyonlarında çok düşük büyüme göstermiştir. Tüm kombinasyonlar değerlendirildiğinde en yüksek biyomas değerlerine 23 °C'de ve 50 ppt tuzlulukta 150  $\mu\text{mol. foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (OD 0,27) ve 300  $\mu\text{mol. foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (OD 0,28) ışık yoğunluklarında ulaşılmıştır.



**Şekil 4.17 :** *Dunaliella* sp. AQUAMEB-21 suşunun farklı sıcaklık, ışık yoğunluğu ve tuzluluk değerlerinde büyüme grafikleri. <sup>18</sup>

<sup>18</sup> İnce çizgiler her bir tekrardaki bireysel büyüme eğrilerini gösterirken, kalın çizgiler ortalama değerlerle elde edilen büyüme eğrilerini göstermektedir. Gri tonlama güven aralıklarını göstermektedir. OD, 750 nm’de ölçülen optik yoğunluk değeridir. Micromol, kültür yüzelerine ulaşan ışık yoğunluğunu  $\mu\text{mol. foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  birimiyle göstermektedir.



**Şekil 4.18 :** *Dunaliella* sp. AQUAMEB-49 suşunun farklı sıcaklık, ışık yoğunluğu ve tuzluluk değerlerinde büyüme grafikleri.<sup>19</sup>

<sup>19</sup> İnce çizgiler her bir tekrardaki bireysel büyüme eğrilerini gösterirken, kalın çizgiler ortalama değerlerle elde edilen büyüme eğrilerini göstermektedir. Gri tonlama güven aralıklarını göstermektedir. OD, 750 nm’de ölçülen optik yoğunluk değeridir. Micromol, kültür yüzelerine ulaşan ışık yoğunluğunu  $\mu\text{mol. foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  birimiyle göstermektedir.



## 5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Canlıların morfolojik özelliklerinden yararlanılarak yapılan tür tayini oldukça zor, uzmanlık isteyen ve karışıklığa neden olan bir yöntemdir (Loeblich, 1982; Borowitzka, 1988; Borowitzka, 2007). Türün genetik özelliklerinden yola çıkarak yapılan tanımlama ise daha evrensel olmakla beraber türü daha net ve doğru olarak tanımlamayı sağlar. Bu nedenle; moleküler yöntemler ile yapılan tür tayinleri, morfolojik yöntemlerle yapılan tanımlamalarda oluşan kafa karışıklığını gidererek tür tayini açısından kesin sonuçların elde edilmesini sağlar. Ancak iki yöntem de tek başına yeterli değildir ve iki yöntemin de birbirini destekler nitelikte olması gerekmektedir. Genetik olarak benzerlikleri ve evrimsel süreçteki yakınlıkları belirlenen türlerin hangi koşullarda gelişim gösterebildiklerinin bilgisi türler arası farklılıkları gösteren bir etmen olarak nitelendirilmektedir (Melkonian, 1991). *Dunaliella* spp. türlerinin tayin edilmesinde, türlerin özellikle çeşitli tuzluluk değerlerinde gösterdikleri tepkiler belirleyici özellik olarak kullanılmaktadır. Türler tuzluluk değerlerinin değişimlerine göre farklı tepkiler vermektedir. Bu durum türlerin tanımlanmasında ayırt edici bir özellik olarak kullanılmaktadır. *Dunaliella* spp. türlerinin farklı sıcaklık ve ışık değerlerine verdikleri tepkiler de tür tanımlamasında kullanılabilir (Narváez-Zapata vd., 2011)

Sitematiği ve özellikleri henüz günümüzde tam olarak netlik kazanmamış olan *Dunaliella* cinsi için yapılan çalışmalar dünya çapında yetersizdir. Özellikle ülkemizde bu alandaki çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Bu çalışma ile ülkemizden izole edilen *Dunaliella* spp. suşlarının özellikleri ve genetik olarak dünya üzerindeki diğer türler ile benzerlikleri literatüre kazandırılmıştır. Ayrıca türlerin kültür koleksiyonlarının yapılması; ülkemizdeki türlerin korunmasını, üretimlerinin yapılmasını ve bu türlerden yararlanmayı sağlayacaktır.

Biyoteknolojik ürün olarak sıkça kullanılan  $\beta$ -karoten yaygın kullanım alanlarına sahiptir. Bu pigmentin türler bazında hangi koşullarda üretiminin en iyi olduğunun belirlenmesi,  $\beta$ -karoten'in yoğun miktarda üretiminin yapılmasına olanak sağlayacaktır. Tanımlaması yapılan suşların çoğunun *Dunaliella salina* türüne ait

olduğu tespit edilmiştir. Bu tür Dünya üzerinde  $\beta$ -karoten üretimi için sıkça kullanılmaktadır. Ayrıca karotenogenik *Dunaliella* türleri; *D. salina*, *D. parva* ve karoten olmayan türler; *D. viridis*, *D. tertiolecta*'dır (Borowitzka ve diğ., 1990). AQUAMEB-2 ve -49, *Dunaliella viridis* olarak tanımlanmıştır. Genel olarak bakıldığında bu suşların betakaroten üretimleri oldukça düşük seviyede gözlenmiştir.

En yüksek karotenoid seviyeleri en yüksek tuzlulukta bulunur. Aslında tuzluluk, büyüme ve karotenogenesis arasındaki ilişki karmaşık boyuttadır. Tuzluluk değişimlerinde büyüme lag fazının uzunluğu ile başlangıç tuzluluğu arasında bir ilişki yoktur (Ginzburg ve diğ., 1990). Suşların büyüme grafiklerinde bu durum gözlenebilmektedir. Ayrıca suşlar genel olarak 10-15 gün arasında log fazına geçiş yapmaktadırlar. Tuzluluğun artışıyla ölçülebilir karotenoid sentezindeki gecikme büyük ölçüde başlangıç tuzluluğuna bağlıdır. Başlangıçtaki tuzluluk ne kadar düşükse, gecikme de o kadar uzun olur (Borowitzka ve diğ., 1990). Fakat bizim bulgularımıza göre *Dunaliella salina* olarak tanımlanan AQUAMEB-21, diğer suşlara göre düşük tuzluluklarda (en fazla 37 ppt, ikinci olarak 50 ppt) en iyi büyümeyi göstermiş ve birim biyomas başına hesaplanan en iyi betakaroten üretimini yapmıştır. Bu üretime 50 ppt tuzluluk değerinde ulaşılmıştır. Normalde yüksek tuzlulukta bu değişim ve üretimleri gösteren *Dunaliella salina* izole edildiği yerin farklılık göstermesi nedeniyle farklı suşlarında tuzluluk toleranslarına yanıtları değişiklik göstermiştir. Bu doğrultuda sonuçlar bu literatür bilgisiyle paralellik göstermemektedir. Suşun büyümesinde en iyi tuzluluk değerinin üzerine çıkılması hücrelerde stresi tetikleyerek üretimi arttırdığı düşünülebilir. Daha yüksek tuzluluk değerlerinde ise tüm hücreler yaşamlarını devam ettiremediği için hücre ölümleri nedeniyle betakaroten üretimleri azalmış olabilir.

İdeal tuzluluk değeri %6'dan büyük olan türler halofiliktir (Borowitzka ve Siva, 2007). Çalışmada kullanılan suşlar genel olarak halofiliktir. Ayrıca geniş tuzluluk aralıklarında büyüebilme yetenekleri ile halotolerantlardır. AQUAMEB-6, -8, -13, -18 geniş tuzluluk aralığında büyüebilme yeteneği en iyi olan suşlardır. AQUAMEB-13 ve -18 *Dunaliella salina* olarak tanımlanmıştır. AQUAMEB-6 ve -8 ise cins bazında tanımlanabilirken tür bazında henüz tanımlanamamıştır. AQUAMEB-13 ve -18 morfolojik özellikleri (kültür renkleri, hücre en ölçümleri) bakımından oldukça benzerlik göstermektedir.

Kültüre alınan mikroalglerin biyokimyasal içeriği, kültürün yaşına ve çevre koşullarına bağlı olarak değişim göstermektedir (Lewin, 1962; Stewart, 1974). Ayrıca mikroalglerin biyokimyasal içeriklerinde gözlenen değişimlerde ve mikroalglerin büyümelerinde; tuzluluk değişimlerinin, sıcaklığın ve ışığın da etkili olduğu bilinmektedir (Utting, 1985). Belirtilen tüm faktörlerin türler için uygun koşullarda olmaması veya koşulların ani değişimleri, bu canlılarda strese neden olmaktadır.

Türlerin stres etmenlerine karşı tepki olarak verdikleri yanıtlar türden türe değişkenlik göstermektedir. Bazı türler stres anında tepki olarak ürettikleri maddelere bağlı renk değişimleri gösterirler. Bu renkler ürettikleri pigment maddelerinin rengidir. Renk değişimlerinden yola çıkarak bazı *Dunaliella* spp. türlerinin turuncu, sarı, kırmızı gibi renklere dönüştüğünü bazı türlerinin de daima yeşil renkte kaldığını söylemek mümkündür. Bu yeşil rengin koyulaşması durumlarında ise hücrenin yaşlanması neden olarak gösterilebilir (Borowitzka ve Siva, 2007).

Tuzluluk değerinin ve ışık miktarının aynı anda orantılı olarak artırılması suşların büyümelerini olumlu yönde etkilemiştir. Düşük tuzluluk değerlerinde daha yüksek sıcaklıklarda (50 ppt tuzluluk değerinde 27 °C ve 31 °C'de) büyüme pozitif yönde gerçekleşmiştir. Yüksek tuzluluk değerlerinde (150 ppt tuzluluk değerinde 23 °C ve 27 °C 'de) ise daha iyi büyümenin gerçekleştiği saptanmıştır.

Işık yoğunluğunun, sıcaklık ve tuzluluk değerlerinin büyümeye etkisinin incelendiği faktöriyel deneylerinde sıcaklığın artmasıyla birlikte buharlaşmanın az miktarda da olsa oluştuğu gözlenmektedir. Düşük tuzluluk ve yüksek sıcaklıkta büyüme, yüksek tuzluluk ve yüksek sıcaklıktan daha iyi olduğu görülmektedir. Bu durumda buharlaşmanın etkisinin göstergesi olabilir. Buharlaşmanın ortam tuzluluğunun artmasına neden olması neticesinde suşların olumsuz etkilenmesi olasılığı ortaya çıkmaktadır (Pacheco ve diğ., 2013).

Bu tez çalışmasında İzmir Çamaltı Tuzlasında bulunan halofilik mikroalgler izole edilerek izole edilen halofilik mikroalglerin morfolojik ve moleküler tanımlamalarının yapılması ile ülkemizde bulunan türlerin belirlenmesine katkı sağlanmıştır. Mikroalglerin farklı abiyotik etmenlerde stres koşullarına verdikleri yanıtları, içeriğindeki pigment maddelerinden olan  $\beta$ -karoten yoğunluklarının belirlenmesi tür özelliklerinin anlaşılmasına ve biyoteknolojik çalışmalarda kullanım alanlarının artmasına imkan sağlayacaktır.

## KAYNAKLAR

**Assunção, P., Jaén-Molina, R., Caujapé-Castells, J., de la Jara, A., Carmona, L., Freijanes, K., Mendoza, H.** (2012). Phylogenetic position of *Dunaliella acidophila* (Chlorophyceae) based on ITS and *rbcL* sequences, *Journal of Applied Phycology*. doi.org/10.1007/s10811-011-9676-1

**Baas-Becking, L. G.** (1931). Salt Effects on Swarmers of *Dunaliella viridis* Teod., *The Journal of General Physiology*, 14(6), 765–779.

**Baldwin, B. G., Sanderson, M. J., Porter, J. M., Wojciechowski, M. F., Campbell, C. S., Donoghue, M. J.** (1995). The its Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny, *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 82(2), 247. doi.org/10.2307/2399880

**Becker, E. W.** (1994). *Microalgae: Biotechnology and Microbiology* - E. W. Becker

**Becker, E. W.** (2007). Micro-algae as a source of protein, *Biotechnology Advances*, 25(2), 207–210. doi.org/10.1016/J.Biotechadv.2006.11.002

**Berube, K., Dodge, J.** (1999). Effects of chronic salt stress on the ultrastructure of *Dunaliella bioculata* (Chlorophyta, Volvocales): mechanisms of response and recovery, *European Journal of Phycology*, Volume 34, Issue 2, pp.117-123

**Blanchard, R.** (1891). Résultats d'une excursion zoologique en Algérie, *Mem de La Soc Zool*, France.

**Booth, W. a., Beardall, J.** (1991). Effects of salinity on inorganic carbon utilization and carbonic anhydrase activity in the halotolerant alga *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *Phycologia*, 30, 220–225. doi.org/10.2216/i0031-8884-30-2-220.1

**Borowitzka, L. J.** (1981). The microflora, Adaptations to life in extremely saline lakes. In *Salt Lakes* (pp. 33–46). Dordrecht: Springer Netherlands. doi.org/10.1007/978-94-009-8665-7\_4

**Borowitzka, M. A., Borowitzka, L. J., Kessly, D.** (1990). Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina*. *Journal of Applied Phycology*, 2(2), 111–119. doi.org/10.1007/BF00023372

**Borowitzka, M. A., Siva, C. J.** (2007). The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *Journal of Applied Phycology*. doi.org/10.1007/s10811-007-9171

**Brock, T. D.** (1975). Salinity and the Ecology of *Dunaliella* from Great Salt Lake. *Journal of General Microbiology*, 89(2), 285–292. doi.org/10.1099/00221287-89-2-285

**Butcher, R.** (1959). An introductory account of the smaller algae of British coastal waters Part I. Introduction and Chlorophyceae. London: Ministry for Agriculture, Fisheries and Food, Fishery Investigations, Series IV. Her Majesty's Stationery Office.

- Çelekli, A., Dönmez, G.** (2006). Effect of pH, light intensity, salt and nitrogen concentrations on growth and  $\beta$ -carotene accumulation by a new isolate of *Dunaliella* sp., *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, doi.org/10.1007/s11274-005-9017-0
- Chu, W.-L.** (2012). *Biotechnological Applications of Microalgae*, 6(126), 24–37. doi.org/10.1201/b14920
- Cifuentes, A. S., González, M. A., Inostroza, I., Aguilera, A.** (2001). Reappraisal of physiological attributes of nine strains of *Dunaliella* (chlorophyceae): Growth and pigment content across a salinity gradient, *Journal of Phycology*. doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.037002334
- Cifuentes, A. S., Gonzalez, M. A., Parra, O. O.** (1996). The effect of salinity on the growth and carotenogenesis in two Chilean strains of *Dunaliella salina* Teodoresco, *Biological Research*, 29(2), 227–236.
- Dunal, F.** (1838). Extrait d'un mémoire sur les algues qui colorent en rouge certains eaux des marais salants méditerranéens, *Ann Sc Nat Bot 2 Sér*, 9-172.
- Edgar, R. C.** (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797. doi.org/10.1093/nar/gkh340
- Fazeli, M. R., Tofighi, H., Samadi, N., Jamalifar, H.** (2005). Effects of salinity on  $\beta$ -carotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCBC26 isolated from the Urmia salt lake, north of Iran., *Bioresource Technology*, 97(18), 2453–2456. doi.org/10.1016/j.biortech.2005.10.037
- Fisher, M., Pick, U., Zamir, A.** (1994). A Salt-Induced 60-Kilodalton Plasma Membrane Protein Plays a Potential Role in the Extreme Halotolerance of the Alga *Dunaliella*, *Plant Physiology*, 106(4), 1359–1365. doi.org/10.1104/pp.106.4.1359
- Gershwin, M. (Ed. ), Belay, A. (Ed. ), Haley, J., Chamorro-Cevallos, G., Barron, B., Mani, U Koda, J.** (2007). *Spirulina in Human Nutrition and Health*. (M. E. Gershwin & A. Belay, Eds.). Boca Raton. Retrieved from www.taylorfrancis.com/books/e/9781420052572
- Gibor, A.**, 1956. The culture of brine algae. *Bio. Bull.*, 111: 223-229.
- Ginzburg, M., Ginzburg, B.-Z.** (1993). Effect of Light Intensity on Adaptation of *Dunaliella* to Very High Salt Concentrations, *Journal of Experimental Botany*, 44(267), 1561–1567.
- Ginzburg, M., Weizinger, G., Cohen, M., Ginzburg, B. Z.** (1990). The adaptation of *Dunaliella* to widely-differing salt concentrations, *Journal of Experimental Botany*, doi.org/10.1093/jxb/41.6.685
- Goff, L.J., Moon, DA., Coleman, AW.** 1994. Molecular delineation of species and species relationships of red algal agarophytes *Gracilariopsis* and *Gracilaria* (Gracilariales). *J. Phycol* 30, 521-537
- Goldman, J.C.**, 1977. Temperature effects on phytoplankton growth in continuous culture. *Limnol. Oceanog.*, 22: 932-936.
- González, M. A., Coleman, A. W., Gómez, P. I., Montoya, R.** (2001). Phylogenetic relationship among various strains of *Dunaliella* (Chlorophyceae) based on nuclear its

rDNA sequences, *Journal of Phycology*, doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.037004604.x

**González, M. A., Gómez, P. I., Montoya, R.** (1998). Comparison of PCR-RFLP analysis of the ITS region with morphological criteria of various strains of *Dunaliella*, *Journal of Applied Phycology*, 10(6), 573–580. doi.org/10.1023/A:1008035422784

**Guedes, A. C., Amaro, H. M., Malcata, F. X.** (2011). Microalgae as sources of carotenoids, *Marine Drugs*, doi.org/10.3390/md9040625

**Guillard, R., Hargraves, P.** (1993). *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte, *Research Note, Substance Use & Misuse*, 32(3), 234–236. doi.org/10.3109/10826087609056170

**Hamburger, C.** (1905). Zur Kenntnis der *Dunaliella salina* und einer Amöbe aus Salinenwasser von Cagliari. *Arch Protistenk*, 6:111–130.

**Hamby, R. K., Zimmer, E. A.** (1992). Ribosomal RNA as a Phylogenetic Tool in Plant Systematics, In *Molecular Systematics of Plants* (pp. 50–91), Boston, MA: Springer US, doi.org/10.1007/978-1-4615-3276-7\_4

**Hosseini Tafreshi, A., Shariati, M.** (2009). *Dunaliella* biotechnology: Methods and applications, *Journal of Applied Microbiology*, doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04153.x

**Hötzel, G., Croome, R.** (1999). A phytoplankton methods manual for Australian freshwaters, 66.

**Ihaka, R., Gentleman, R.** (1996). R: A Language for Data Analysis and Graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 5(3), 299–314. doi.org/10.1080/10618600.1996.10474713

**Jahnke, L. S., White, A. L.** (2003). Long-term hyposaline and hypersaline stresses produce distinct antioxidant responses in the marine alga *Dunaliella tertiolecta*, *Journal of Plant Physiology*, doi.org/10.1078/0176-1617-01068

**Javor, B. J.** (1989). *Hypersaline Environments: Microbiology and Biogeochemistry* - Barbara J. Javor - Google Kitaplar. Berlin, Springer Verlag.

**Jayappriyan, K. R., Rajkumar, R., Venkatakrishnan, V., Nagaraj, S., Rengasamy, R.** (2013). In vitro anticancer activity of natural  $\beta$ -carotene from *Dunaliella salina* EU5891199 in PC-3 cells, *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 3(2), 99–105. doi.org/10.1016/J.Bionut.2012.08.003

**Kommareddy, A., Anderson, D. G.** (2003). Study of Light as a parameter in the growth of algae in a Photo-Bio Reactor (PBR). In 2003, Las Vegas, NV July 27-30, 2003 (p. 1). St. Joseph, MI: American Society of Agricultural and Biological Engineers, doi.org/10.13031/2013.13868

**Labbé, A.** (1921). Sur les modifications adaptives de *Dunaliella salina* Dunal. *CR Acad Sci*, *CR Acad Sci* 172 (1921): 1074-1076

**Lee, R. E.** (2008). *Phycology*. In R. E. Lee (Ed.) (pp. 561, 16–32). Colorado State University, USA.

**Lerche, W.** (1937). Entwicklung und Fortpflanzung in der Gattung *Dunaliella*. *Arch. Protistenkd.*, 88, 236–268.

**Lewin, R. A.** (1962). *Physiology and Biochemistry of the Algae*, Academic Press, New York.

**Lichtenthaler, H. K.** (1987). [34] Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes, *Methods in Enzymology*, 148(C), 350–382, doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1

**Markovits, A., Gianelli, M. P., Conejeros, R., Erazo, S.** (1993). Strain selection by *Dunaliella* for p-carotene production, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9(5), 534–537.

**Massyuk, N.** (1973). Morphology, taxonomy, ecology and geographic distribution of the genus *Dunaliella* Teod. and prospects for its potential utilization. *Naukova Dumka*, Kiev.

**Melkonian, M., Kröger, K.-H., Marquardt, K.-G.** (1980). Cell shape and microtubules in zoospores of the green alga *Chlorosarcinopsis gelatinosa* (Chlorosarcinales): Effects of low temperature, *Protoplasma*, 104(3–4), 283–293. doi.org/10.1007/BF01279773

**Melkonian, M.** (1991). Systematics and Evolution of the Algae. *Çinde Progress in Botany* (ss. 271–307). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi.org/10.1007/978-3-642-76293-2\_16

**Merz, C. R., Main, K. L.** (2014). Microalgae (diatom) production ; The aquaculture and biofuel nexus. In *2014 Oceans - St. John's* (pp. 1–10). IEEE, doi.org/10.1109/OCEANS.2014.7003242

**Narváez-Zapata, A. A., Rojas-Herrera, R., López-Uc, Y., Sánchez-Estudillo, L.** (2011). Different physiological responses influenced by salinity in genetically related *Dunaliella salina* isolates, *Biotechnology Letters*, doi.org/10.1007/s10529-011-0523

**Nguyen, M. L., Schwartz, S. J.** (1998). Lycopene Stability During Food Processing, *Experimental Biology and Medicine*, 218(2), 101–105. doi.org/10.3181/00379727-218-44274

**Nicolai, F., Becking, L. B.** (1935). Einige Notizen über Salzflagellaten. *Arch f Protistenkd*, 85:319-328.

**Olmos, J., Paniagua, J., Contreras, R.** (2000). Molecular identification of *Dunaliella* sp. utilizing the 18S rDNA gene. *Letters in Applied Microbiology*, 30(1), 80–84. doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00672.x

**Oren, A.** (2005). A hundred years of *Dunaliella* research 1905–2005. *Saline Systems*, BioMed Central.

**Oren, A., Larimer, F., Richardson, P., Lapidus, A., Csonka, L. N.** (2005). How to be moderately halophilic with broad salt tolerance: Clues from the genome of *Chromohalobacter salexigens*. *Extremophiles*, 9(4), 275–279. doi.org/10.1007/s00792-005-0442-7

**Pacheco A, Hernández-Mireles I, García-Martínez C, Alvarez MM.** 2013. Microplates as a microreactor platform for microalgae research. *Biotechnol Prog.* 29(3):638-44

**Pisal, D. S., Lele, S. S.** (2005). Carotenoid production from microalga, *Dunaliella salina*. *Indian Journal of Biotechnology*, 4(4), 476–483.

- Preisig, H. R.** (1992). *Dunaliella: Physiology, Biochemistry, and Biotechnology* - Ami Ben-Amotz, Mordhay Avron. (A. M. Ben-Amotz Ami, Ed.).
- Round, F. E.** (1973). *The Ecology of Algae* - F. E. Round.
- Sadka, A., Lers, A., Zamir, A., Avron, M.** (1989). A critical examination of the role of de novo protein synthesis in the osmotic adaptation of the halotolerant alga *Dunaliella*. *FEBS Letters*, 244(1), 93–98. doi.org/10.1016/0014-5793(89)81170-6
- Santin-Montanya, I., Sandin-Espana, P., Garcia Baudin, J. M., Coll-Morales, J.** (2007). Optimal growth of *Dunaliella primolecta* in axenic conditions to assay herbicides. *Chemosphere*, 66(7), 1315–1322, doi.org/10.1016/2006.07019
- Schlipalius, L.** (1991). The extensive commercial cultivation of *Dunaliella salina*. *Bioresource Technology*, 38(2–3), 241–243. doi.org/10.1016/0960-8524(91)90162-D
- Stewart, W. D. P.** (1974). *Algal Physiology. and Biochemistry*, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S.** (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0, *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729. doi.org/10.1093/molbev/mst197
- Teodoresco, E.** (1905). Organisation et développement du *Dunaliella*, nouveau genre de Volvocacée-Polyblepharidée. *Beih z Bot Centralbl*, 18:215-232.
- Tomaselli, L.** (2004). *Handbook of Microalgal Culture, The Microalgal Cell.* (A. Richmond, Ed.). John Wiley & Sons.
- Tompkins, J., DeVille, M. (Mitzi), Day, J., Turner, M.** (1995). *Culture Collection of Algae & Protozoa: Catalogue of Strains.* Amblesibe, UK, 204pp.
- Utting, S.D.,** (1985). Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. *Aquacult. Engin.* 4: 175-190.
- Van Auken, O. W., McNulty, I. B.** (1973). The Effect of Environmental Factors on The Growth of a Halophylic Species of Algae. *The Biological Bulletin*, 145(1), 210–222. doi.org/10.2307/1540360
- Vander Stappen, J., Van Campenhout, S., Gama Lopez, S., Volckaert, G.** (1998). Sequencing of the internal transcribed spacer region ITS1 as a molecular tool detecting variation in the *Stylosanthes guianensis* species complex. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 96(6–7), 869–877. doi.org/10.1007/s001220050814
- Wichuk, K., Brynjólfsson, S., Fu, W.** (2014). Biotechnological production of value-added carotenoids from microalgae. *Bioengineered*, 5(3), 204–208. doi.org/10.4161/bioe.28720
- Wickham, H.** (2009). Use R! Ggplot2. doi.org/10.1007/978-0-387-98141-3
- Zamani, H., Moradshahi, A., Karbalaee, H. R., & Heidari.** (2010). Characterization of a new *Dunaliella salina* strain MSI-1 based on nuclear rDNA ITS sequences and its physiological response to changes in composition of growth media, *Hydrobiologia*, doi.org/10.1007/s10750-010-0450-1



## **EKLER**

**Ek-A :** Filogenetik ağaçların oluşturulmasında kullanılan ITS gen bölgelerini içeren dizi analizi sonuçları.

### **AQUAMEB-2:**

GAAGGGTTCCTGTTTGAGGGCCAAGCCCATGGTCCCAAGCCAACA  
ACTAGAAATAGCGAGCGATTGCTGCCTACCCAGTTGCGGCCCTTGACGGG  
TCCTTGAGCTAGCCTCTGCTCTTCAGCTGATCCAGAGCCTTTGTTGGGGCA  
GTGAAGCACCCAAGCTCTGGAACAGCCAGGTCCACTAACATTACTCCTCA  
CATGGGGGAGTGGTTAGTGAGATTAACCCGACGCTGAGGCAAACATGCC  
CTTGGCCGAAGCCGCGGACGCAATTTGCGTTCAAAGATTTGATGATTCAC  
GGAATTCTGCAATTCACACTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGT  
TGCGAGAGCCAAGATATCCGTTGTTGAGAGTTGTCTCAGTTAGGATGTGA  
CGGCTAGGCCGATCACATATCTTTGGCTTTAGGTTTTGTTTGGTGTGTTG  
GTTAGTAATAGGACCAACCCGACTACCCAAATTGGATTTGGGCAGCCGA  
GCCCAACCCAGACAGCAAATTAATGCTGCCAGGAAGCACCAAACCTCC  
GAAGAGAATTGGTGGGCCAGACAAAAGAGGTTACGGTGTGGTTATTGA  
TAGATGCAAT

### **AQUAMEB-4:**

TTCCTGTTTGAGGGCCGAGCCCATGGTCCCAAGCCAACAACCTAGA  
AATAGCATGCGTGAGCTGCCTACCCAGTTGCGGCCCTTCACGGGTCCTTG  
AGCTAGCCTCTGTTCTTCAGCTGATCCAGCGCCCTTGACGAGCGCATTCA  
AGCACCTTGAGCTCTGGAACAGCCAGGTCCACTTGCCGATTGCTCTCCA  
CACAACACTGCGGGAGAGAGGAAGTGAGATTAACCCGACGCTGAGGCAA  
ACATGCCCTCAGCCGAAGCATTGGGCGCAATTTGCGTTCAAAGATTTGAT  
GATTCACGGAATTCTGCAATTCACACTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCT  
TCATCGTTGCGAGAGCCAAGATATCCGTTGTTGAGAGTTGTCTCAGTTGA  
GATGTCACGGCTAGGCCGAGCACATATCCTTGGCTTTAGGTTTGATTTGG  
TGTTGTTGGTTAGTAAAGACCAGCCCAACTGCCCAAGTGAATGGACAGCC  
GGACCCAACCAAGCAGCAACTTAATGCCACCCGGGAAGCACCAAACCTC  
CGGAGAGAATGATGGGCCAGACAAAAA

### **AQUAMEB-5:**

CTTGCTTGAGCTCAGGTTCGAGAAAAAAATTGAGGGTTCCTGTTTGA  
GGGCCGAGCCCATGGTCCCAAGCCAACAACCTAGAAATAGCAAGCGTGAG  
CTGCCTACCCAGTTGCGGCCCTTCACGGGTCCTTGAGCTAGCCTCTGTTCT  
TCAGCTGATCCAGCGCCCTTGACGAGCGCATTGAAGCACCCGAGCTCTGG  
AACAGCCAGGTCCACTTGCCAATTGCACTCCACACACTGTGGGAGAGAG  
GAAGTGAGATTAACCCGACGCTGAGGCAAACATGCCCTCAGCCGAAGCC

TTGGGCGCAATTTGCGTTCAAAGATTTGATGATTCACGGAATTCTGCAAT  
TCACACTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGTTGCGAGAGCCAA  
GATATCCGTTGTTGAGAGTTGTCTCAGTTAGGATATGACGGCCAGGCCGA  
GCACATATCTTTGGCTTTAGGTTTGATTTGGTGTGTTGGTTAGTAAAGAC  
CAGCCCAACTGCCAAGTAAATGGACAGCCGGACCCAACCCAAGCAGCA  
ACTTAATGCCACCCGGGAAGCATCAAGCTCCGGAGAGAATGATGGGCCA  
GACAGAAAGG

**AQUAMEB-6:**

GGGTGGTCTTGCTTGAGCTCAGGTCGAGAAAAAAGATGGGTTC  
TGTTTGAGGGCCGAGCCCATGGTCCCAAGCCAACAACACTAGAAATAGCAA  
GCGTAAGCTGCCTACCCAGTTGCGGCCCTTGACGGGTCTTGAGCTAGCC  
TCTGCTCTTCAGCTGATCCAGAGCCTTCATGAGAGCAATGAAGCACTCG  
AGCTCTGGAACAGCCAGGTCCACTACCCTTTGCTCCGCTGTGGGAGAGGG  
GGAGTGAGATTAACCCGACGCTGAGGCAAACATGCCCTCAGCCGAAGCC  
TTGGGCGCAATTTGCGTTCAAAGATTTGATGATTCACGGAATTCTGCAAT  
TCACACTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGTTGCGAGAGCCAA  
GATATCCGTTGTTGAGAGTTGTCTCAGTTAGGATGTGACGGCTAGGCCGA  
GCACATATCTTTGGCTTTAGGTTTGATTTGGTGTGTTGGTTAGTAAAGAC  
CAGCCTGACTACCCAAATTAATGGGCAGCCAAGCCCAACCCAAGCAGCA  
AGTTAATGCTACCCGGGAAGCACCAAACTCCGGAGAGAATGATGGGCCG  
GACAAAAGAGTGCACGGTGTGGTTATTGATAGATTCAAT

**AQUAMEB-8:**

AGCGGGTGGTCTTGCTTGAGCTCAGGTCGAGAAAAAAGATGGGT  
TCCTGTTTGAGGGCCAAGCCCATGGTCCCAAGCCAACAACACTAGAAATAG  
CAAGCGTAAGCTGCCTACCCAGTTGCGGCCCTTGACGGGTCTTGAGCTA  
GCCTCTGCTCTTCAGCTGATCCAGAGCCTTTGATGAGAGCAATGAAGCAC  
TCGAGCTCTGGAACAGCCAGGTCCACTACCCTTTGCTCCGCTGTGGGAGA  
GGGGGAGTGAGATTAACCCGACGCTGAGGCAAACATGCCCTCAGCCGAA  
GCGTTGGGCGCAATTTGCGTTCAAAGATTTGATGATTCACGGAATTCTGC  
AATTCACACTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGTTGCGAGAGCC  
AAGATATCCGTTGTTGAGAGTTGTCTCAATTAGGATGTGACGGCTAGGCC  
GAGCACATATCTTTGGCTTTAGGTTTGATTTGGTGTGTTGGTTAGTAAAG  
ACCAGCCTGACTACCCAAATTAATGGGCAGCCAAGCCCAACCCGAGCAG  
CAAGTTAATGCTACCCGGGAAGCACCAAACTCCGGAGAGAATGATGGGC  
CGGACAAAAGAGTGCACGGTGTGGTTATTGATAGAT

**AQUAMEB-9:**

GAGGGCCGAGCCCATGGTCCCAAGCCAACAACACTAGAAATAGCAA  
GCGTAAGCTGCCTACCCAGTTGCGGCCCTTGACGGGTCTTGAGCTAGCC  
TCTGCTCTTCAGCTGATCCAGAGCCTTCATGAGAGCAATGAAGCACTCG  
AGCTCTGGAACAGCCAGGTCCACTACCCTTTGCTCCGCTGTGGGAGAGGG  
GGAGTGAGATTAACCCGACGCTGAGGCAAACATGCCCTCAGCCGAAGCC  
TTGGGCGCAATTTGCGTTCAAAGATTTGATGATTCACGGAATTCTGCAAT  
TCACACTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGTTGCGAGAGCCAA  
GATATCCGTTGTTGAGAGTTGTCTCAGTTAGGATGTGACGGCTAGGCCGA

GCACATATCTTTGGCTTTAGGTTTGATTTGGTGTGTTGGTTAGTAAAGAC  
CAGCCTGACTACCCAAATTAATGGGCAGCCAAGCCCAACCCAAGCAGCA  
AGTTAATGCTACCCGGGAAGCACCAAACCTCCGGAGAGAATGATGGGCCG  
GACAAAAG

**AQUAMEB-10:**

GGGTGGTCTTGCTTGAGCTCAGGTCGAGAAAAAAGGAAAGTTCC  
TGTTTGAGGGCCAAGCCCATGGTCCCAAGCCAACAAGTAGAAATAGCAA  
GCGTGTGCTGCCTACCCAGTTGCGGCCCTTGACGGGTCCTTGAGCTAGCC  
TCTGTTCTTCAGCTGATCCAGAGCCCTACATGAGAGCAACAAAGCACCCA  
AGCTCTGGAACAGCCAGGTCCACTTGTCCACTGCTCCACTATGGGAGGGG  
GAAAGTGAGATTAACCCGACGCTGAGGCAAACATGCCCTCAGCCGAAGC  
ATTGGGTGCAATTTGCGTTCAAAGATTTGATGATTCACGGAATTCTGCAA  
TTCACACTACGTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGTTGCGAGAGCCAA  
GATATCCGTTGTTGAGAGTTGTCTCAGTTAGGATGTGACGGCTAGGCCGA  
GCACATATCTTTGGCTTTAGGTTTGTTTGGTGTGTTGGTTAGTAAAGAC  
CAGCCCGACTACCCAAATTCATGGGCAGCCGAACCCAAACCCAAGCAGCA  
ACCTAATGCTACCCGGGAAGCACCAAACCTCCGGAGAGAATGGTGGGCCA  
GACAAAAGGTGCACGGTGTGGTTATTGATAGATTCAATGATCCTTCCGC  
AGGTT

**AQUAMEB-12:**

TTGAGGGTTCCTGTTTGAGGGCCGAGCCCATGGTCCCAAGCCAAC  
AACTAGAAATAGCAAGCGTGAGCTGCCTACCCAGTTGCGGCCCTTCACG  
GGTCCCTTGAGCTAGCCTCTGTTCTTCAGCTGATCCAGCGCCCTTGACGAG  
CGCATTGAAGCACCCGAGCTCTGGAACAGCCAGGTCCACTTGCCTATTGC  
ACTCCACACACTGTGGGAGAGAGGAAGTGAGATTAACCCGACGCTGAGG  
CAAACATGCCCTCAGCCGAAGCCTTGGGCGCAATTTGCGTTCAAAGATTT  
GATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACACTACGTATCGCATTTGCTGCG  
TTCTTCATCGTTGCGAGAGCCAAGATATCCGTTGTTGAGAGTTGTCTCAG  
TTAGGATATGACGGCCAGGCCGAGCACATATCTTTGGCTTTAGGTTTGAT  
TTGGTGTGTTGGTTAGTAAAGACCAGCCCAACTGCCCAAGTAAATGGAC  
AGCCGGACCCAACCCAAGCAGCAACTTAATGCCACCCGGGAAGCATCAA  
GCTCCGGAGAGAATGATGGGCCAGACAGAAAGGTGCACGGTGTGGTTAT

**AQUAMEB-13:**

TGAGGGTTCCTGTTTGAGGGCCGAGCCCATGGTCCCAAGCCAACA  
ACTAGAAATAGCAAGCGTGAGCTGCCTACCCAGTTGCGGCCCTTCACGG  
GTCCTTGAGCTAGCCTCTGTTCTTCAGCTGATCCAGCGCCCTTGACGAGC  
GCATTGAAGCACCCGAGCTCTGGAACAGCCAGGTCCACTTGCCTATTGCA  
CTCCACACACTGTGGGAGAGAGGAAGTGAGATTAACCCGACGCTGAGGC  
AAACATGCCCTCAGCCGAAGCCTTGGGCGCAATTTGCGTTCAAAGATTTG  
ATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACACTACGTATCGCATTTGCTGCGTT  
CTTCATCGTTGCGAGAGCCAAGATATCCGTTGTTGAGAGTTGTCTCAGTT  
AGGATATGACGGCCAGGCCGAGCACATATCTTTGGCTTTAGGTTTGATTT  
GGTGTGTTGGTTAGTAAAGACCAGCCCAACTGCCCAAGTAAATGGACA

GCCGGACCCAACCCAAGCAGCAACTTAATGCCACCCGGGAAGCATCAAG  
CTCCGGAGAGAATGATGGGCCAGACAGAAAGGTGC

**AQUAMEB-14:**

TGTTTGAGGGCCGAGCCCATGGTCCCAAGCCAACAACACTAGAAATA  
GCAAGCGTGAGCTGCCTACCCAGTTGCGGCCCTTCAGGGGTCCTTGAGCT  
AGCCTCTGTTCTTCAGCTGATCCAACGCCCTTGACGAGCGCATTGAAGCA  
CCCGAGCTCTGGAACAGCCAGGTCCACTTGCCAGTTGCACTCCACACACT  
GTGGGAGAGAGGAAGTGAGATTAACCCGACGCTGAGGCAAACATGCCCT  
CAGCCGAAGCCTTGGGCGCAATTTGCGTTCAAAGATTTGATGATTCACGG  
AATTCTGCAATTCACACTACGTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGTTG  
CGAGAGCCAAGATATCCGTTGTTGAGAGTTGTCTCAGTTAGGATGTGACG  
GCCAGGCCGAGCACATATCTTTGGCTTTAGGTTTGATTTGGTGTGTTGGT  
TAGTAAAGACCAGCCCAAGTGCCCAAGTAAATGGACAGCCGGACCCAAC  
CCAAGCAGCAACTTAATGCCACCCGGGAAGCATCAAGCTCCGGAGAGAA  
TGATGGGCCAGACAGAAAGGTGCACGGTGTGGTTAT

**AQUAMEB-15:**

AGGTCGAGAAAAAATTGGTTCCTGTTTGAGGGCCGAGCCCATGG  
TCCCAAGCCAACAACACTAGAAATAGCAAGCGTGAGCTGCCTACCCAGTTG  
CGGCCCTTCAGGGGTCCTTGAGCTAGCCTCTGTTCTTCAGCTGATCCAAC  
GCCCTTGACGAGCGCATTGAAGCACCCGAGCTCTGGAACAGCCAGGTCC  
ACTTGCCAGTTGCACTCCACACACTGTGGGAGAGAGGAAGTGAGATTAA  
CCCGACGCTGAGGCAAACATGCCCTCAGCCGAAGCCTTGGGCGCAATTT  
GCGTTCAAAGATTTGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACACTACGTAT  
CGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGTTGCGAGAGCCAAGATATCCGTTGTTG  
AGAGTTGTCTCAGTTAGGATGTGACGGCCAGGCCGAGCACATATCTTTGG  
CTTTAGGTTTGATTTGGTGTGTTGGTTAGTAAAGACCAGCCCAAGTGCC  
CAAGTAAATGGACAGCCGGACCCAACCCAAGCAGCAACTTAATGCCACC  
CGGGAAGCATCAAGCTCCGGAGAGAATGATGGGCCAGACAGAAAGGTG  
CACGGTGTGGTTAT

**AQUAMEB-16:**

GAGAAAAAAGATGGGTTCCTGTTTGAGGGCCAAGCCCATGGTCC  
CAAGCCAACAACACTAGAAATAGCAAGCGTAAGCTGCCTACCCAGTTGCGG  
CCCTTGACGGGTCCTTGAGCTAGCCTCTGCTCTTCAGCTGATCCAGAGCC  
TTTGATGAGAGCAATGAAGCACTCGAGCTCTGGAACAGCCAGGTCCACT  
ACCCTTTGCTCCGCTGTGGGAGAGGGGGAGTGAGATTAACCCGACGCTG  
AGGCAAACATGCCCTCAGCCGAAGCGTTGGGCGCAATTTGCGTTCAAAG  
ATTTGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACACTACGTATCGCATTTTCGCT  
GCGTTCTTCATCGTTGCGAGAGCCAAGATATCCGTTGTTGAGAGTTGTCT  
CAATTAGGATGTGACGGCTAGGCCGAGCACATATCTTTGGCTTTAGGTTT  
GATTTGGTGTGTTGGTTAGTAAAGACCAGCCTGACTACCCAATTAATG  
GGCAGCCAAGCCCAACCCGAGCAGCAAGTTAATGCTACCCGGGAAGCAC  
CAAACCTCCGGAGAGAATGATGGGCCGACAAAAGAGTGCACGGTGTGGT  
TATTG

**AQUAMEB-18:**

GGAGAGTTCCTGTTTGAGGGCCGAGCCCATGGTCCCAAGCCAACA  
ACTAGAAATAGCGAGCGATAAGCTGCCTACCCAGTTGCGGCCCTTGACG  
GGTCCTTGAGCTAGCCTCTGCTCTTCAGCTGATCCAAAGCCCTTCACGAG  
CGCCATGAAGCACTCAAGCTTTGGAACAGCCAGGTCCACTTGCCCAACAC  
TCCGCTTTGGGAAGGGGAAAGTGAGATTAACCCGACGCTGAGGCAAACA  
TGCCCTCAGCCGAAGCCTTGGGCGCAATTTGCGTTCAAAGATTTGATGAT  
TCACGGAATTCTGCAATTCACACTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCA  
TCGTTGCGAGAGCCAAGATATCCGTTGTTGAGAGTTGTCTCAGTTAGGAT  
GTGACGGCTAGGCCGAACACATATCTTTGGCTTTGAGTTTTATTTGGTGT  
GTTGGTTAGTAAGGACCAGCCGACTACCCAAGTTGATGGATAGCCGGA  
CCCAACCAAGCAGCAACTTAATGCTACCCGGGAAGCACCAAACTCAAG  
AGAGAATGATGGGCCAGACAGACAAGTGCA

**AQUAMEB-49:**

TGTTTGAGGGCCAAGCCCATGACACCAAGCCAACAACACTAGAAATA  
GCGAGCGAGAGCTGCCTACCCAGTTGCGGCCCTTAGCGGGTCGTGAGCT  
AGCCTCTGTGCTTCAGCTGATCCAGACCTCTGAGTGGACACAAGTGAATG  
CATCCAAGTTCTGGAACAGCCAGATCCACTAGCCCTTGCTCCACTGAGGG  
AGAGGGGTTGTGAGATTAACCCGACGCTGAGGCAAACATGCCCTAAGCC  
GAAGCCTTGGGCGCAATTTGCGTTCAAAGATTTGATGATTCACGGAATTC  
TGCAATTCACACTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGTTGCGAGA  
GCCAAGATATCCGTTGATGAGAATTGTCTCAGTTAGGATGCGACGGCTAG  
GCCGAGCACATATCTTTGGCTTTAGTTTTTGTGGTGTGTTGATTAGTA  
AGGACCAACCCGGACTGCCCAAAGAGTGTTTGGGCAGCCGAGCCCAACC  
CGGACAACAAGTTAATGCTGCCAGGAAGCATCAAACCCTGCTCAAGAG  
AAGGGAGTTGATGGGCCAGACAAAAGTGGTTCACGGTGTGGT

## ÖZGEÇMİŞ



**Ad-Soyad** : Vesile Esra Dökümcüoğlu  
**Doğum Tarihi ve Yeri** : 20/05/1992 Erzurum  
**E-posta** : esradkmcoglu@gmail.com

### ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2014, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik
- **Yüksek Lisans** : 2018, Bursa Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

### BİLİMSEL FAALİYETLER:

- "İzmir Çamaltı Tuzlası'nın Mikrobiyal Çeşitliliği ve Bulunan Organizmaların Biyoteknolojik Potansiyellerinin Araştırılması" isimli 114Z274 numaralı 1001 Tübitak Projesi – Araştırmacı
- Kabaoğlu U., Aslan M. U., Dokumcuoğlu E., Ünal D., (Poster) Gibberellin Hormonunun Lipit Biyosentezi ve Miktarı Üzerine Etkisinin *Chlorella vulgaris* Türünde Uygulanarak Biyodizel Üretiminde Verimliliğinin Araştırılması, 2. Alg Teknolojisi Sempozyumu, 24-27 Mayıs 2016, Seferihisar, İzmir
- "*Chlorella vulgaris* Türünde UV-B ve Yüksek Işık Stresi Altında Poliaminlerin ve Antioksidant Enzimlerine Ait Gen İfadeleri Üzerindeki Rollerinin Araştırılması" isimli 2209 Tübitak Öğrenci Projesi – Araştırmacı
- Dokumcuoğlu E, Akarsu S. (Poster) "*Chlorella vulgaris* türünde yüksek ışık stresi altında putresinin askorbat peroksidaz enziminin gen ifadesi üzerine etkisi" 5. Ulusal Biyoloji Toplulukları Kongresinde (25-27 Nisan 2014) poster ikincilik ödülü.
- Akarsu S., Dokumcuoğlu E., Ozakca D., (Poster) The Effect of Polyamine on mRNA level of Photosynthesis-Related and Antioxidant Enzymes Gene under High Light Stress. III. International Congress of the Molecular Biology Association, 10-12 September, 2014, Izmir-Turkey