

T.C.  
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

*TETRACYSTIS ISOBILATERALIS* R.M. BROWN & H. C. BOLD  
(CHOLOROCOCCALES) MİKROALGININ KÜLTÜRÜ,  
BİYOKİMYASAL ANALİZLERİ VE AĞIR METAL  
BİOSORPSİYONU

Cumhur MİÇOOĞULLARI  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Tezin Sunulduğu Tarih:15.12.2010

Tez Danışmanı:  
Yrd. Doç. Dr. Hüseyin ERDUĞAN

## ÇANAKKALE

### YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

CUMHUR MIÇOOĞULLARI tarafından YRD. DOÇ. DR. HÜSEYİN ERDUĞAN yönetiminde hazırlanan “*TETRACYSTIS ISOBILATERALIS* R.M. BROWN & H. C. BOLD (CHOLOROCOCCALES) MİKROALGININ KÜLTÜRÜ, BİYOKİMYASAL ANALİZLERİ VE AĞIR METAL BİSORPSİYONU” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş olup, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Hüseyin ERDUĞAN

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Okan ACAR

Juri Üyesi

Prof. Dr. Selhattin YILMAZ

Juri Üyesi

Sıra No:

Tez Savunma Tarihi: 15.12.2010

Prof. Dr. İsmail TARHAN

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

## İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

**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 belirttiğimi beyan ederim.**

Cumhur MİÇOOĞULLARI

## TEŞEKKÜR

Çalışmamı başından sonuna kadar yakından izleyen, karşılaşılan pek çok zorluğun aşılmasında yol gosteren Yrd. Doç. Dr. Hüseyin ERDUĞAN'a, tez yazımı ve çalışmalarımnda emeği geçen Prof. Dr. Veysel AYSEL'e, ayrıca Arař. Gör. Rıza AKĖÜL, Emran KILICLAR ve AİLEME teşekkür ederim.

Cumhur MİÇOOĞULLARI

## **SİMGELER VE KISALMALAR LİSTESİ**

AOAC	: Association of Official Analytical Chemist
N	: Normalite
mL	: Mililitre
BG11	: Blue Green Medium
BBM	: Bold' s Basal Medium
Chu10	: Chu Medium
OTM	: Our Tetracystis Medium
B3N	: Modifeield Bold's Basal Medium
ICP-AES	: Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrophotometer
ppm	: Parts Per Million ( $\mu\text{g/L}$ )
DDT	: Dikloro Difenol Trikloroethan
GC-MS	: Gas Chromatography-Mass Spectrometry
HPLC	: High Performance Liquid Chromotography

## ÖZET

### ***Tetracystis isobilateralis* R. M. Brown & H. C. Bold MİKROALGINİN KÜLTÜRÜ, BİYOKİMYASAL ANALİZLERİ VE AĞIR METAL BİOSORPSİYONU**

Cumhur MİÇOOĞULLARI

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Hüseyin ERDUĞAN

15.12.2010, 67

Dünyada bu kadar zengin bir mikroalg florası varken; üretimi yapılabilen ticari mikroalg tür sayısının sınırlı olması, günümüzde mikroalgal biyoteknolojinin gelişmesini engelleyen en önemli etkenlerden biridir. Ticari öneme sahip yeni mikroalglerin tespiti ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanımına yönelik çalışmalar, bu alanın gelişmesine katkı sağlayacaktır. Bu çalışma ile mikroalgal biyoteknoloji bilim dalında yapılan çalışmalara hız verilmek istenmiştir.

Ege Üniversitesi Mikroalg Kültür Koleksiyonundan (EGEMACC) temin edilen *Tetracystis isobilateralis* R.M.Brown & H.C. Bold (Chlorococcales) mikroalg türü. için kültür ortamları ve yaşama şartları belirlenmiştir. Türün belirlenen kültür şartları altında (besin, pH, sıcaklık, ışık yoğunluğu ve havalandırma) kültürü yapılarak durgunluk fazına ulaşan kültürden besinsel ve biyokimyasal analizler için yeterli miktardaki biyomas elde edilmiştir. Toplam protein miktarı, toplam yağ miktarı, yağ asitleri çeşit ve miktarı, A, E Vitaminleri ile β-Karoten miktarı gibi besin değerleri araştırılmıştır. Canlı hücrelerin farklı ağır metallere karşı biyosorpsiyon kapasitesini için kadmiyum, kobalt, kurşun, nikel ve mangan elementlerine ait tuzların 5, 20, 40 ppm şeklinde üç farklı konsantrasyonları hazırlanıp uygulanmış ve biyosorpsiyon miktarları belirlenmiştir.

Mikroalgin OTM besin ortamında (pH; 8,7, 24±2 °C, 500 mL/dak. havalandırma) hücre yoğunluğunun, 30,1x10<sup>6</sup> hücre/ml, biyomas ağırlığının ise 0,462 gr/L ulaştığı belirlenmiştir. Besinsel ve biyokimyasal analizlerinde; toplam protein miktarı, %38,73 toplam yağ miktarı, %16,37 vitaminE miktarı, 301,8 mg/kg, vitaminA miktarı, 28,40 mg/kg ve β karoten miktarına, 815,4 mg/kg' ma sahip olduğu saptanmıştır. Yağ asitleri; Palmitik, Linoleik, Oleik, Stearic yağ asitleri çeşitleri sırası ile % 40.99, %6.34, %35.89, %16,64 değerlerde oldukları belirlenmiştir. 46,5 mg/gr ile en iyi absopladığı metalini mangan olduğu saptanmıştır.

**Anahtar sözcükler:** *Tetracystis isobilateralis*, mikroalg, kültür, besin, ağırmetal

## ABSTRACT

### CULTURE CONDITIONS, BIOCHEMICAL ANALYSIS AND DETERMINATION OF HEAVY METAL BIOSORPTION OF *Tetracystis isobilateralis* R.M.Brown & H.C. Bold

Cumhur MIÇOOĞULLARI

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Science and Engineering

Chair for Biology Thesis of Master of Science

Advisor: Assistant Prof. Dr. Hüseyin ERDUĞAN

15.12.2010, 67

One of the most important reasons why commercial microalgae production is so limited, effects microalgae an biotechnology, even though the earth has a rich microalgae flora. Determination of new microalgae, wich have commercial importance will help to develope this field. By this study it's wanted to hasten the studies, made on this field.

*Tetracystis isobilateralis* R.M. Brown & H.C. Bold (Cholorococcales) determined from the University of Ege, Microalgae Culture Collections are come out for culturel environment. Under the circumstances of the culture, enough biyomas has been gotten access for biochemical and nutriential analyses, which has been cultured. Total protein, oil, fatty acid types, A, E vitamines and  $\beta$  -carroten have been researched. Three different consantrations of living cells against different heavy metals, salt belongs to cadmium, cobalt, lead, nickel and manganese elements applied for biosorption has been certained.

It has been seen that they reached to the sizes  $30,1 \times 10^6$  cell/ml consantration 0,462 gr/L biomass weight under microalgae OTM culture conditions, in 8,7 pH,  $24 \pm 2$  °C and 500 mL/min. in aired culture condition. In biochemical and nutritional analyses it has been seen that it reached to the size; total protein 38,73%, total oil 16,37%, 301,8 mg/kg vitamineE, 28,40 mg/kg vitamineA and 815,4 mg/kg  $\beta$ -caroten. It has been seen that fatty acides, Palonitic, Linoleic, Oleic, Stearic fatty acides have reached to 40,99%, 6,34%, 35,89%, 16,64%. We see that it absorbes mangan, which it absorbes the best in 46,5 mg/gr.

**Keywords:** *Tetracystis isobilateralis*, microalgae, culture, nutrient, heavy metal

## İÇERİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU.....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
SİMGELER VE KISALMALAR .....	v
ÖZET .....	vi
ABSTRACT.....	vii
BÖLÜM 1-GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2-ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....	16
BÖLÜM 3-MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
3.1. Mikroorganizmanın Özellikleri.....	20
3.2. Mikroorganizmanın Elde Edilmesi .....	21
3.3. Kültür Deneyleri (Optimum Sıvı Nutrient Ortamının Saptanması).....	21
3.4. Biyokütlenin Elde Edilmesi .....	23
3.4.1. Aşılama .....	23
3.4.2. Kültür Gelişimi .....	24
3.4.3. Hasat.....	24
3.5. Biyokimyasal Analizler .....	25
3.5.1. Ham Protein Analizi .....	25
3.5.1.1. Yaş Yakma .....	25
3.5.1.2. Distilasyon .....	25
3.5.1.3. Titrasyon.....	25
3.5.2. Ham Yağ İçeriğinin Saptanması.....	26
3.5.3. Yağ Asitleri Kompozisyonunun Belirlenmesi .....	26
3.5.4. Ham Kül İçeriğinin Saptanması.....	27
3.5.5. Nitrojensiz Öz Madde Miktarı .....	27
3.5.6. A ve E Vitamini Miktarının Saptanması.....	27
3.6. Ağır Metallerin Absorplama Miktarlarının Belirlenmesi.....	28
BÖLÜM 4-BULGULAR VE TARTIŞMA .....	29
4.1.Hücre Yoğunluğu.....	29
4.2.Toplam Ham Yağ, Toplam Ham Protein, Nitrojensiz Öz Madde, Ve Toplam Kül Miktarları .....	30



4.3.Yağ Asitleri .....	31
4.4.Kültür Ortamındaki Anyon ve Katyon Değerleri .....	32
4.5. Vitamin ve Beta-Karoten Miktarları .....	43
4.6. Ağır Metal Giderim Sonuçları .....	44
<b>BÖLÜM 5-SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>48</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>49</b>
<b>Şekiller .....</b>	<b>I</b>
<b>Çizelgeler .....</b>	<b>II</b>
<b>Özgeçmiş.....</b>	<b>III</b>

**BÖLÜM 1****GİRİŞ**

Algler, dünya üzerinde bulunan toplam bitki biyokütlesinin üçte birini oluşturmaktadır. Mikroalgler prokaryotik ve ökaryotik tüm fotosentetik mikroorganizmaları kapsar. Mavi-yeşil alg olarak bilinen siyanobakteriler prokaryot olup, diğer algler gibi ökaryot değildir. Mikroalgler balık ve pek çok sucul organizma için besin kaynağı olup, doğadaki besin zincirinin ilk halkasını oluştururlar (Sasson, 1997).

Çoğu mikroalg sucul ekosistemde yaşar fakat bunun yanında çeşitli sucul bitki ve hayvanların yüzeyinde, toprak ve kaya yüzeyleri gibi karasal habitatlara uyum sağlayan türleri de vardır. Algler, su kanallarının tıkanması yada su kaynaklarının algal patlama ve özellikle azot ve fosfor salınımı ile diğer organizmaların yaşamını tehdit eden ötrifikasyon gibi ekolojik sorunlar yaratabilirler. Dinoflagellatlar gibi bazı denizel mikroalgler çok güçlü ekzotoksinleri ile çoğu kabuklu deniz canlısını zehirleyebilmektedirler. Bunun yanında alglerin besin endüstrisi için yoğun miktarda pigment ve proteince zengin sağlıklı beslenme ürünlerinin üretimini sağlayabilmek, atık su arıtımını gerçekleştirebilme gibi faydaları da vardır (De Groot, 1991). Günümüzde alg kültürü yapılarak ticari kazanç sağlanan pek çok alan bulunmaktadır. Bunlar; atık su arıtımı, kimyasal madde üretimi, besin ve yem talebini karşılamaya yönelik alanlardır (Caswell ve Zilberman, 1990).

Alglerden kimyasal madde üretimi üzerine yapılan çalışmalar pigmentler üzerine yoğunlaşmaktadır. Örneğin; pigmentlerden biri olan beta-karoten pek çok ticari uygulama alanı bulunan ancak en çok besin maddelerinin renklendirmesinde kullanılan bir metabolittir. Daha önceleri beta-karoten üretimi sentetik yöntemler ile yapılıyordu. Ancak 1970'li yıllar süresince, bilim adamları, yaptıkları çalışmalar sonucunda; çok tuzlu, yüksek güçte ışık alan ortamda ve besin stresi altında bırakılan *Dunaliella salina* türünün kuru ağırlığının % 14'ünün beta-karoten olduğunu bulmuşlardır. Bu buluş sayesinde beta-karotenin doğal yollar ile nasıl üretileceğine dair çalışmalara başlanmıştır. 1987 yılında dünyadaki doğal beta-karoten piyasasının değeri altı milyon ile on milyon dolar arasındaydı. Ancak zamanla doğal beta-karoten üretiminin artması, bu metabolitin kullanıcılarını ve pazarını etkilemiştir. Bugün ekstrakte edilen ve saflaştırılan doğal beta-karoten sentetik olarak elde edilenden çok daha fazladır. Doğal beta-karotenin kilosu 1000-2000 dolar arasında iken sentetik beta karotenin kilosu ise 400-800 dolar arasındadır. Aralarında bu kadar fazla fiyat farkı bulunmasına rağmen doğal beta-karoten daha çok

tercih edilmekte ve bu ilginin de hakkını vermektedir. Çünkü beta karoten, Ulusal Kanser Enstitüsü (USA)'nın yaptığı açıklamaya göre yağ çözücü, antikarsinojenik, kolesterolü kontrol eden, kalp hastalıklarına yakalanma olasılığını azaltan bir maddedir (Radmer,1996).

Algal ürünlerden elde edilen başka bir kimyasal da fikobiliproteinler olup bazı hastalıkları teşhis etmek amacı ile kullanılmaktadır. Özellikle mikroalglerden elde edilen biliproteinler, genetik çalışmalarda fluoresan işaretçiler olarak kullanılmaktadır. Fikobiliproteinlerin üretimi kolaylıkla yapılabilir ancak yine de gelişmiş teknolojik şartların tam olarak oluşturulması gerekmektedir. Keza; araştırma çalışmaları 1982'de başlamışken fikobiliprotein üretiminden ticari kazanç sağlayabilmek için uzun yılların geçmesi gerekmiştir (Caswell ve Zilberman, 1990).

Pek çok alg türü bünyesinde protein, vitamin, mineral ve doymamış yağ asidi bulundurduğu için yüksek bir besin değerine sahiptir. Üstelik aynı genişlikte bir alanda ve aynı miktarda su ile çok büyük zahmetlerle yetiştirilen çoğu tarım ürününden bile çok daha fazla besinsel öneme sahiptirler. Ancak *Spirulina* hariç bu besin kaynakları, hem insanlar için hem de hayvan yemi olarak henüz tam bir ticari kazanç şekline dönüşmemişlerdir (Caswell ve Zilberman, 1990). *Spirulina* genusu ve *Dunaliella salina* taksonu monokültür ortamlarda yetiştirilebilen nadir mikroalglerdendir. Daha çok Meksika ve Orta Amerika'daki bazı bölgelerde etkin bir şekilde üretilmektedirler. *Spirulina*, pek çok sağlıklı besin ürününü içinde bulunduran bir genustur. 1970'lerin sonları ve 1980'lerin başlarında bu genusun popülerliği çok yükseltilmiş ancak ilerleyen yıllarda bu yükseliş sekteye uğramıştır (Radmer,1996).

Algler, kimyasal madde ve besin üretiminin yanında atık su arıtımında da kullanılırken ortamdaki diğer hayvanlar ve özellikle de balıklar için önemli bir besin kaynağıdır. Bu anlamda çoğu bilim adamı alglerden besin ve yem kaynağı olarak nasıl faydalanılacağına dair araştırmalarını sürdürmektedirler (Caswell ve Zilberman, 1990).

Pek çok bilimsel çalışma ve ticari kuruluşlar, mikroalglerin atık su arıtımında kullanılıp kullanılmayacağına dair araştırma yapmaktadırlar. Daha çok atıkların oksidasyonunu yapan bakterilerin kullanacakları oksijenin havuzdaki algler tarafından üretilebileceğine ilişkin çalışmalar üzerinde durulmaktadır. Yapılan çalışmalar ile bundan başka, atık su arıtım havuzundaki alglerin enfeksiyon olasılığını azalttığı; sedimentasyonu, besin miktarını, ağır metal ile organik toksinlerin sirkülasyonunu ise arttırdığı anlaşılmıştır. Alg üretiminden faydalanarak atık su arıtımı ve enerji üretimi için kurulmuş çok sayıda

sistem bulunmaktadır. Bu sistemlerdeki atık su havuzlarında üretilen algal biyokütle, fermentasyon reaksiyonları ile enerji üretmek için kullanılır. Aynı amaca yönelik hazırlanan kombine sistemler, pahalı ve nadir bulunan enerji kaynakları ile karakterize olmuş sistemler için uygun ve ekonomiktirler. Lağım ve atık suların oksidasyonu için alglerin kullanımı kazanılan enerji değerinde bir artışa neden olmaktadır. Artan üretim, bu alandaki teknolojinin geleceğinin belirlenmesi, kazanılan deneyimin artırılması ve daha çok bilgi toplanmasını sağlamaktadır. Atık su havuzundaki su kütlesinde bazı kimyasalların sirkülasyonu rahatlıkla sağlanabildiği için bu teknolojiye olan talep gün geçtikçe artmaktadır. Örneğin; geçen beş yıl içinde Kaliforniya’da selenyum, diğer mineral ve toksinlerin su ortamından arındırılabilmesi için bu teknolojinin kullanıp kullanılmayacağına ilişkin büyük çapta bir araştırma yapılmıştır. Söz konusu olan problem yeterince büyük olup atık arıtımı için yaklaşık 100 milyon dolar harcanmıştır (Caswell ve Zilberman, 1990).

Algal kullanımı içeren sistemlerin kurulabilmesi için çok geniş alanlara ve yüksek mali desteğe ihtiyaç duyulmaktadır. Bu gibi sorunlar ortadan kaldırıldığında algal teknoloji araştırmaları, insanlığı tehdit eden açlık, kirlilik gibi sorunlar ile sentetik kimyasalları kullanmanın getirdiği sorunlara etkili ve ekonomik çözümler getirecektir. Algal biyoteknolojinin gelecekteki kullanım alanlarına ilişkin yapılan çalışmalar devam etmektedir. Algal araştırmaların bazıları, elde edilen biyokütleden bir yakıt kaynağı olarak faydalanmaya yönelik olmaya başlamıştır. Ancak mikroalglerden tam anlamıyla ticari kazanç sağlayabilmek için gelişmiş teknolojik ekipman’ a ihtiyaç vardır. Mikroalgler, kozmetik ürünler, yiyecek ve yem ihtiyacını karşılamaya yönelik olarak kullanılan maddeler ile vitamin ve bazı gübrelerin yapısına katılabilecek olan pek çok faydalı kimyasal bileşiği içerirler. Bundan başka da yağ asitleri, polisakkaritler, organik besin renklendiricileri, osmoregulatorler, vitaminler ve diğer pek çok önemli kimyasal için kaynak olarak görülmektedirler (Becker, 1994).

Mikroalgler, bazı hastalıkların tedavisinde kullanılan doymamış yağ asitlerinin üretiminde kullanılırlar. Yapılan araştırmalar, omega-3 yağ asidinin kandaki kolesterol ve yağ miktarını azalttığını ve damar çeperlerini temizlediğini göstermektedir. Bundan başka; romatid artrit tedavisinde ve bağışıklık sisteminin zayıfladığı durumlarda da etkilidirler. Bu yağ asitleri en çok balık yağından elde edilirler ancak yine yapılan çalışmalar göstermektedir ki; doğal ortamlarında bulunan mikroalglerden çok daha fazla yağ asidi elde edilebilmektedir. Mikroalglerden direkt olarak elde edilebilen omega-3 yağ asidi,

tavuklar ve süt inekleri için yem olarak ta kullanılabilir. Böylece bu canlılardan elde edilen yumurta ve sütlerin de omega-3 yağ asidi içermeleri sağlanır (Caswell ve Zilberman, 1990).

Değerleri kullanılma süresine, saflığına ve kullanılabilirliğine göre değişiklik gösteren polisakkaritler, bakteri, mantar, mikro ve makroalglerden elde edilebilirler. Polisakkaritler, daha çok koyulaştırıcı, çöktürücü ajan ve yağlandırıcı madde olarak kullanılmaktadırlar. Bakteri ve mantarlar, alglerden daha çok üretkendirler. Ancak alglerden daha çeşitli ve kompleks polisakkaritler elde edilebilir. Uygun şartlar altında mikroalglerin kuru ağırlığının %15-55'i polisakkarit olarak elde edilebilir (Caswell ve Zilberman, 1990).

Mikroalgler, pek çok organik besinin renklendirilmesinde kullanılmaktadır. Bazı mikroalglerin bünyesinde çok miktarda karoten maddesi içermektedirler. Diğer renklendirici maddeler de mikroalglerden rahatlıkla elde edilebilmelerine rağmen, üretilen bu renklendirici maddelerin ışık ve yiyeceklerin pişirilmesi ile ağarması ve rengini kaybetmesi nedeniyle son yıllarda bu sektörde bazı gerilemeler olmuştur. Ancak bu gerilemeye rağmen mikroalglerden elde edilen besin renklendiricilerinin pazarı çok genişlemektedir. Pek çok karbonhidratın, osmotik süreçlerde önemli etkisi vardır. Yine mikroalgler bu maddelerin de temel kaynağıdır. *Dunaliella salina* türünün kuru ağırlığının % 50'sinden fazlası uygun koşullar altında kolaylıkla ozmoregülatörlere dönüştürülebilecek olan maddeleri içermektedirler. Mikroalglerden en kolay yolla bu maddelerin nasıl elde edilebileceğine dair çalışmalar hızla devam etmektedir (Borowitzka ve Borowitzka, 1988)

Sonuç olarak; fikolojinin temel ve uygulamalı alanlarında yapılan temel araştırmalar algal biyokütlelerinin, hayvan yemi, biyolojik gübre, toprak ortamı hazırlama gibi farklı alanlarda ve su kültürleri için besin olarak bundan başka da atık suların biyolojik artımında kullanılabileceğini göstermektedir. Son çalışmalar alglerin daha çok polisakkaritler, yağlar, proteinler, karotenoidler, pigmentler, vitaminler, steroller, enzimler, antibiyotikler ve pek çok diğer kimyasallar (ya da onların öncüleri) hidrojen, hidrokarbonlar gibi farklı bileşiklerin üretiminde kullanılmaktadır (Caswell ve Zilberman, 1990).

Alglerin kullanım alanlarının geliştirilmesinde genelde alg kültürlerinden yararlanılır. Açık kültür sistemlerinin yanında, mikroalg kültürü, farklı amaçlar için laboratuvar ortamında da yapılmaktadır. Kültürü yapılmak istenilen türün doğada az bulunması, bazı türlerin izole edilmesinin kolay olmaması, besi ortamları için gerekli

maddelerin oranlarının ayarlanmasının zor olması, yine kültürü yapılmak istenilen türün yaşam koşullarının çalışmalarda sınırlayıcı olması, kültür çalışmalarında karşılaşılan zorluklardan bazılarıdır. Bu yüzden en basit kültür çalışmaları bile dikkat ve titizlik isteyen uğraşlara dönüşmektedir.

Yukarıda bahsedildiği gibi açık sistem kültürlerin yapılaş amaçlarının yanında laboratuarda yapılan kültürler de bazı amaçlar için kullanılmaktadır.

Laboratuvar koşulları altında yapılan kültür çalışmalarının genel amaçları şunlardır:

\*Hücresel düzeyde ortaya çıkan bazı zorlukların çözülmesi,

\*Üreme evresinde oluşan eşey organlarının yapılarının kesin öğrenilmesi,

\*Sürekli kültürler yapılarak, ders ve laboratuvarlar için gerekli canlı materyalin devamının sağlanabilmesi,

\*Besin değeri yüksek, tıbbi önemi olan metabolitlere sahip mikroalg türünün biomasını üretilmek için yapılacak çalışmalarda aşılama kullanılmak üzere kültürlerin sağlanması.

Bütün bu çalışmaların ışığında alglerin morfolojileri, taksonomisi, üremeleri ve en önemlisi ekonomik değerleri ile ilgili daha fazla bilgi elde edilecek ve bu bilgiler yorumlanarak teknolojiye aktarılabilir. Böylece alglerin yeni kullanım alanları ortaya çıkabilecek veya var olanlar geliştirilebilir (Pringsheim, 1946).

Mikroalgal biyoteknoloji bilim dalının temelini oluşturan izolasyon ve kültür çalışmaları 1800'lü yıllara dayanmaktadır. 1804 de Saussure, bitkilerin mineral ihtiyaçlarını araştırmak için su kültürlerinin kullanılması gerektiğini belirten bir çalışma yapmıştır. Çeşitli tuzların seyreltilmiş çözeltisinde çiçekli su bitkileri olan *Polygonum persicaria* ve *Bidens cannabia* türlerinin yetiştirilmesiyle mikroalg kültür çalışmalarının yolu açılmıştır. Sürecin gelişimi sırasında araştırmacılar su kültürleri içinde bulunabilecek besleyicilerin tayini için farklı çalışmalar yapmışlardır. Cassincourt, John ve Boussingoult, bitkileri asitte kaynatılmış bir ortamda yetiştirmişler; fakat istedikleri sonuçları elde edememişlerdir. Salm Horstemar (1856), bu ortamı asitle yıkama fikrini geliştirdi ve bitki beslenmesinde nitrojen, fosfat, sülfür, kalsiyum, potasyum, magnezyum, silikon, demir, manganezin gerekliliğini göstermiştir. Bu elementlerden birinin eksikliğinin sonucu olarak bitkide görülen fizyolojik semptomları tanımlamış, fakat kum ve diğer farklı materyallerin asitle yıkanması zaman alıcı bir iş olduğunu düşünen Sachs; bitkileri su tarımı ya da hidroponik olarak bilinen kimyasal solüsyonda yetiştirmeyi denemiştir. Çalışmaları süresince, bitkilerin beslenmesi için gerekli olduğu düşünülen tüm elementleri içeren sabit

bir bileşimin solüsyonunu kullanmıştır. Bitkilerin yakılması sonucunda ortaya çıkan kül bileşenlerinden oluşan bir solüsyonun içine külün yapısında bulunmayan organik maddeleri ekleyerek sağlıklı bitkiler yetiştirmeyi başarmıştır (Johnston, 1976).

Bitki kültürü solüsyonu geliştirmeye ilgili yapılan çalışmalara, uygulanması daha kolay olan yöntem Knopp tarafından hayata geçirilmiştir. Solüsyon oluştururken farklı kimyasal maddeler kullanmış ve bunları molar oranlar olarak tanımlamıştır. Böylece farklı bitkilerin aynı solüsyonda yaşamlarını sağlamış, kullanımında kolaylık sebebi ile bu solüsyon geniş ölçüde kabul görmüştür. Knop'un solüsyonunu kullanan Rus Famintzin (1871), tarım solüsyonlarının kullanımı sırasında alglerin beslenme ihtiyaçlarının öğrenilmesi zorunluluğunu takdir eden ve sık sık dile getiren ilk kişi olarak bilinmektedir. Bu fikiri destekleyen Molisch ve Beneke yaptıkları çalışmalarla yüksek bitkiler ile alglerin beslenme ihtiyaçlarının benzerliklerini ortaya çıkarmışlardır. 1890 yılında Hollandalı bakteriyolog Beyerinck, öncelikle en kolay ve bariz prosedürü kullanarak algleri kendi doğal habitatlarından alınan suda yetiştirmeyi denemiştir. İzole ettiği *Chlorella* ve *Scenedesmus* cinslerini jelâtinle katılaştırılmış kuyu suyu kullanarak hazırladığı bakterisiz kültür ortamında yetiştirmiş ve *Chlorella* cinsinin botanik ve fizyolojik denemelerde kullanılması bu çalışmayla başlamıştır. 20. yy. başından itibaren, fizyologlar alglerin bakterisiz ortamda kültürünü temin etmeye daha fazla odaklanmışlardır. Bu çalışmalara Chadat, Grintzescho ve öğrencileri, Moore, Chick ve Pringsheim gibi isimlerin katkıları olmuştur. Pringsheim septik ve aseptik olmak üzere alglerin saf kültürlerinin koleksiyonunu oluşturmada temel atan ilk isimdir. Yüksek bitkilerde fotosentezin kinetiğiyle ilgili yapılan çalışmalar, fotosentez hızının kültür ortamında bulunan heterotrof canlılar ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. Çünkü bakteriler ve fotosentez yapmayan mikroorganizmalar bu ortamlarda kontaminant olarak bulunurlar. Steril olmayan bir ortamda fotosentez hızını araştırmak gerçek sonuçları vermez (Johnston, 1976).

Su bitkilerini sterilize etmek için o dönemde yeterli teknik yoktu, çalışmaları yapan bilim adamları yeşil alg olan *Chlorella* cinsinin kullanılabilmesini düşünmüşlerdir. Beyerinck tarafından daha önceleri izole edilen bu mikroorganizma Pringsheim'in alg kültürleri koleksiyonundan elde edilebilmiştir. Alglerin küçük ölçekte yapılan çalışmalar için tamamen inorganik bileşenlerin bulunduğu kültür ortamlarında steril koşullarda kolaylıkla yetiştirilebilir olması algal çalışmaların başlamasına neden olmuştur. Mikroalglerle yapılan ilk çalışmalar fizyolojik deneylerle ilgili olduğu için yoğun miktarda

alg üretimine gerek duyulmamıştır. Fakat antibiyotiğin bulunması ve mikroorganizmaların geniş ölçekte endüstriyel olarak üretilmeye başlanmasıyla yüklü miktarda alge ihtiyaç duyulmuştur. Özellikle 20. yüzyılın başlarında deniz zoologları, Coelenterata, Mollusca, Annelida ve Crustacea taksonlarına ait pek çok canlının hayat döngüsünü çözmek ile ilgili çalışmalar yapmışlardır. Bu canlıların larval formlarının planktonik olduğunu görek öncelikle fitotoplanktona bağımlı olduklarını düşünmüşlerdir. Bunun için Grave, larvaların diatomların bulunduğu ortamlarda yetiştirilebileceğiyle ilgili ilk çalışmaları yapmıştır. 1905’de Allen ve 1907’den itibaren Nelson’la birlikte diatom kültürleriyle zenginleştirilmiş steril deniz suyunda larvaların büyümesini sağlamak için deneylere başlamışlardır. Diatom kültürü ile göze çarpacak bir başarı sağlamışlar ve her ne kadar çoğu tamamen karışık organizmalardan arınmış olmasa da sürekli kültürlerde kullanılabilir 18 tür elde etmeyi başarmışlardır. Alglerin biyokimyasal yapısıyla ilgili çalışmalar ancak saf ve makul miktarda materyal elde edilirse yapılabilmektedir. Bu zamana kadar bu tip araştırmalar için uygun miktarda materyal ancak doğal ortamlardaki algal patlamalar ile elde edilebilirdi. Retousky, *Scenedesmus obliquus* taksonunu ve *Navicula* cinsinin bir türünü 70 litrelik kültür solusyonunda yetiştirmeyi denemiştir. Bir kaç haftada kuru ağırlık olarak 25 gr *Scenedesmus obliquus* ayrıca 20 gr *Navicula* cinsi bir mikroalg üretmiştir. Daha sonra ilk olarak karotenoid pigmenti olan fukoksantini hücrelerden ayırıp kristalize etmeyi başarmıştır (Johnston, 1976).

1940-41 yıllarında Strain ve arkadaşları, *Chroococcus* ve *Aphanizomenon* cinslerinden başlayarak mavi-yeşil alglerden pigment çıkarmayı başarmışlardır. Bu çalışmalar ile bitkiler alemindeki tüm canlı gruplarından pigment ekstraksiyonu üzerine geniş araştırmalar başlamıştır. Daha yüksek bitkilerle kıyaslandığında alglerde bulunan fotosentetik pigmentlerin dağılımı bilim adamlarını şaşırtmıştır. Algal pigmentleri hücrelerden ayırabilmek için alglerin saf kültürleriyle çalışmak gerekmektedir. 1940-42 yıllarını kapsayan bir yıllık raporda konuyla ilgili çalışmalara 10 litrelik kaplarda saf kültürde yetiştirilen ve bir diatom türü olan *Nitzschia closterium* ile başladıkları belirtilmiştir. Aynı raporda farklı tipte ışıkların *Nitzschia* cinsinin ksantofillerinden birinin miktarında çeşitliliğe neden olduğu belirtilmiştir. Sıradan beyaz ışık kullanımı ile neon ışık kullanımına bağlı olarak *Nitzschia* cinsindeki diadinoksantin miktarının çeşitlilik göstermesi, çevresel koşullardaki değişikliklerden kaynaklanmaktadır (Johnston, 1976).

Alglerin izolasyonu ve saf kültürü zor olmasına rağmen biyokimyasal ve fizyolojik araştırmalar için kullanılabilir miktarda materyali elde edebilmek açısından algler büyük



bir öneme sahiptirler. Bu organizmaların bazıları aynı zamanda sıcaklık, ışık şiddeti, pH ve tuzluluk açısından farklı deneysel koşullara tabii tutulabilmektedirler. Bu çalışmalar alglerin değişen çevre şartlarına yüksek bitkilere göre daha toleranslı olduklarını göstermiştir. Alglerin bu özellikleri, onların kültür ortamında değiştirilen fiziksel koşullara tepki olarak kendilerine özgü metabolitler oluşturmalarını sağlamaktadır. Bu bilgiler ışığında *Chlorella pyrenoidosa* taksonunda antibiyotik özelliği gösteren bir maddenin elde edilebileceği düşüncesi ortaya çıkmıştır. Alglerden çıkarılan yağ asitlerinin antibiyotik özelliği göstermesi ışık ve havaya maruz kaldığında gerçekleşmektedir. Bu durumun yağ ve hidrokarbon içeriği fazla olan hücrelerde yağ asitlerinin bazı bileşenlerinin fotooksidasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Mikroalglerin ürettiği yağ, protein ve karbonhidratın oransal değişimlerinin çevrenin etkisi ile değiştiği yapılan çalışmalar sonucunda anlaşılmıştır. Karbonhidratlar her türlü besin kaynağından rahatlıkla elde edilebilirken, yağlar ve proteinlerin eldesi daha zordur. Bu noktada yağ ve protein kaynağı olarak alglerin kullanımı ortaya çıkmaktadır. Yapılan çalışmalarda; bir mikroalgin uygun koşullar altında kuru ağırlığın %50'si kadar protein; başka koşullar altında ise aynı mikroalg kuru ağırlığının % 70'i kadar yağ üretebildiği ortaya konmuştur (Johnston, 1976).

1950'li yıllarda Mueller'in mucizevi kimyasalı DDT'nin bulunması, böceklerle taşınan protozoa parazitlerinin yarattığı salgın hastalıklar ve çekirge istilasının azalması ve dünya savaşlarının sonlanması ile insan nüfusunda önemli bir artış olmuştur. İnsan nüfusunu kontrol altında tutan bu faktörlerin ortadan kalkışına bağlı olarak da popülasyonda artış ve bunu takiben besin sıkıntısı gözlenmiştir. Bu durum, besin zincirinin ilk halkası olan bitkilerin üretimini sağlamak amacıyla zirai faaliyetlerinde artışa neden olmuştur. Japonya ise çok az tarım alanı ve beslenmesi gereken milyonlarca insanı düşünerek *Chlorella* başta olmak üzere pek çok mikroalgin besin olarak tüketilmesi konusunda Tokyo'daki Tokugawa Biyolojik araştırma enstitüsünde araştırmalara başlamıştır. Bazı ülkelerde endüstriyel düzeyde mikroalg üretiminin bu kadar hızlı bir gelişme göstermesinin nedeni toprak tarımı ve mikroalg üretiminin kıyaslanmasıyla açıklanabilir. Bitkilerin toprak tarımıyla yetiştirilmesi sürecinde, tohum ve toprağın hazırlanması, uygun şartların yaratılması, zararlı ot ve parazitlerden korunması, elde edilen ürünün toplam biyokütlesinin kullanılmaması gibi ekonomik ve ekolojik pek çok sorunla karşılaşılabilir. Oysa mikroalg kültüründe bu tarz sorunlar söz konusu değildir. Besleyici solüsyon bir kez hazırlanır ve aşılama yapılır, daha kısa zamanda kapalı alanlarda yetiştirilmiş olan tamamı kullanılabilir biyokütle hasat edilir. Ayrıca mikroalglerin

üretildiği ortama bağlı olarak besin ve biyokimyasal içerikleri amaca uygun olarak değiştirilebilirken zirai bitkiler böyle değişikliklere tolerans gösteremezler. Her ne kadar mikroalg üretimi toprak tarımına göre avantajlı olsa da kültürü sırasında dikkat edilmesi gereken pek çok nokta vardır. Üretilmesi istenen mikroalge özgü steril ve uygun besleyici ortam ile havuzların hazırlanması, optimum ışık, sıcaklık, tuzluluk, pH değerlerinin ayarlanması, yeterli çalkalama hız ve tipinin sağlanması ve verimli bir hasatın gerçekleştirilmesi dikkat edilmesi gereken temel hususlardır. Spoehr ve Minler, 1940'lı yıllarda ilk kez *Chlorella* cinsinin canlılar için temel besin olan protein ve yağ kaynağı olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Beslenmede *Chlorella* cinsinin kullanımıyla ilgili çalışmalar farklı alanlarda da yapılmaya başlandı. Bilim adamlarının artık uzayla ilgilenmeye ve uzay istasyonları hatta dış gezegenlere yapılan uzun süreli gezileri tasarlamaya başlamaları ile birlikte uzayda *Chlorella* cinsinin besin olarak tüketilmesiyle ilgili çalışmalara başlanmıştır. Bir insan sağlıklı beslenebilmek için protein, yağ, karbonhidrat, vitamin, inorganik elementler ve suya ihtiyaç duyar. Uzaydakiler içinse besin ihtiyaçlarının karşılanması; bu işlenmiş gıdaların ihtiyaçlarını sürekli olarak karşılamadaki zorluğu ve pahalılığı, bu yabancı ortamın suniliği ve boşaltım artıklarının uzaklaştırılması yönünden önemli bir hal almaktadır (Johnston, 1976).

*Chlorella* cinsi başta olmak üzere diğer mikroalgler ve ticari ürünlerin besinsel içeriği incelendiğinde söz konusu zorlukları aşmanın daha kolay olacağı düşünülmüştür (Çizelge 1).

Çizelge 1. Mikroalgler ve ticari besinsel ürünlerin % olarak besinsel karşılaştırılması. Becker (1994), Fabregas ve Herrero (1985), Aaronson ve Dubinsky (1982), Miles ve Chapman (2009)

<b>Ticari Ürünler</b>	<b>Protein %</b>	<b>Karbohidrat%</b>	<b>Yağ%</b>
Et	43	1	34
Balık	55	-	38
Yumurta	49	3	45
Süt	26	38	28
Pirinç	8	77	2
Soya Fasülyesi	37	30	6-10
Mısır	10	85	21

Buğday	14	84	14-22
Balık yemi	60-72	-	2
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	6
<i>Clamdomonas reinhardii</i>	48	17	14-20
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	9-14
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	12-14
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6-7
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	4-9
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	11-21
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	11
<i>Arthrospira maxima</i>	60-71	13-16	-
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	-
<i>Spirogyra sp.</i>	6-20	33-64	-
<i>Synechococcus sp.</i>	73	15	-
<i>Tetraselmis suecica</i>	41	-	-
<i>Isochrysis galbana</i>	39	-	-
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	54	-	-
<i>Chlorella stigmatophora</i>	39	-	-

Ototrof canlılar yeryüzündeki tüm aminoasit çeşitlerini sentezlerken, heterotrof canlılar temel aminoasit çeşitlerini sentezleyemezler. Fakat sağlıklı beslenebilmek için tüm aminoasit çeşitlerini vücutlarına almaları gerekir. Yukarıdaki tabloya bakıldığında *Chlorella* cinsi ve diğer pek çok alg türünün besinsel içeriğinin insan tüketimine uygun olduğu görülmektedir. Tablodaki alglerin protein seviyelerinin, en yüksek oranda bitkisel protein bulduran soya fasulyesi bitkisinden dahi yüksek olduğu görülmektedir. Yine bu canlıların toplam yağ miktarları, çoğu bitkisel kaynaktan daha yüksektir.

Ayrıca mikroalg hücrelerindeki yağlı bileşiklerin yüksek bitki hücrelerindeki benzediği fakat yağ asitleri yönünden doymamış yağ asitlerinin genellikle yüksek bitkilerdeki miktarından üç kat fazla bulunduğu belirtilmiştir (Johnston, 1976).

Çizelge 1 incelendiğinde; açık sistemlerde kültürleri yapıp yoğun miktarda üretilen bazı mikroalglerin insan ve hayvan beslenmesinde gıda maddesi olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Aynı zamanda içerdikleri vitamin değeri ve çeşitliliği gözönüne alındığında mikro alglerin önemli bir kaynak olduğu dikkati çeker (Çizelge 2).

Çizelge 2. Bazı mikroalglerin ve besinsel ürünlerin vitamin değerleri (Becker, 2004).  
RDI: Tavsiye edilen günlük beslenme referans değeri

	Vit A	Vit B1	Vit B2	Vit B6	Vit B12	Vit C	Vit E	Nikotin	Biyotin	Folik Asit	Pantotenik Asit
<b>RDI (mg/d)</b>	1.7	1.5	2.0	2.5	0.005	50.0	30.0	18.0	-	0.6	8.0
<b>Ciğer</b>	60.0	3.0	29.0	7.0	0.65	310.0	10.0	136.0	1.0	2.9	73.0
<b>Ispanak</b>	130.0	0.9	1.8	1.8	-	470.0	-	5.5	0.007	0.7	2.8
<b>Ekmek Mayası</b>	İz miktar	7.1	16.5	21.8	-	İz miktar	112.0	4.0	5.0	53.0	-
<b>Siprulina platensis</b>	840.0	44.0	37.0	3.0	7.0	80.0	120.0	-	0.3	0.4	13.0
<b>Chlorella pyrenoidosa</b>	480.0	10.0	36.0	23.0	-	-	-	240.0	0.15	-	20.0
<b>Scenedesmus quadricauda</b>	554.0	11.5	27.0	-	1.1	396.0	-	108.0	-	-	46.0

Vitamin yönünden incelendiğinde, ticari olarak üretilip besin olarak tüketilen bazı mikroalglerde, insan ve hayvan besini olarak tüketilen bitkisel ve hayvansal kaynaklı bazı ürünlere göre yine kat kat fazla olduğu dikkati çekmektedir. Bu maddeler, çok güçlü birer antioksidant olmalarının yanında, canlı bünyesinde ko-enzim yapısına katılarak düzenleyici olarak görev yaparlar. Ayrıca vitamin A, B kompleksinin bütün üyeleri, C, E, pantotenik asit ve nikotinik asitin içeriği küçümsenmeyecek miktarlarda bulunur (Becker, 2004).

*Chlorella* cinsine ait mineral içeriği incelendiğinde sadece kalsiyum minerali miktarının düşük olduğu görülmektedir (Çizelge 3). Fakat kalsiyumu heterotrof canlılar çok farklı kaynaktan da karşılayabilir. Diğer minerallerin yüzdesel oranlarının ise yeterli olduğu söylenebilir (Johnston, 1976).

Çizelge 3. *Chlorella* sp. mikroalginin mineral değerleri (Johnston, 1976)

Element	%
Fosfor	1,30
Potasyum	1,09
Sodyum	iz
Magnezyum	0,524
Demir	0.0314
Sülfür	0.935
Bakır	0.01078
Klor	0.146
Kalsiyum	0.0103

Biyokimyasal içeriği incelendikten sonra çözülmesi gereken diğer sorunlar toksisite, lezzet ve beğenilebilirliktir. İnsan ve hayvan beslenme testleri, toksisite sorunu olmadığını ortaya çıkarmıştır. ABD ordusu araştırmalarında kuru ağırlık olarak 100 gram kadar *Chlorella* alginin problemsiz olarak tüketilebileceğini ortaya koymuştur. Başka bir çalışmada, yaklaşık bir aylık periyotta 2380 grama kadar *Chlorella* ve *Scenedesmus* karışımının alınmasının herhangi bir zehir etkisi yaratmadığı belirtilmiştir. Fakat kabul edilebilirlik ve lezzet açısından sorun tam olarak çözülememiştir. Bu materyalin kıvamı çorbaya, tadı ise taze çimene benzemektedir. Fakat bu özellikler çoğu insan için kabul edilebilir değildir. Kurutulmuş *Chlorella* ise fasulye ve kabağa benzer bir tada sahiptir. (Johnston, 1976).

Geçen 150 yıl boyunca, ağır metallerin sucul çevreye girdisi, dünyamızın endüstrileşme hızına paralel olarak artmıştır. Birçok ağır metal, biyolojik sistemler için mikronutrient iken, suda yaşayan çoğu yaşam formu için minimum seviyede dahi zehirli hale gelmektedir. İnsan aktivitesi neticesinde, çökeltme, soğurma ve partikül yerleşmesi ile metaller göllerin, akarsuların ve denizlerin çökeltlerinde depo edilirler. Sudaki alglerin varlığı ve çeşidi denizler, tatlı su gölleri, havzalar ve nehirlerin su kalitesinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Algal bitki örtüsü varlığının belirlenmesi, su kalitesinin ölçümünde kullanılan pek çok kimyasal yöntemle göre daha basit ve ekonomiktir. Küçük ve büyük birçok su yosunu taksonu potansiyel bir ağır metal biyosorbenti olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4).

Çizelge 4. Ağır metal sorpsiyonları için sorbent olarak test edilen mikroalgler  
(Brinza ve ark. 2007)

Algler	Metaller	Araştırmacılar
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	K, Mg, Ca, Fe, Sr, Co, Cu, Mn, Ni, V, Zn, As, Cd, Mo, Pb,Se.	(Mahan et al., 1989)
<i>Chlorella salina</i>	Co, Zn, Mn	(Garnham et al., 1992)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Ni	(Akhtar et al., 2004)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cd, Pb, Cu, Ag	(Gin et al., 2002)
<i>Chlorella miniata</i>	Cr(VI)	(Han et al., 2006)
<i>Chlorococcum sp</i>	Cd, Pb, Cu, Ag	(Gin et al., 2002)
<i>Cyclotella cryptica</i>	Al, Zn, Pb, Cu, Cd	(Schmitt et al., 2001)
<i>Lyngbya taylorii</i>	Pb, Cd, Ni, Zn	(Klimmek et al., 2001)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Al, Zn, Pb, Cu, Cd	(Schmitt et al., 2001; Zhou et al., 1998)
<i>Porphyridium purpureum</i>	Al, Zn, Pb, Cu, Cd	(Schmitt et al., 2001)
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Cd, Pb, Cu,Ag	(Gin et al., 2002)
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	Al, Zn, Pb, Cu, Cd	(Schmitt et al., 2001)
<i>Spirogyra sp</i>	Cr	(Gupta et al., 2001)
<i>Spirulina sp</i>	Cd	(Rangsayator et al., 2002)
<i>Spirulina platensis</i>	Cr	(Li et al., 2006)
<i>Stichococcus bacillaris</i>	K, Mg, Ca, Fe, Sr, Co, Cu, Mn, Ni, V,Zn, As, Cd, Mo, Pb, Se.	(Mahan et al., 1989)
<i>Stigeoclonium tenue</i>	Cd, Pb, Zn	(Pawlik-Skowronska, 2)

Mikroalgler yanında makroalglerde ağır metal kirliliğinde indikatör olarak kullanılmaktadır (Çizelge 5).

Çizelge 5. Ağır metal absorpsiyonları için sorbent olarak test edilen makroalgler (Brinza ve ark. 2007)

<b>Algler</b>	<b>Metaller</b>	<b>Araştırmacılar</b>
<i>Ascophyllum nodosum</i>	Cd, Zn, Pb, Cu	(Sandau et al., 1996)
<i>Ascophyllum sp.</i>	Pb, Cd	(Volesky and Holan, 1995)
<i>Cladophora crispata</i>	Cd, Pb, Cu, Ag	(Gin et al., 2002)
<i>Cladophora fascicularis</i>	Pb	(Deng et al., 2006)
<i>Codium fragile</i>	Cd	(Basso et al., 2002)
<i>Colpomenia sinuosa</i>	Cu, Ni	(Schiewer and Wong, 2000)
<i>Corallina officinalis</i>	Cd	(Basso et al., 2002)
<i>Ecklonia sp</i>	Cr	(Yun et al., 2001)
<i>Fucus vesiculosus</i>	Cd, Zn, Pb, Cu	(Herrero et al., 2006; Murphy et al., 2007; Sandau et al., 1996)
<i>Fucus ceranoides</i>	Cd	(Herrero et al., 2006)
<i>Fucus serratus</i>	Cd	(Herrero et al., 2006)
<i>Fucus spiralis</i>	Cu	(Murphy et al., 2007)
<i>Gracilaria fischeri</i>	Cd, Cu	(Chaisuksant, 2003)
<i>Gracilaria sp.</i>	Pb, Cu, Cd, Zn, Ni	(Sheng et al., 2004b)
<i>Jania rubens</i>	Pb	(Hamdy, 2000)
<i>Laminaria digitata</i>	Cd, Zn, Pb, Cu	(Sandau et al., 1996)
<i>Laminaria japonica</i>	Cd, Cu,Pb	(Yin et al., 2001; Zhou et al., 1998) (Luo et al., 2006)
<i>Laurencia obtusa</i>	Cr, Co, Ni, Cu, Cd	(Hamdy, 2000)
<i>Padina pavonia</i>	Cd, Ni Pb	(Ofer et al., 2003) (Jalali et al., 2002)
<i>Padina sp</i>	Cd Pb, Cu, Cd, Zn, Ni Cu	(Kaewsarn and Yu, 2001) (Sheng et al., 2004b) (Kaewsarn, 2002)
<i>Palmaria palmata</i>	Cu	(Murphy et al., 2007)
<i>Petalonia fascia</i>	Cu, Ni	(Schiewer and Wong, 2000)
<i>Pilayella littoralis</i>	Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Zn	(Carrilho and Gilbert, 2000)
<i>Porphyra columbina</i>	Cd	(Basso et al., 2002)
<i>Sargassum asperifolium</i>	Pb	(Hamdy, 2000)
<i>Sargassum hemiphyllum</i>	Cu, Ni	(Schiewer and Wong, 2000)
<i>Sargassum hystrix</i>	Pb	(Jalali et al., 2002)
<i>Sargassum natans</i>	Pb	(Jalali et al., 2002)
<i>Sargassum sp.</i>	Pb, Cd Pb, Cu, Cd, Zn, Ni Cr	(Cruz et al., 2004; Volesky and Holan, 1995) (Sheng et al., 2004b) (Bishnoi et al., 2006)
<i>Sargassum vulgare</i>	Cd, Ni	(Ofer et al., 2003)
<i>Sargassum kjellmanianum</i>	Cd Cu	(Zhou et al., 1998)
<i>Turbinaria conoides</i>	Pb	(Senthilkumar et al., 2007)
<i>Ulva fascia</i>	Cu, Ni	(Schiewer and Wong, 2000)
<i>Ulva lactuca</i>	Pb	(Hamdy, 2000)
<i>Ulva reticulata</i>	Zn	(Senthilkumar et al., 2006)
<i>Ulva sp</i>	Pb, Cu, Cd, Zn, Ni Cu	(Murphy et al., 2007; Sheng et al., 2004b) (Murphy et al., 2007)

Su yosunları tarafından ağır metallerin absorblanması dört farklı mekanizma ile gerçekleşir. Birincisi; alglerde bulunan  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  gibi hafif metal iyonları, ortamda bulunan ağır metallerle yer değiştirme süreci olan iyon yer değiştirme mekanizması ile olur. İkincisi; metal ve aktif gruplar arasındaki etkileşimin sonucu olarak hücre yüzeyinde kompleks oluşumu yoluyla meydana gelen koordinasyon ve kompleks oluşumu mekanizması ile gerçekleşir. Üçüncüsü; hücrel metabolizma sürecinde oluşan çözelti pH'ı değiştiğinde ya da atık sudaki iyonik konsantrasyon doyma indeksi seviyesine yükseldiğinde çökmenin meydana gelmesi şeklinde olur. Son olarak da metal alımının gerçekleşmesi durumu olan mikroçökme (Mikropresipitasyon), *Chlorella miniata* gibi bazı canlı mikroalglerin indirgeyiciler olarak polisakkaritlere bağlanarak metali taşımaları ve hücrelerin içine yerleştirmeleri ile gerçekleşen kelasyon (toksik etkileri gidermede kullanılan bir yöntem) olmak üzere dört farklı şekilde gerçekleşir (Brinza ve ark, 2007)

Ağır metal biyosorpsiyonunu etkileyen faktörler; pH, sıcaklık, karıştırma (mekanik veya havasal olarak), debi rejimi (statik ya da dinamik ve kolon reaktörleri için düz akıntı ya da ters akıntı biçimi), reaktör çeşitleri (grup reaktör ya da sabit, akışkan, genişlemiş yatak sütunu reaktörleri) gibi çevresel olabildiği gibi; hücre duvarındaki radikal grup çeşitleri, cansız ya da canlı doku kullanımı, hücrelerin ağır metale erken fazda maruz kalmaları, algal dokunun boyutu ya da farklı büyüme aşamalarında kullanılan alg bölümleri, besin ve oksijen gereksinimleri, hücre boyutu ve biyokütle yoğunluğu, biyokütlenin tolerans gücü, biyokütle seçiciliği, bağlanma yerinin kalınlığı ve biyokütlesel faktörler de olabilir (Ting ve ark., 1989).

Callegari, 1989 yılında verdiği raporda 50'ye yakın biyokimyasal ve ekofizyolojik çalışmada 22000 ile 26000 adet mikroalg türünün bulunduğu tahmin edildiğini belirtmiştir (Sasson, 1997).

Dünyada bu kadar zengin bir mikroalg florası varken; üretimi yapılabilen ticari mikroalg tür sayısının sınırlı olması, günümüzde mikroalg biyoteknolojinin gelişmesini engelleyen en önemli etkenlerden biridir. Ticari öneme sahip yeni mikroalglerin tespiti ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanımını kapsayan çalışmalar, bu alanın gelişmesine katkı sağlayacaktır. Tez konusu, bu düşünceden yola çıkılarak tespit edilmiş ve daha önce herhangi bir mikroalg biyoteknolojik çalışmada kullanılmamış bir alg türü seçilerek, bu alanın ülkemizdeki gelişimi hızlandırmak ve ekonomik anlamda kullanılabilirliğini ortaya koymak amaçlanmıştır.



**BÖLÜM 2****ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR**

Tez konusu ile ilgili çalışmamıza ışık tutacak yapılmış olan yerli ve yabancı çalışmaların bir kısmının içeriği ve sonuçları aşağıda özetlendiği gibidir.

Giriş bölümünde bahsedildiği gibi mikroalglerin yoğun kültürü ile ilgili çalışmalar 120 yıl öncesine dayanmaktadır. Beijerinck 1890 yılında yaptığı çalışmasında *Chlorella* cinsinin yoğun miktarda üretimini sağlayabilecek kültür ortamını hazırlamıştır (Richmond, 2004).

Horvatic ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmada *Chlorella kessleri* yeşil alginin büyümesi için gerekli olan besin maddelerini biyolojik yöntemlerle bulmaya çalışmışlardır. Kullanılabilir besin maddelerini belirlemişler ve Sakadas Gölü'ndeki azot ve fosfor sınırlamasının etkisini minyatürize edilmiş biyolojik ortamlarda araştırmışlardır.

Dayanandaa ve arkadaşlarının 2006 yılındaki çalışmalarında; *Botryococcus braunii* mikroalginin farklı kültür ortamlarında hidrokarbon ve ekzopolisakkarit üretimi için ototrofik kültürünü yapmışlardır. Çalışma sonunda organizmanın farklı kültür ortamlarına alışabildiğini ve bu ortamlarda birden fazla metaboliti üretebildiğini bulmuşlardır.

Hameed ve Hasnain 2005 yılında, Pakistan'ın çeşitli yörelerinden toplanan su ve toprak örneklerinden izole edilen tek hücreli siyanobakteriler, BG 11, Bold Basal, Chu10 ve Gorham ortamlarında farklı pH, ışık ve sıcaklıklarda yetiştirmişler ve optimum büyüme şartlarını belirlemişlerdir. Bu süreçte, kromu 100–200 µg/ml miktarda ortamlara ekleyip kroma dayanıklı ırkları belirlemeye çalışmışlardır. Krom ağır metale dayanıklı bu ırkların, Cr<sup>+6</sup> iyonlarını Cr<sup>+3</sup> iyonlarına indirgedikleri optimum sıcaklığın farklı pH ortamlarında 30°C olduğunu belirlemişlerdir.

El-Sheekh ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları çalışmada; *Nostoc muscorum* ve *Anabaena subcylindrica* taksonlarının evsel ve endüstriyel atık sularındaki ağır metal alınımının etkinliğini ve büyümeye etkilerini araştırmışlardır. Atık sulardan siyanobakteri kültürlerinin kullanımı ile bakır, kobalt, kurşun ve mangan gibi ağır metallerin sırasıyla, % 12.5-81.8, 11.8-33.7, 26.4-100 ve 32.7-100 oranlarında alınabildiğini gözlemlemişlerdir.

Pratoomyot ve arkadaşlarının 2005 yılında 10 adet mikroalg türünün durgun faz ve büyüme fazındaki yağ asidi kompozisyonunu bulmaya çalışmışlardır. Yağ asidi kompozisyonunun türden türe değişiklik gösterdiğini, *Bacillariophyceae* grubuna ait üyelerin her iki fazda da doymamış yağ asitlerini yüksek miktarda bulundurduklarını,

*Chlorophyceae* ve *Cyanophyceae* grubu üyeleri çok miktarda yağ asidi içerirken, *Prasinophyceae* üyelerinin az miktarda içerdiklerini bulmuşlardır.

Pena-Castro ve arkadaşları 2004 yılında sürekli kültürlerdeki *Scenedesmus incrassatulus* alginin; Cr (VI), Cd (II) ve Cu (II) ağır metallerinin tek tek, ikili ve üçlü karışımlarının bulunduğu, EDTA varlığı nedeniyle düşük serbest iyon aktivitesine sahip olan yapay atık sulu ortamlarda yetişmesini araştırmışlardır. *S. incrassatulus* alg test edilen ağır metalleri % 25–78 oranında almış fakat kesik kültürlerdeki yüksek pH nedeniyle bivalent metallerin alımında aynı başarı yakalanamamıştır.

Rocha ve arkadaşları 2003 yılında *Nannochloropsis gaditana* denizel mikroalginin büyüme şartlarını araştırmışlardır. Bu algin yaşamını sürdürebilmesinin ortamdaki besleyicilere ve çoklu doymamış yağ asitleri, zeaksantin, astaksantin gibi pigmentler ve bazı değerli kimyasal bileşikler üretebilme kapasitesine bağlı olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Traubenberg ve Ah-Peng 2003 yılında ağır metallerin biyoindikatörü olarak kullanımı için *Fontinalis antipyretica* alginin klonal ırkının kültürü ve saflaştırılmasına ilişkin bir prosedür çalışması yapmışlardır. Çalışmanın sonunda metal biyoakümülatörü olarak kullanılabilen klonal ırkın sürekli bir kültürünü elde etmişlerdir.

Banerjee ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptıkları çalışmada *Botryococcus braunii* mikroalginin yüksek miktarda yenilenebilir hidrokarbon kaynağı olduğunu belirlemişlerdir. Söz konusu algin bu özelliğinin onun biyoteknolojinin farklı alanlarındaki çalışmalarda, hidrokarbon ve diğer bileşiklerin üretilmesinde kullanılabilir kıldığını ifade etmişlerdi.

Wiltshire ve arkadaşları 2000 yılında dayanıklı *S. obliquus* mikroalginden yağ asidi ve pigment elde etme etkinliği ile ilgili bir çalışma yapmışlardır. Kullandıkları ultrasound metodun daha önce aynı amaç için kullanılan metoda göre yağ asidi ve pigment eldesinde iki kat daha etkili olduğunu görmüşlerdir. Ayrıca bu metodun *Cryptomonas erosa* (*Cryptophyceae*), *Cyclotella meneghiniana*, *Staurastrum paradoxum* (*Bacillariophyceae*), *Microcystis aeruginosa* (*Cyanophyceae*) ve diğer pek çok alg için kullanılabilir olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Sanchez ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptıkları çalışmada *Isochrysis galbana* denizel mikroalginin kültür ortamlarına bağlı olarak biyokimyasal değişkenliğini ve biyokütlesel üretimini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda ortamdaki besinsel şartların uygun olmasıyla yüksek değerdeki kinetik parametreler arasında paralel bir ilişki bulunamamıştır. Bununla beraber Ukeles ortamında büyüme parametreleri ile hücre yoğunluğu arasında uyumlu bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir.

Fabregas ve arkadaşları 2000 yılında *Haematococcus pluvialis* alginin sürekli kültürü için optimum büyüme şartlarını araştırmışlardır. Bu çalışmada kendileri tarafından oluşturulan ortamda *Haematococcus pluvialis* mikroalginin en iyi üreme gösterdiğini ve en çok astaksantin miktarının elde edilebileceğini ortaya koymuşlardır.

Bates ve arkadaşlarının 1982 yılında yapmış oldukları çalışmada yarı sürekli kültürlerdeki *Chlamydomonas varzabius* ve *Scenedesmus subspicatus* taksonlarının çinko adsorpsiyonu ve taşınımını araştırmışlardır. Her iki alg türü için de, EDTA ekstraksiyonundan sonra hücre içindeki taşınabilir çinko miktarını işlemsel olarak belirlemişlerdir. Metal alımının ortamdaki serbest iyonik çinko miktarıyla doğrusal bir ilişkide olduğunu bulmuşlardır.

Ohki ve Fujita, 1982 yılında yaptıkları çalışmada pelajik mavi-yeşil alglerden olan *Trichodesmium thiebautii* mikroalginin unialgal kültürü için gerekli olan şartları araştırmışlardır.

Nakiboğlu ve Sevindir 2006 yılında, deri endüstrisi atık sularından kromun çeşitli alglerle biyosorpsiyonunu konu alan bir çalışma yapmışlardır. Çalışma sürecinde deri endüstrisi atıksularında bulunan Cr (VI) ağır metal iyonlarının, *Scenedesmus obliquus* ve *Chlorella* sp. ile maksimum biyosorpsiyon kapasiteleri araştırılmış ve maksimum biyosorpsiyon kapasiteyi sağlayacak reaktör işletme koşulları (optimum karıştırma süresi, optimum karıştırma hızı, optimum pH, optimum sıcaklık, optimum alg dozajı) belirlenmiştir.

Göksan ve Gökpınar'ın 2005 yılında *Haematococcus pluvialis* mikroalginin farklı ışık şiddetlerinde vejetatif büyüme özelliklerini araştırmışlardır. Beş farklı ışık şiddetinin uygulandığı denemede hücrelerin vejetatif safhada kültür edilebilmesi için optimal ışık şiddeti aralığı 50-200  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{sn}^{-1}$  olarak bulunmuş ve en iyi büyüme 200  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{sn}^{-1}$  lik ışık şiddetinde gerçekleştiği gözlenmiştir.

Ekonomik olarak yararlanılan mikroalglerin yanında makro alglerle de yapılan pek çok çalışma mevcuttur. Bunlardan bazı şöyle sıralanabilir.

Fırat ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları çalışmada *Caulerpa rasemosa* alginin biyokimyasal içeriği mevcuttur. Bunlardan bazıları evsimsel olarak belirlemişlerdir. Analiz sonuçlarında toplam su miktarı %92.75-95.93, ham protein %12.94-20.18, inorganik madde (kül) %8.02-19.50 ve suda eriyebilir karbonhidrat 0.65-1.11 mg/100ml olduğu saptanmıştır.

Burtin 2003 yılında deniz alglerinin biyokimyasal yapısı, besinsel değeri ve bu alglerin yapısında bulunan alginik asit, karragen ve agar gibi fikokolloidal maddelerin kullanım alanlarıyla ilgili çalışmaları derlemiştir.

## BÖLÜM 3

## MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada Ergene Havzası'ndaki (Trakya) Kaşıklı Göleti'nden arazi çalışmaları sırasında Türkiye için yeni kayıt olarak belirlenen ve Ege Üniversitesi Bilimsel-Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (EBİLTEM) bünyesindeki Ege Üniversitesi Mikroalg Kültür Koleksiyonuna gönderildikten sonra, Ege-MACC63 katalog numarası verilen *Tetracystis isobilateralis* R.M.Brown &H.C. Bold taksonu materyal olarak seçilmiştir.

**3.1. Mikroorganizmanın Özellikleri**

*Tetracystis isobilateralis* taksonu ilk kez 1964 yılında, R.M. Brown ve H.C. Bold tarafından Texas'da tatlı sularda ve nemli toprakta yaptıkları floristik çalışma sonucunda tespit etmişlerdir (Guiry ve Guiry, 2010). *Tetracystis isobilateralis* mikroalginin genç hücreleri elipsoidal, yaşlı vegetatif hücreler yuvarlak veya yuvarlağa yakın, 18-19 µm çapında, 2'li (diad) veya 4'lü (tetrad) hücreler formundadır. Kloroplast; bir tane, bazen benekli yapıda, hemen hemen bütün hücre lümenini kaplayabilir büyüklüktedir. Prenoid; kloroplastın merkezinde, bir tane, çok sayıda nişasta tanesi tarafından sarılmış ve düzensiz şekillidir. Mitokondriler silindirik, büyük, şerit benzeri ve sık şekilde dallanmıştır (Czerwik-Marcinkowska ve Mrozinska, 2009).

*Tetracystis isobilateralis* taksonunun canlı sistematigindeki yeri ve taksonomik grupları aşağıda belirtilmiştir.

**Empire:** Eukaryota

**Kingdom:** Plantae

**Subkingdom:** Viridiaeplantae

**Phylum:** Chlorophycophyta

**Class:** Chlorophyceae

**Order:** Chlorococcales

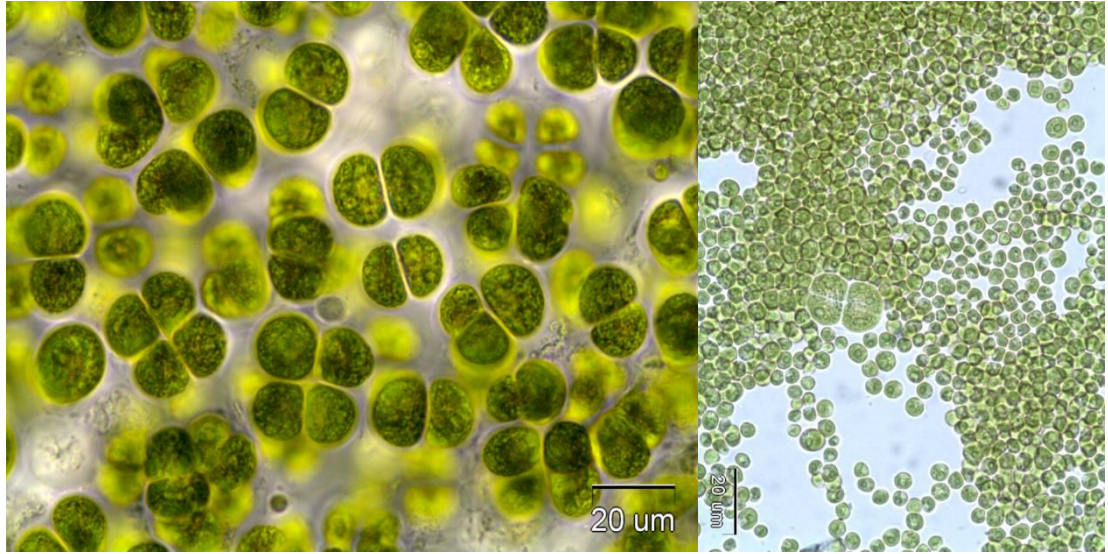
**Family:** Chlorococcaceae

**Genus:** *Tetracystis*

**species:** *isobilateralis*

### 3.2. Mikroorganizmanın Elde Edilmesi

Mikroalgal biyoteknoloji alanında yapılmış literatür taramaları sonucunda *Tetracystis isobilateralis* türünün kültürü, biyokimyası ve ağır metal absorplama kapasitesi gibi çalışmaların yapılmadığı saptanmıştır. Tezin konusunu oluşturan bu çalışmaların yapılabilmesi için gerekli olan mikroalg Ege Üniversitesi Bilimsel-Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (EBİLTEM) bünyesindeki Ege Üniversitesi Mikroalg Kültür Koleksiyonundan, Ege-MACC63 katalog numarası ile temin edildi.



Şekil 1. *Tetracystis isobilateralis* mikroalginin hücre ve zoosporları.

### 3.3. Kültür Deneyleri (Optimum Sıvı Nutrient Ortamının Saptanması)

Mikroalg kültürünün büyüme şartlarının ve uygun kültür ortamının belirlenebilmesi için daha önce değişik bilim adamlarınca yapılmış kültür çalışmalarından ve mikroalg kültür koleksiyonlarından yararlanıldı. Tatlısulara yayılış gösteren *Chlorococcales* üyelerinin iyi gelişme gösterdiği, aynı zamanda bütün mikroalglerin gelişimi için hemen hemen bütün besin tuzlarının bulunduğu, farklı pH değerlerine sahip Blue Green Medium (BG11), Bold's Basal Medium (BBM), Chu 10 Medium (Chu10), Modifield Bold's Basal Medium (B3N) dört medium belirlendi ve steril şartlarda hazırlandı (Çizelge 6).

Mikroalg için hazırlanan bu dört ortamın yanında, BBM baz alınarak azot ve fosfat içeriğinin değişik oranlardaki konsantrasyonuna sahip, Bizim (Our) Tetracystis Medium (OTM) adında, beşinci sıvı kültürü hazırlandı (Çizelge 6).

Çizelge 6. Sıvı kültür ortamlarının besin kompozisyonu (mg/L)

	BBM mg/L (Stein, 1973)	BG11 mg/L (Rippka ve ark., 1979)	Chu 10 mg/L (Belcher ve Swale, 1982).	B3N mg/L (McGurk, 1975)	OTM mg/L
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	20	20	-	-
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,39	0,39	-	0,39	0,008
NaSiO <sub>3</sub>	-	-	25	-	-
Na <sub>2</sub> EDTA	100	1	2	100	-
NaNO <sub>3</sub>	250	1500	-	750	500
NaCl	25	-	-	25	25
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	175	-	6	175	262,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	75	40	-	75	112,5
KOH	62	-	-	62	-
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	75	75	25	75	75
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	25	36	-	25	25
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	-	-	20	-	-
Citric Acid	-	6	-	-	-
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86	2,86	2,5	2,86	-
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4,98	-	-	4,98	-
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	-	1	-	0,194
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,222	0,222	-	0,222	-
ZnCl <sub>2</sub>	-	-	-	-	0,01
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,81	1,81	1,5	1,81	0,082
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,079	0,08	-	0,079	-
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	0,004
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0494	0,05	-	0,0494	-
Ammonium ferik-	-	6	-	-	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub>	-	-	1	-	-
Toprak su ekstratı	-	-	-	-	20ml
B12	-	-	0,01	-	-
Thiamine HCl	-	-	0,001	-	-
Biotin	-	-	0,001	-	-
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1ml	-	-	1ml	-
HCl	-	-	0,25ml	-	-
pH	7,1	7,5-8	6,5-7	6,7	8,7

Beş farklı sıvı kültür ortamı hazırlandıktan sonra, her birinden 1 (bir) L hacimlerde erlenmeyerlere aktarıldı (Şekil 2). Aşılama için kültür koleksiyonundan alınan tüp halindeki kültür kullanılarak steril şekilde her ortama  $4,5 \times 10^6$  hücre/ml yoğunluğunda aşılama yapıldı. Kültür ortamlarının her birine eşit sayıda hücrenin aktarılmasına dikkat edildi. 1'er litrelik aşılama sıvı kültürler, iklimlendirme dolabında  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de sıcaklıkta,  $200 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{sn}^{-1}$  ışık şiddetinde ve 12/12 (eşit gün) periyotunda aydınlanma koşullarında kültürleri yapıldı. Karışım ve havalandırma işlemi, 500ml/dak. havalandırma kapasitesine sahip akvaryum pompaları ile yapıldı.

Kültürlerin hücre yoğunlukları birinci günden itibaren takip edilerek, kültürün ölüm fazına girinceye kadarki süre içinde her iki günde bir, Thoma sayma kamarası kullanılarak üç tekrarlı şekilde sayıldı.

Bunun yanında, türün en iyi gelişme gösterdiği sıvı kültür ortamı belirlenirken kültürün besin durumunun nasıl değiştiğini görebilmek (anyon-kasyon değişimi) için her bir sıvı kültür ortamından her üç günde, 10 ml örnek alınarak  $0,45 \mu$  por açıklığındaki Whatman GF/C filtrelerle süzülerek ve ICP-AES cihazı ile analiz edildi.



Şekil 2. *Tetracystis isobilateralis* taksonunun beş farklı sıvı kültür ortamındaki görüntüsü.

### **3.4. Biyokütlenin Elde Edilmesi**

#### **3.4.1. Aşılama**

*T. isobilateralis* mikroalg biyokütlesinin eldesi için yapılan kültür çalışmalarında, aşılama olarak kullanılmak üzere, tüp içindeki unialgal stok kültürden, içinde OTM ortamı bulunan 250 ml'lik erlenlere aşılama yapıldı. Kültür, iklimlendirme dolabı kullanılarak  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de



sıcaklıkta, 200  $\mu\text{mol}$  foton  $\text{m}^{-2} \text{sn}^{-1}$  ışık şiddetinde ve 18/6 (Gündüz-Gece) uzun gün periyotunda aydınlanmanın sağlandığı ortam koşullarında tutuldu. Daha sonra aynı medium ve ortam koşullarında sırası ile önce 1 litrelik erlenlere, sonra 5 litrelik karboylara alındı enson olarak durağan faza ulaşmış olan 5 litrelik karboylar içindeki kültür 50 litre hacmindeki akvaryumlara aşılandı.

Mikroalgin büyük ölçekte kültürü için 50 litrelik cam akvaryumlar kullanıldı. Akvaryumlar içindeki steril haldeki OTM mediumları 500ml/dak havalandırma kapasitesine sahip akvaryum pompaları ile havalandırıldı ve karışmaları sağlandı. Laboratuar koşullarında gerçekleştirilebilecek en son hacme getirilen kültürün gelişimi iki günde bir kuru biomas ölçümü ile takip edildi.

### **3.4.2. Kültür Gelişimi**

Kültürün gelişiminin izlenmesi, kuru biokütle miktarının saptanması ile sağlanmıştır. Bunun için, iki günlük aralarla OTM kültür ortamından 20'şer mL mikroalg kültürü alındı. Daha önce 105°C'de 1 saat etüvde tutulmuş, desikatörde soğutulmuş ve darası alınmış 0,45 $\mu$  por açıklığındaki Whatman GF/C filtre kâğıtlarından, süzme düzeneği ve bir su trombu kullanılarak oluşturulan vakum yardımıyla süzüldü. Süzölmüş biomas üzerine HCl ile pH'ı 4'e ayarlanmış olan saf su dökülerek yıkandı. Süzölüp yıkanan mikroalg bioması petri kapları içerisinde 105 °C'ye getirilen etüvde 2 saat tutularak kurutuldu ve desikatöre konuldu. Oda sıcaklığına kadar soğumaları sağlandı ve daha sonra 0.0001 gr hassasiyetteki terazide tartımları yapıldı. Tartılan kuru biomas süzölen kültür hacmine oranlanarak 1 L içindeki biomas miktarları hesaplanarak, farklı kültür ortamlarındaki mikroalgin gelişim grafiği oluşturuldu. (Gökpınar ve Büyükişık, 1994).

### **3.4.3. Hasat**

Kültürün durgun faza geldiği 18. gün sonunda, kültür sona erdirildi ve hasat edildi. Hasat edilirken havalandırma kesilerek koagule (bir araya gelme) olan mikroalglerin yerçekimi ile çökmeleri beklendi. Çöken ve akvaryumun tabanında biriken yoğun kısım sifonlanarak 55 $\mu\text{m}$  por açıklığına sahip plankton bezleri ile süzüldü. Hasat edilen biomas 50 °C'deki vakumlu etüvde 3 saat kadar bekletilerek kurutuldu. Hiçbir şekilde su içermeyen kuru örnekler biyokimyasal analizlerde kullanmak üzere -20°C'de bekletildi. Elde edilen biyomasın bir kısmı kullanılarak biyokimyasal analizleri, yağ, yağ asitleri, protein, karbonhidrat, vitamin ve kül miktarları belirlendi.

Doygunluk fazına ulaşmış ama süzme işlemi yapılmamış akvaryumlarda ağır metal absorplama deneylerine devam edildi.

### **3.5. Biyokimyasal Analizler**

#### **3.5.1. Ham Protein Analizi**

Toplam ham protein, Kjeldahl metoduna (AOAC 2000) göre; yaş yakma, distilasyon, titrasyon şeklinde üç aşamada ve üç tekrarlı olarak yapıldı.

##### **3.5.1.1. Yaş Yakma**

Kurutulup toz haline getirilen *Tetracystis* örneğinden 0,5 gr tartılarak Khiydal tüplerine, kondu. Örneklerin bulunduğu tüplere Khiydal protein katalizör tableti ilave edildi. Üzerlerine 15'şer ml'lik %96'lık sülfirik asit eklendi ve tüpler yaş yakma ünitesine yerleştirildi. Örneklerin renkleri açık sarı-yeşil ya da renksiz oluncaya kadar, yaklaşık 2,5-3 saat yakma işlemi devam ettirildi. Yakma ünitesinden çıkarılan örnekler soğumaya bırakıldı. Sonra örneklerin üzerine 20 ml saf su eklendi ve distilasyon işlemine geçildi.

##### **3.5.1.2. Distilasyon**

250 ml lik erlenlere konan son örnek, daha önce hazırlanan borik asit çözeltisinden (1L suya 40 gr H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, sonra 7ml metil red bomoxal gren 10 ml) 25 ml ilave edilip distilasyon ünitesinin çıkışına yerleştirilmiş ve NaOH ile distilasyona tabi tutulmuştur. Distilasyon esnasında ortamda bulunan azotu ölçmek için ise bir kör örnek hazırlandı.

##### **3.5.1.3. Titrasyon**

Distilasyon işlemi sonunda erlende biriken destilat, 0,1 N HCl ile rengi pembe renge dönünceye kadar titre edilip sarfiyat belirlenmiştir.

Kör için 0,1 ml'lik HCl sarfiyatı olmuştur.

Üç tekrar sonunda ortaya çıkan değerler aşağıdaki eşitlikle hesaplandı ve ortalama alındı.

$$\%N = \frac{14,01 \times (A-B) \times M \times 100}{G \times 10}$$

$$G \times 10$$

$$\%Protein = \%N \times 6,25$$

A: Örnek için sarf edilen HCl miktarı

B: Kör için sarf edilen HCl miktarı

M: Asit molaritesi

g: Örnek miktarı

**3.5.2. Ham Yağ İçeriğinin Saptanması**

Kurutulan materyale ait örnekten 1 gr tartıldıktan sonra darası alınmış 250 ml'lik balon jojeye aktarıldı ve üzerine 2:1 oranında hazırlanmış metanol:kloroform karışımından 20 mL eklendi. Ağzı kapatılan örnek, oda sıcaklığında 15-20 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra oluşan homojen karışımdaki yağ fazını almak için 15 dakika santrifüj edildi (10000 rpm). Santrifüjden sonra falkon tüpleri içindeki karışıma % 0,9'luk 4mL NaCl çözeltisi eklendi. 1-2 dakika elle çalkalandıktan sonra tekrar santrifüjde düşük hızda (2000 rpm) santrifüj edildi. Bu işlemler sonrasında oluşan en üstteki faz küçük organik polar moleküllerle birlikte gangliositleri barındırmaktadır. Eğer istenirse saklanıp, diğer özel analizler için kullanılabilir. En üstteki gangliositli faz sifon edildi. Aşağıda kalan metanol:kloroform fazı örneğin toplam yağ miktarını tutmaktadır. Bu faz, daha önce darası alınmış 250 mL'lik balon jojelere sifonlanıp rotevaporatörde 60°C'de uçuruldu. Ekstraksiyon balonu içindeki metanol ve kloroform uçurulduktan sonra 103 °C etüvde 3 saat bekletildikten sonra desikatörde soğutulmuş ve hassas terazide (0,0001gr) tartılmıştır (Folch ve ark., 1956).

Toplam yağ miktarı aşağıdaki formülle hesaplanmıştır. Ham yağ miktarlarının tespiti için yapılan işlem üç defa tekrarlanmış olup, çıkan sonuçların ortalaması alınmıştır.

$$\text{Ham yağ miktarı (\%)} = [(t_s - t_i) / m] \times 100$$

m=Örnek ağırlığı

t<sub>i</sub>=Balon jojenin boş ağırlığı

t<sub>s</sub>=İşlemden sonra balon jojenin ve biriken yağın ağırlığı

**3.5.3. Yağ Asitleri Kompozisyonunun Belirlenmesi**

Örneklerin % yağ oranı hesaplandıktan sonra 250 mL'lik balon jojelerdeki örnekler esterleştirme işlemine tabi tutulmuştur. Önce 0,5 N metanolik NaOH (Merck)'tan 5mL ilave edildi, ve balon joje geri soğutucu ile su banyosuna yerleştirildi. Esterleştirme işlemi sırasında örneğin taşmaması amacıyla içine kaynama taşı atıldı. Örnekler su banyosunda kaynamaya başladıktan 15 dakika sonra soğutucunun üzerinden 5mL BF<sub>3</sub> reaktifi eklendi, 5 dakika daha kaynatıldı ve 2mL n-heptan ilave edilerek 1 dakika daha kaynatıldı. Örnek, soğutucudan çıkarıldıktan sonra 25mL'lik balon jojeye aktarıldı ve soğuduktan sonra oda sıcaklığında üzerine doymuş tuz çözeltisi ilave edildi. Böylece balon jojede iki faz oluştu. Üstteki heptan fazından mikropipetle 1-2 mL deney tüpüne alınarak analiz için saklandı (IUPAC, 1987). Yağ asidi analizleri Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda GS-MS aleti ile yapıldı.

**3.5.4. Ham Kül İçeriğinin Saptanması**

Kurutulan maddelerin kül miktarları standart yöntemle uygun olarak yapılmıştır (AOAC, 2000). Analizlerde kullanılan porselen krozelerin hassas terazide daraları alınmıştır. Darası alınmış porselen krozeler içinde 0,5 gram örnek koyularak 525 °C'deki kül fırınında 12 saat süreyle yakılmıştır. Daha sonra örneklerin bulunduğu krozeler desikatörde soğutulularak hassas terazide tartımları yapılmıştır. Örneklerdeki kül miktarları % olarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Ham kül içeriği(\%)} = [(t_s - t_i) / m] \times 100$$

m=örnek ağırlığı

t<sub>i</sub>=krozenin boş ağırlığı

t<sub>s</sub>=işlemden sonra krozenin ve biriken külün ağırlığı

(Ham kül miktarlarının tespiti için yapılan işlem üç defa tekrarlandı ve çıkan sonuçların ortalaması alındı).

**3.5.5. Nitrojensiz Öz Madde Miktarı**

Nitrojensiz öz madde miktarı, selüloz ve karbonhidrat içeriği olarak bilinmektedir. Analizlerde kuru madde ağırlığından elde edilen ham protein, yağ ve ham kül miktarı bulunduktan sonra geri kalan madde miktarı nitrojensiz öz madde miktarını vermektedir ve aşağıdaki formülle hesaplanır (Akyıldız, 1984).

$$\text{Nitrojensiz Öz Madde Miktarı (\%)} = 100 - (\text{protein miktarı} + \text{kül miktarı} + \text{yağ miktarı})$$

**3.5.6. A ve E Vitamini Miktarının Saptanması**

Kurutulan ve toz haline getirilen materyalden 2 gr tartıldı, 250 mL'lik amberli balon jøjeye aktarıldı. Balon jojenin içine sırasıyla 0,5 gr askorbik asit, 10 mL etanol absulit ve % 60 lık KOH karışımından 20 ml eklenmiştir. Sonra ağzı kapatılan jöje oda sıcaklığında 24 saat düşük hızda manyetik karıştırıcıyla karıştırıldı. Daha sonra karışım 250 mL'lik amberli ayırma hunisine aktarıldı. Ayırma hunisindeki karışım 10 mL saf su ilave edilerek yıkandı. Yıkamadan sonra huni, birkaç kere olmak üzere 15'er mL n-hekzan ile ekstre edildi. Her ekstrasyon en az 2 dakika olmak şartıyla çalkalandı ve ayırma hunisinde oluşan hekzan fazı sifon edildi. Sifon edilen hekzan fazı içinde yağla birlikte yağda çözünen vitamin ihtiva etmektedir (Hurtado, 1997). Alınan hekzan fazındaki vitamin analizleri Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Su Ürünleri laboratuvarlarında bulunan HPLC cihazı ile yapıldı.

**3.6. Ağır Metallerin Absorplama Miktarlarının Belirlenmesi**

Kültür şartları ve mediumu belirlenen algin canlı haldeyken Co (II), Cd (II), Pb (II), Zn (II) ve Mn (II) metal iyonlarını absorplama miktarları tespit edildi. Mikroalgin belirlenen en iyi üreme gösterdiği OTM kültür ortamında, 8,7 pH'da ve oda sıcaklığında kültürleri yapıldı. Exponential fazın sonuna ulaşmış durgun faza giren  $30,1 \times 10^6$  ml/hücre (kuru ağırlığı 0,462 gr/L) yoğunluğundaki canlı kültür, 500 mL hacimli erlenlere kondu. Kültür ortamının pH değeri 1N HCl ile 6,5 e ayarlandı.  $CdCl_2 \cdot 2,5H_2O$ ,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $PbCl_2$ ,  $ZnCl_2$  ve  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  tuzlarından stok solüsyonlar hazırlandı ve ayrı ayrı mikroalg kültürü ortamı içine her bir metal iyonlarının üç farklı konsantrasyonları (5, 20 ve 40 ppm) olacak şekilde eklendi. 0-10-30-60-120-720 ve 1440 dakikalarda kültürden örnek alınıp  $0,45 \mu$  açıklıktaki Whatman GF/C filtrelerden süzülür ve analizler için depolandı. Sorpsiyon miktarlarının belirlenmesi için analizler Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi merkez laboratuvarındaki ICP-AES cihazı kullanılarak ağır metallerin absorpsiyon miktarları tespit edildi.

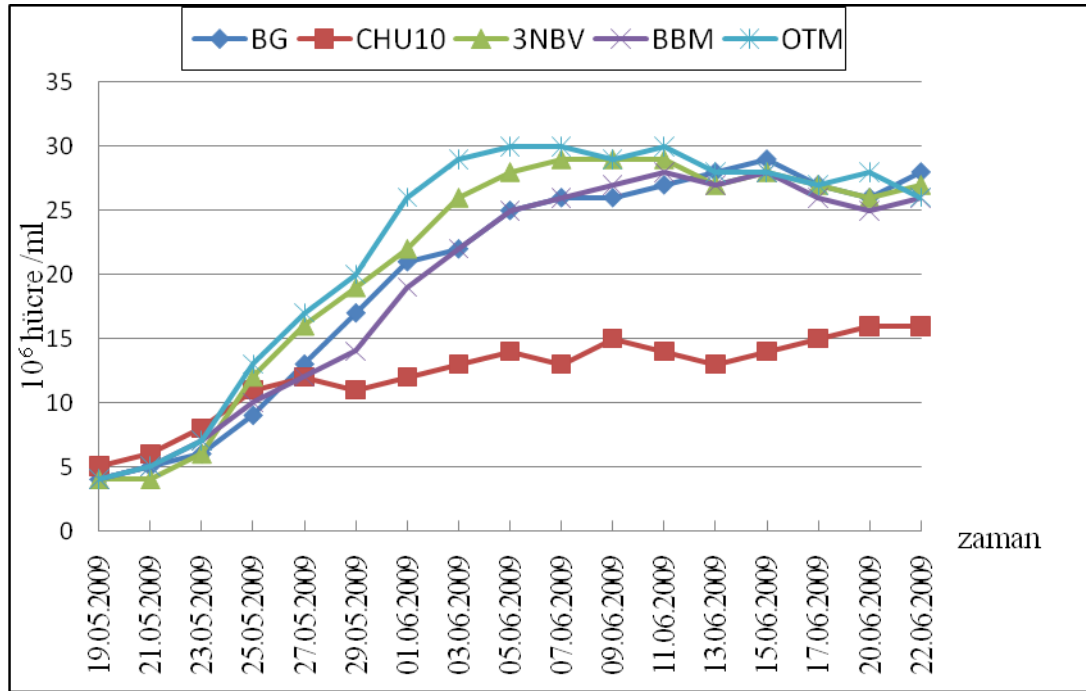
## BÖLÜM 4

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada kendi belirlediğimiz ve çalışılan taksonun maksimum büyüme gösterdiği ortamda (OTM) kültüre alınan *Tetracystis isobilateralis* taksonunda hücre yoğunluğu, toplam ham yağ, toplam ham protein, nitrojensiz öz madde, toplam kül miktarları, yağ asitleri, anyon-katyon değerleri, vitamin, betakaroten miktarları ve ağır metal absorpsiyonu araştırılmıştır.

## 4.1.Hücre Yoğunluğu

Çalışılan taksonun maksimum büyüme koşullarını belirlemek amacıyla BG11, CHU10, B3N, BBM ve OTM ortamları kullanılmıştır. Belirlenen hücre yoğunluklarına ait değerler şekil 4' te verilmiştir.



Şekil 3. *Tetracystis isobilateralis* taksonunun farklı kültür ortamlarında ulaştığı hücre yoğunluğu.

Mikroalgal biyoteknolojik çalışmalarda en çok kullanılan mikroalg türlerinden olan *Haematococcus pluvialis* taksonunun BG11 ortamında, 200 µmol foton ışıkta en yüksek  $19,73 \times 10^4$  hücre  $ml^{-1}$  yoğunluğa (Göksan ve Gökpınar, 2005), *Spirulina platensis* türünün Zarruok ortamında bir günde 2,7 gr/L yoğunluğa (Volkman ve ark., 2008), *Chlorella*

*ellipsoidea* türünün BBM ortamında  $85,9 \times 10^6$  hücre/mL yoğunluğa (Toyub ve ark., 2007), *Dunaliella salina* türünün Walne+NaCl ortamında  $245 \times 10^5$  hücre/mL yoğunluğa (Mendoza ve ark., 2008) ulaştığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmada ise daha önce hiç çalışılmamış olan *Tetracystis isobilateralis* taksonu klasik mikroalg kültür ortamlarında kültüre edildi ve B3N'de ortalama  $28,5 \times 10^6$  hücre/mL, BBM'de ortalama  $28 \times 10^6$  hücre/mL, BG11'de ortalama  $29 \times 10^6$  hücre/mL, Chu10'da ortalama hücre/mL yoğunluğa ulaştığı gözlemlendi. Bu ortamlara alternatif olarak hazırladığımız OTM ortamında *Tetracystis isobilateralis* taksonunun hücre yoğunluğunun en iyi olduğu ortaya konmuştur.

Çalışılan örnek OTM ortamında, 8,7 pH değerinde,  $24 \pm 2$  °C'de ve sıcaklıkta, 200  $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{sn}^{-1}$  ışık şiddetinde ve 12/12 (eşit gün) periyotunda aydınlanma koşullarında ve 500 ml/dak. havalandırma şartlarında  $30,1 \times 10^6$  ml/hücre yoğunluğuna ulaşmıştır. Bu yoğunluğa ulaşan kültürün kuru ağırlığı 0,462 gr/L olarak ölçülmüştür. Kültür gelişiminde en iyi yoğunluk 18. günde gözlenmiştir. Kültür 15-21 günler arasında durgunluk fazına girmiş ve bundan sonraki günlerde kültür ölüm fazına girerek hücre sayısı azalmaya başlamıştır.

Tüm bu veriler değerlendirildiğinde; *T. isobilateralis* taksonunun belirlenen kültür ortamında, ticari önemi olduğu düşünülen ve biyoteknolojik çalışmalarda sıklıkla kullanılan mikroalg türleri kadar hücre yoğunluğuna ulaştığı saptanmıştır.

#### **4.2. Toplam Ham Yağ, Toplam Ham Protein, Nitrojensiz Öz Madde, Ve Toplam Kül Miktarları**

OTM'de ve verilen şartlar altında kültürü yapılan algin içeriğindeki besinsel maddeler araştırılmış ve sonuçlar çizelge 7'de verilmiştir.

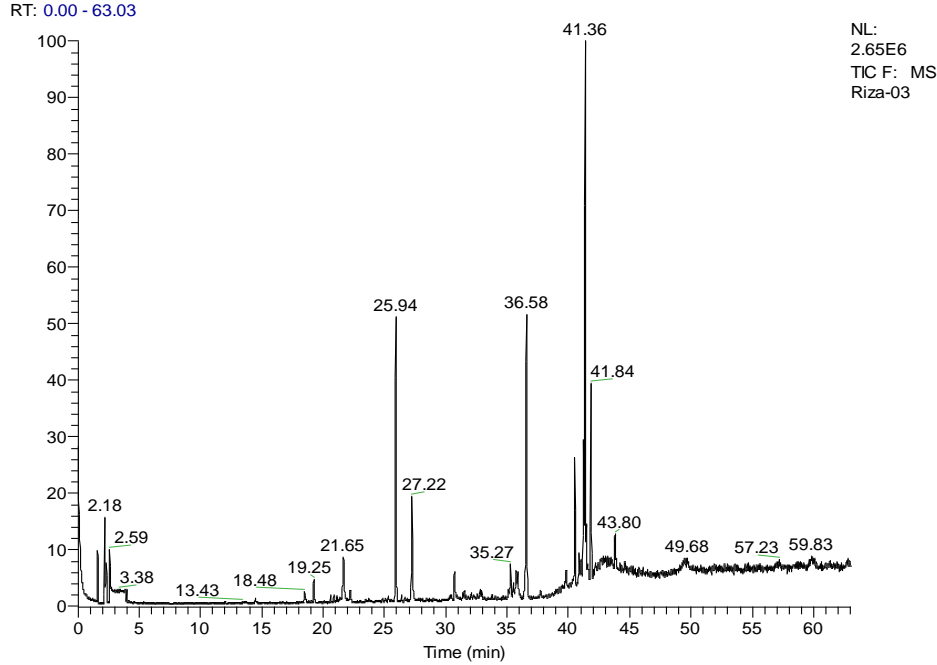
Çizelge 7. *Tetracystis isobilateralis* mikroalginin toplam ham yağ, toplam ham protein, nitrojensiz öz madde ve toplam kül miktarları

Toplam Protein	Toplam Yağ	Nitrojensiz öz madde	Toplam kül
%38,73	%16,37	%29,32	%15,58

Çizelge 7 ve çizelge 1 incelendiğinde; çalışması yapılan algin, besinsel değerinin (toplam protein, toplam yağ, nitrojensiz öz madde miktarı) insan ve hayvanlar tarafından sıklıkla tüketilen pek çok besin maddesine ve yoğun kültürleri yapılan çoğu mikroalge göre daha fazla ticari öneme sahip olduğu görülmektedir.

### 4.3.Yağ Asitleri

GC-MS cihazından alınan spektrumdaki piklerden çıkartılabilen ve aydınlatılabilen yağ asidi çeşidi 4 adettir (Şekil 5).



Şekil 4. *Tetracystis isobilateralis* yağ asitleri GC-MS spektrumu.

Çizelge 8. Yağ asidi çeşitlerinin toplam yağ asidine bağlı yüzdesel oranları

Yağ asidi metil esterleri	Formül	Oil type	Mw	İntensity	RT	%
Palmitik	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	16:0	270	8169831	36.58	40,9985
Linoleik	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	18:2 n-6	294	1287990	41.22	6,4634
Oleik	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	18:1 n-9	296	7153086	41.36	35,8961
Stearic	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	18:0	298	3316240	41.84	16,6418

Mikroalgler yapılarında çok çeşitli ve değerli yağ asitlerini bulundurlar. *Parietochloris incisa*, türü yağ asitleri çeşidi bakımından en zengin bitkisel organizmalar arasındadır (Cohen, ve ark., 2002). Yağ elde etme amacıyla yoğun kültürleri yapılan aşağıdaki listede belirtilen makro ve mikro algler en fazla yağ asiti çeşitleri ve miktarlarını bulunduran türler olarak da göze çarpmaktadır. OTM'de ve belirtilen şartlarda kültürü yapılan taksonun içeriğindeki palmitik asit miktarı %40,99, oleik yağ asiti miktarı %35,89, stearik asit miktarı ise %16,64 oranı, daha önce araştırması yapılan çizelge 9'daki alglerin



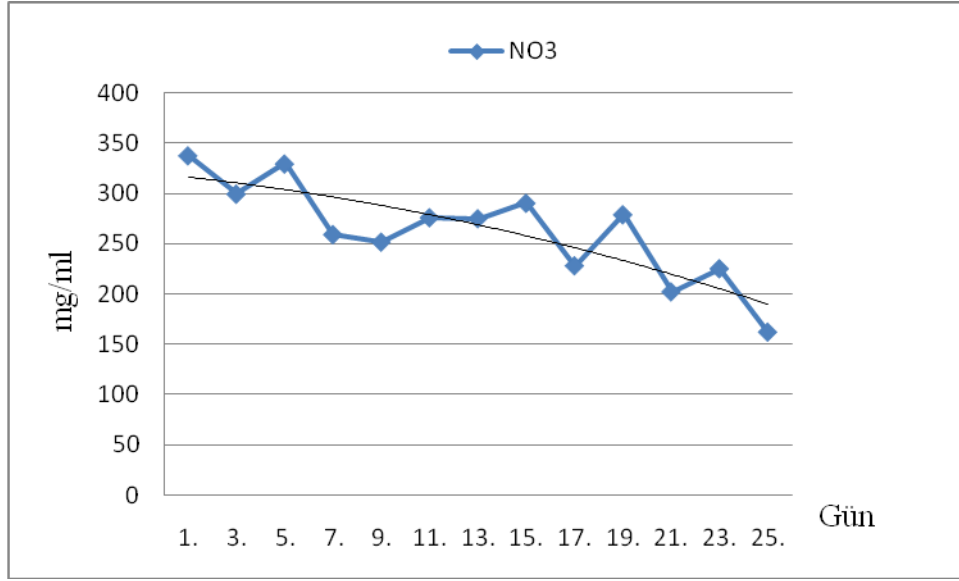
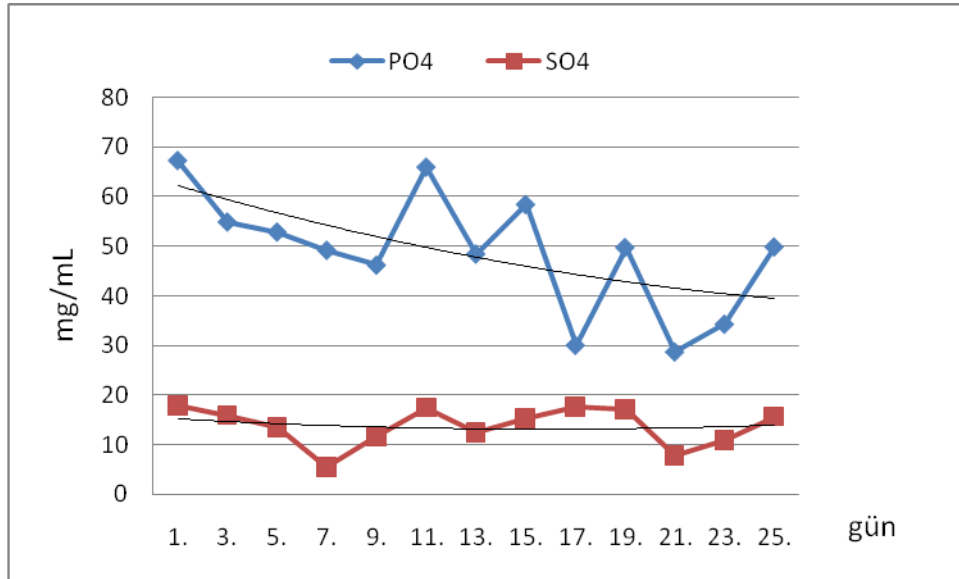
sahip olduğu miktarlardan daha fazladır. Yağ asidi kompozisyonu fazla çeşitlilik göstermemekle birlikte toplam yağ miktarı %16,37 olarak tespit edilmiştir. Bu değer, mikroalgin besin olarak kullanılabilmesini ayrıca ticari amaçla yoğun kültürleri yapılarak yağ eldesinde kullanılabilmesini göstermektedir. Alglerdeki yağ asidi kompozisyonuna ait makro ve mikralglerle yapılmış çalışmalardan elde edilen veriler çizelge 9’da verilmiştir.

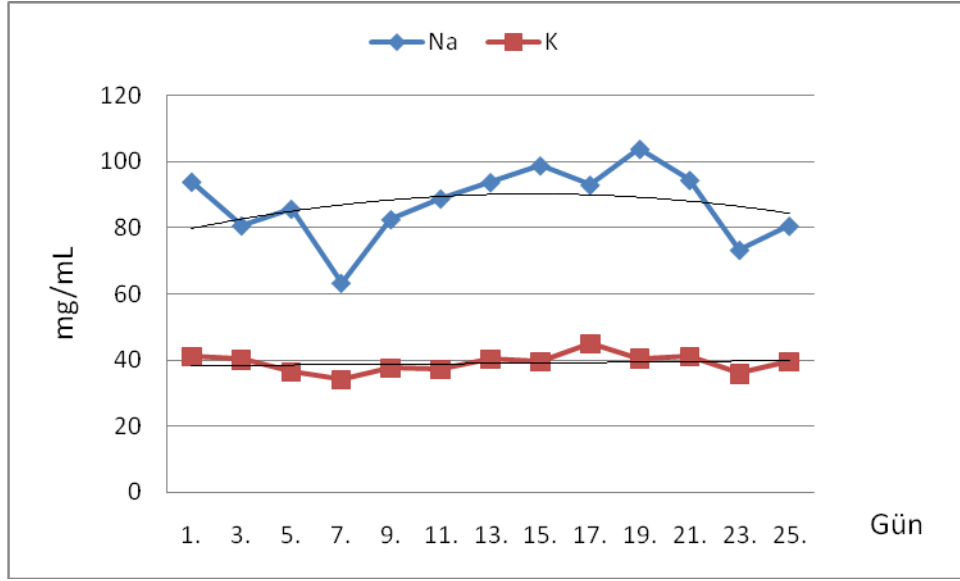
Çizelge 9. Bazı mikro ve makro alglerde yağ asitleri kompozisyonu (Cohen, ve ark. 2002)

Algler	Ana yağ asitleri %													
	14:0	16:0	16:1	16:2	16:3	18:0	18:1	18:2	18:3 ω6	18:3 ω3	18:4 ω3	20:4 ω6	20:5 ω3	22:6 ω3
<i>Bacillariophyceae</i>														
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	15	10	29	5	6	-	-	1	-	-	-	14	15	-
<i>Chlorophyceae</i>														
<i>Parietochloris incisa</i>	-	10	2	1	1	3	16	17	1	2	-	43	1	-
<i>Dinophyceae</i>														
<i>Amphidinium carteri</i>	2	12	1	2	-	2	2	1	3	-	19	20	-	24
<i>Phaeophyceae</i>														
<i>Desmarestia acculeata</i>	4	12	2	-	-	-	7	6	10	2	16	19	19	-
<i>Dictyopteris membranacea</i>	6	20	1	-	-	2	14	14	11	2	11	11	9	-
<i>Ectocarpus fasciculatus</i>	2	17	-	-	-	1	13	4	15	1	23	11	13	-
<i>Prasinophyceae</i>														
<i>Ochromonas danica</i>	13	4	-	-	-	3	7	26	12	7	7	8	-	-
<i>Rhodophyceae</i>														
<i>Gracilaria confervoides</i>	8	18	3	-	-	1	16	2	-	1	1	46	-	-
<i>Phycodrys sinuosa</i>	5	22	5	2	1	3	5	1	1	-	-	44	2	-
<i>Porphyridium cruentum</i>	-	34	1	-	-	1	2	12	-	1	-	40	7	-

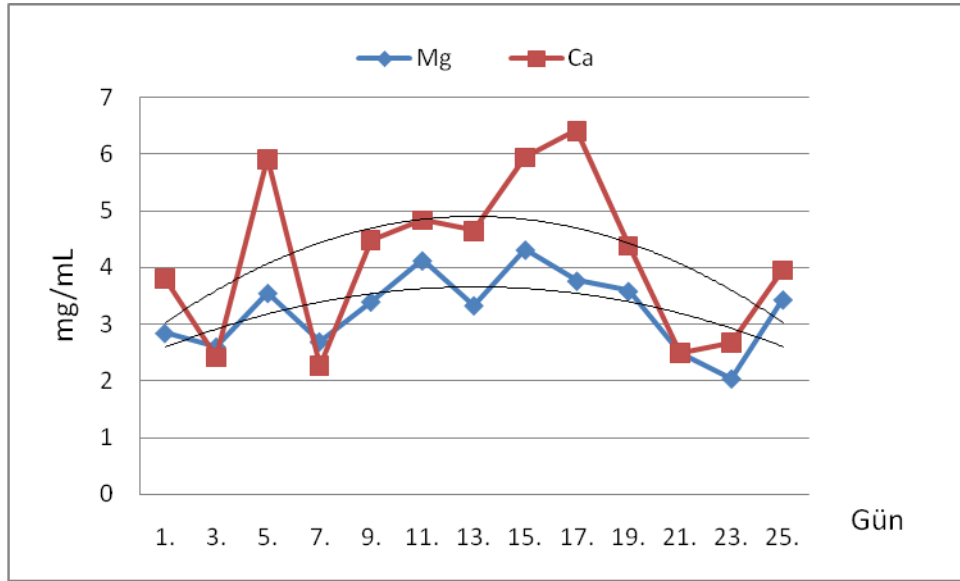
#### 4.4.Kültür Ortamındaki Anyon ve Katyon Değerleri

Çalışılan mikroalgin en iyi üreme gösterdiği nütrient ortamının belirlenmesi için yapılan kültür çalışmalarında, beş farklı sıvı ortama eklenen besleyici tuzların kimyasal, fiziksel ve biyolojik etkileşimler sürecinde miktarlarında meydana gelen değişim aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir (Şekil 6-22).

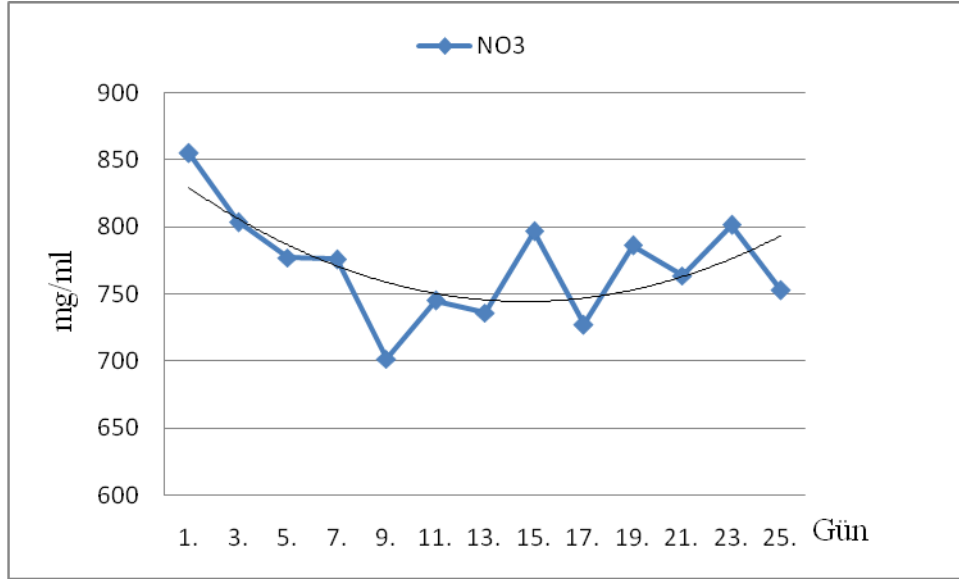
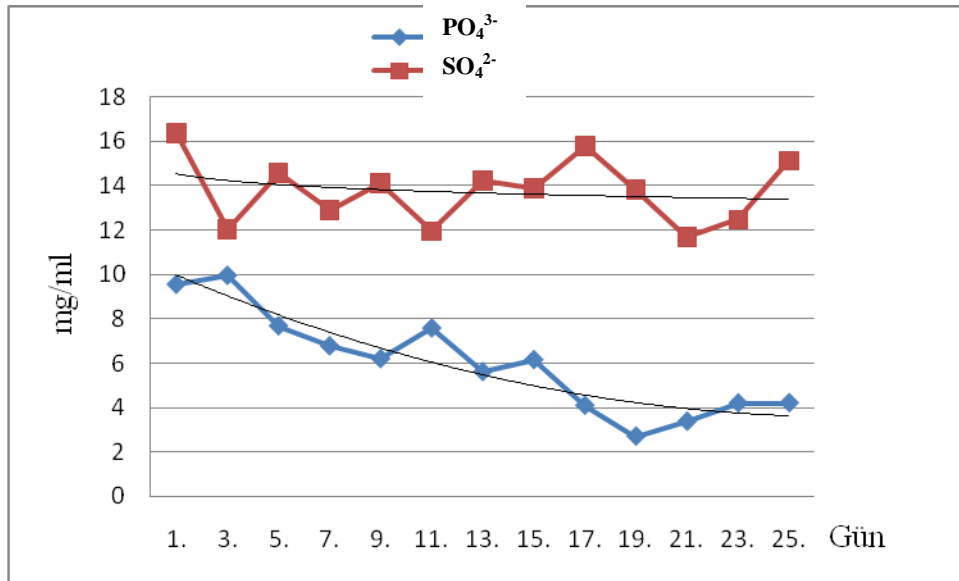
Şekil 5. B3N ortamındaki NO<sub>3</sub><sup>-</sup> analiz grafiği.Şekil 6. B3N ortamındaki PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> ve SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> analiz grafiği.

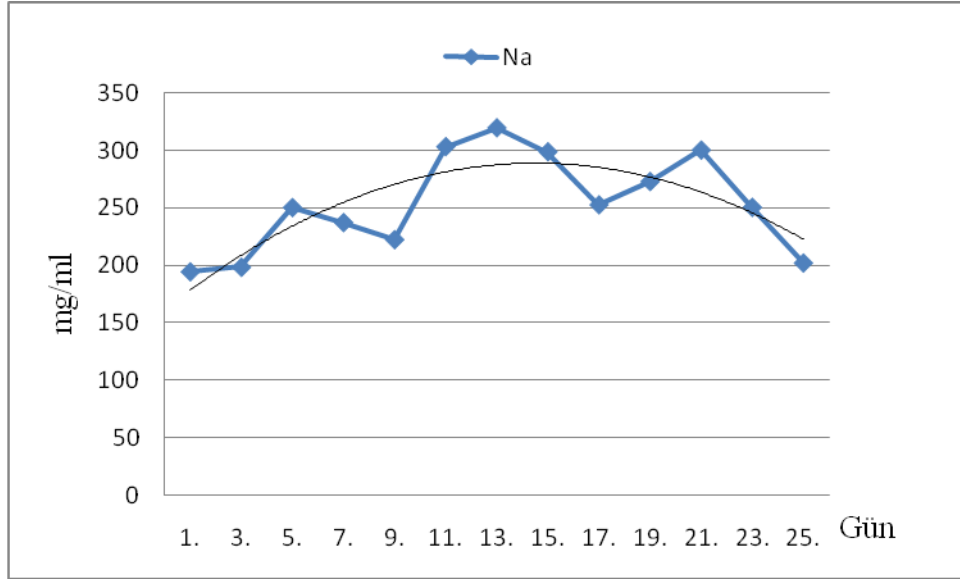


Şekil 7. B3N ortamındaki Na<sup>+</sup> ve K<sup>+</sup> analiz grafiği.

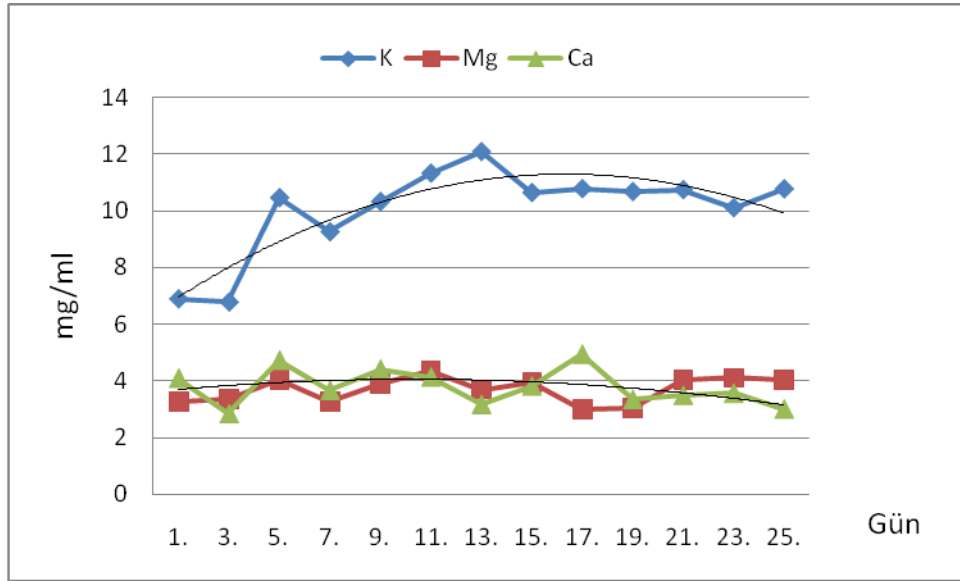


Şekil 8. B3N ortamındaki Mg<sup>2+</sup> ve Ca<sup>2+</sup> analiz grafiği.

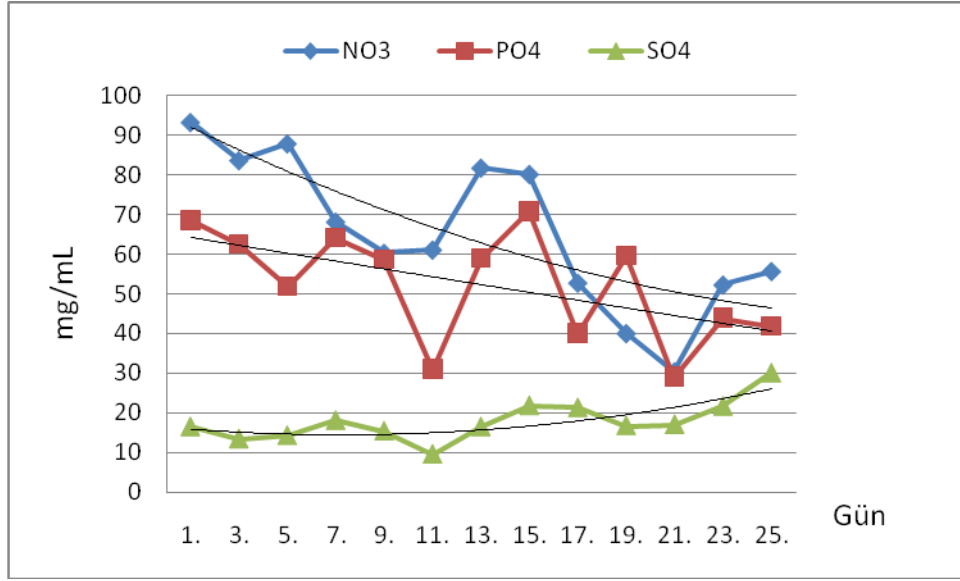
Şekil 9. BG11 ortamındaki NO<sub>3</sub><sup>-</sup> analiz grafiği.Şekil 10. BG11 ortamındaki PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> ve SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> analiz grafiği.



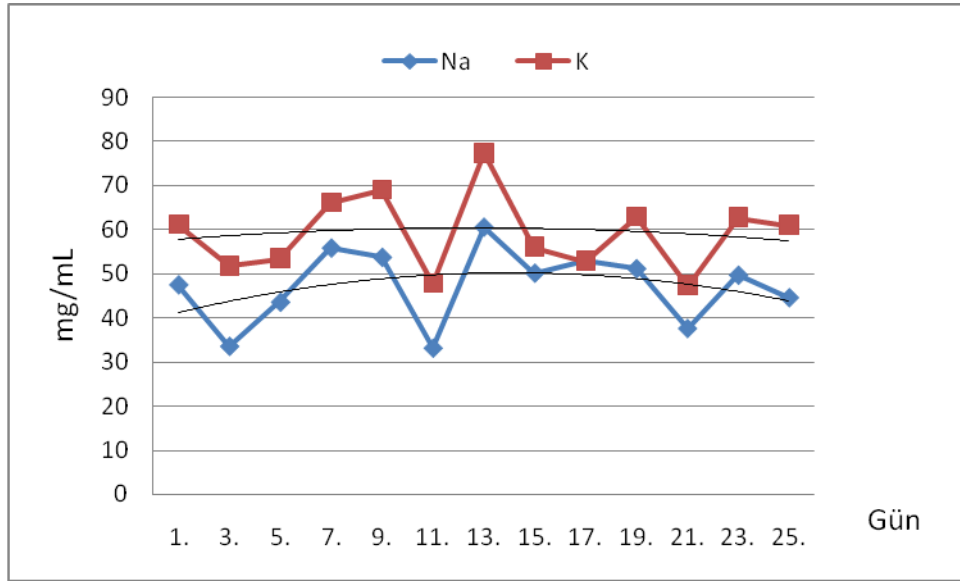
Şekil 11. BG11 ortamındaki Na<sup>+</sup> analiz grafiği.



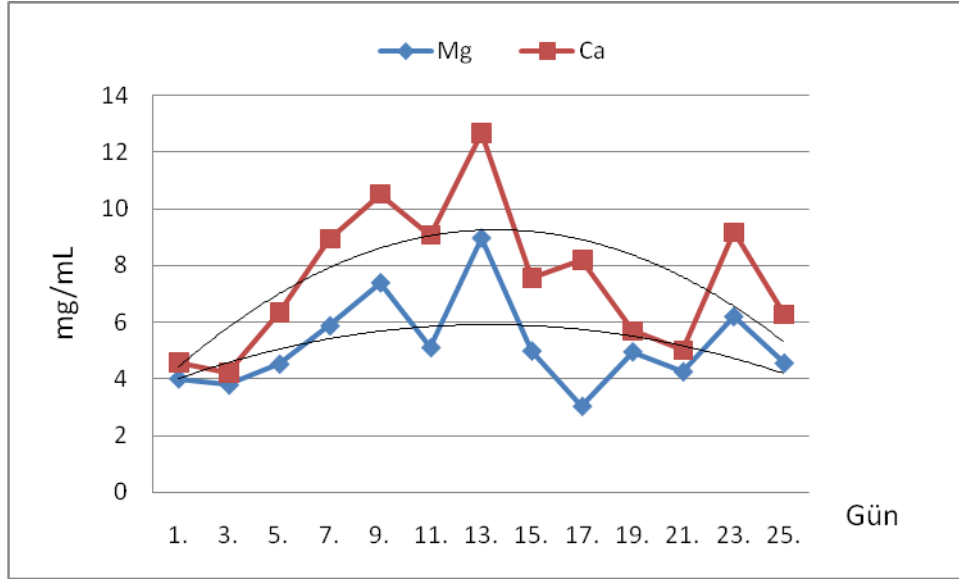
Şekil 12. BG11 ortamındaki K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> ve Ca<sup>2+</sup> analiz grafiği.



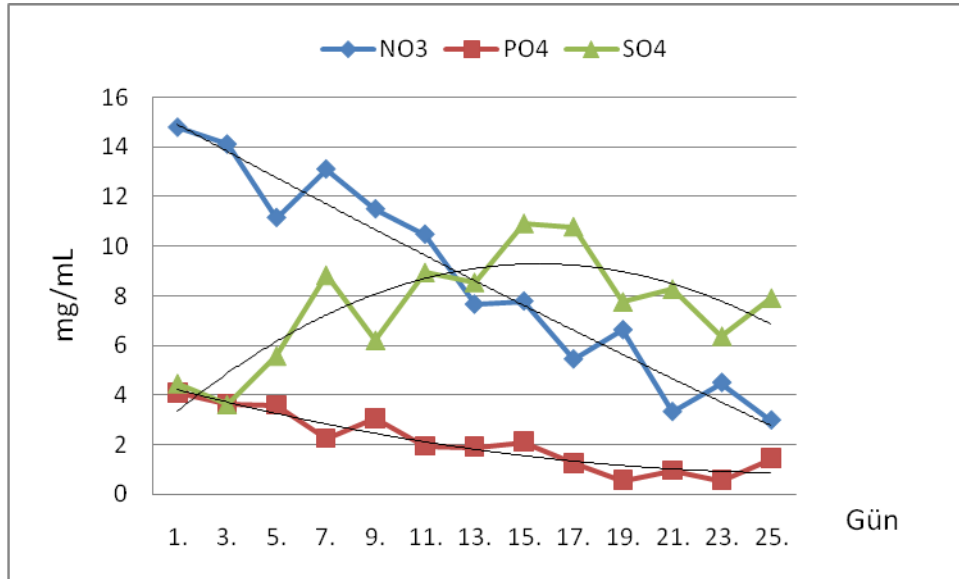
Şekil 13. Bold Basal ortamındaki  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , ve  $\text{SO}_4^{2-}$  analiz grafiği.



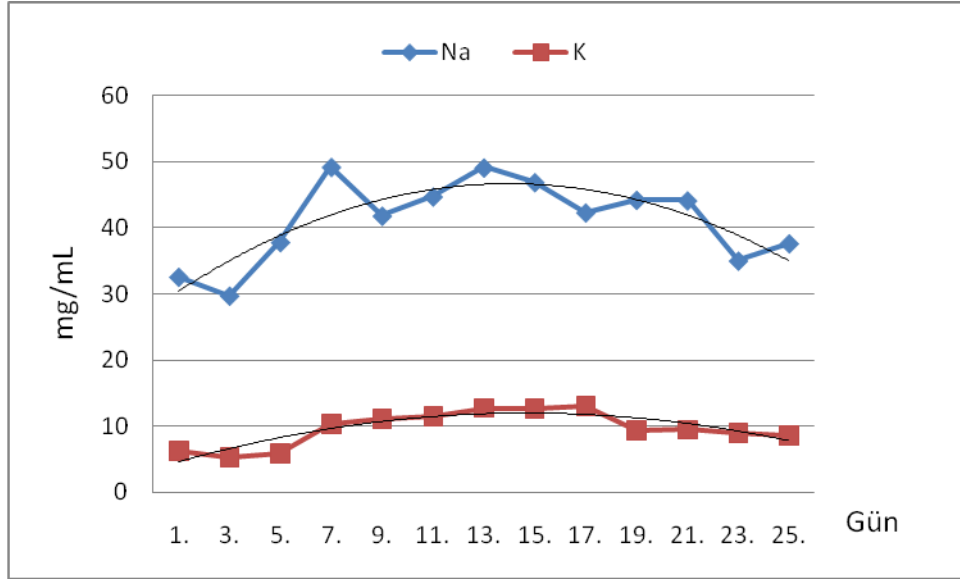
Şekil 14. Bold Basal ortamındaki  $\text{Na}^+$  ve  $\text{K}^+$  analiz grafiği.



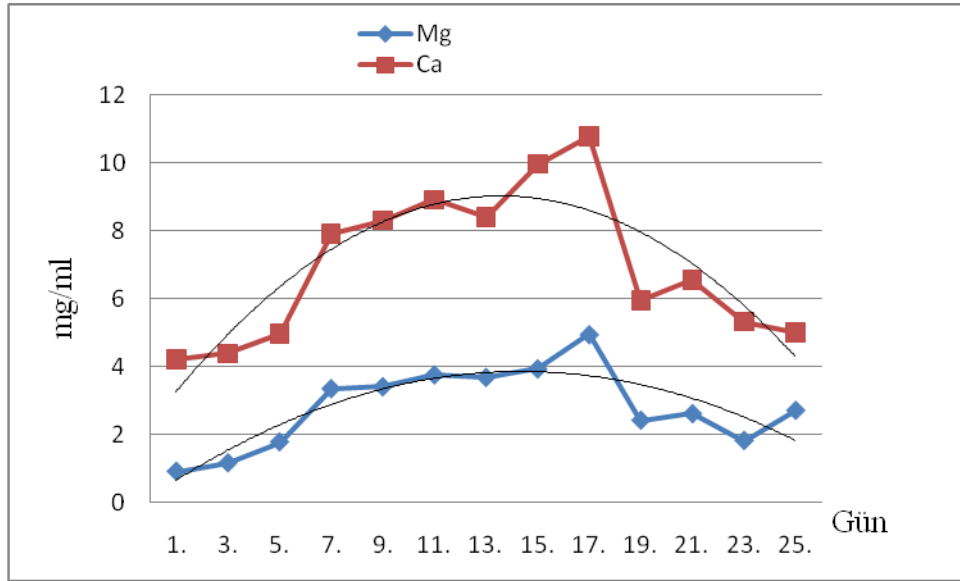
Şekil 15. Bold Basal ortamındaki  $Mg^{2+}$  ve  $Ca^{2+}$  analiz grafiği.



Şekil 16. Chu 10 ortamındaki  $NO_3^-$ ,  $PO_4^{3-}$ , ve  $SO_4^{2-}$  analiz grafiği.

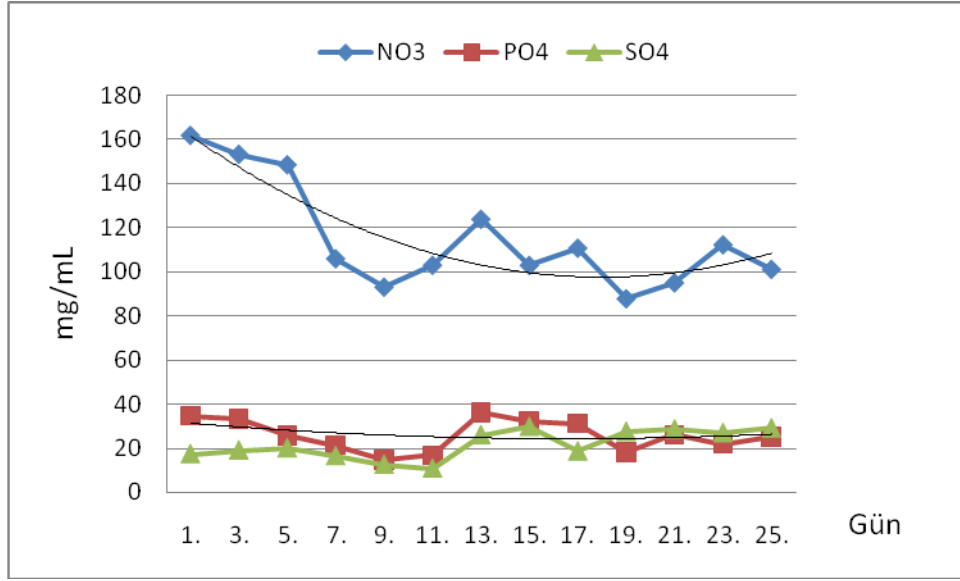


Şekil 17. Chu 10 ortamındaki Na<sup>+</sup> ve K<sup>+</sup> analiz grafiği.

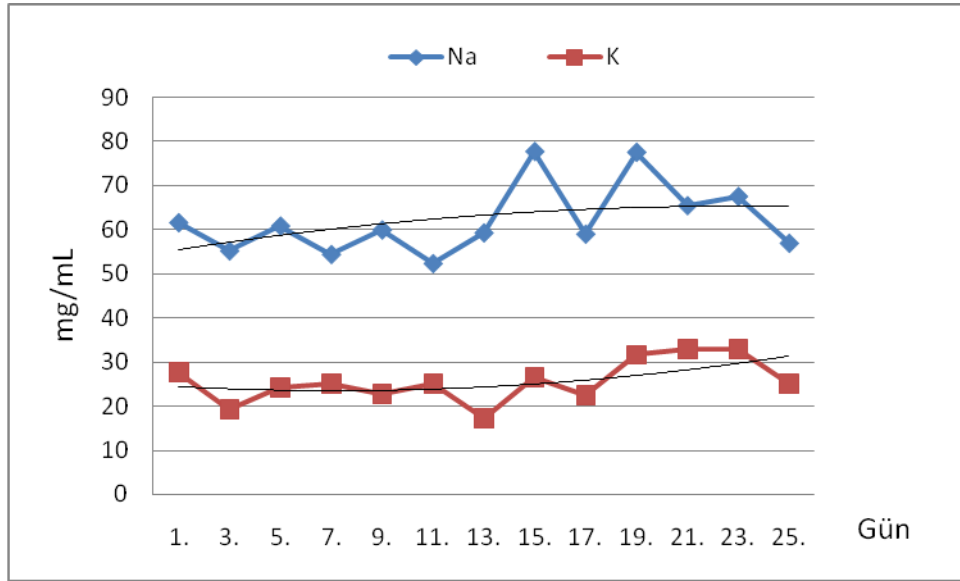


Şekil 18. Chu 10 ortamındaki Mg<sup>2+</sup> ve Ca<sup>2+</sup> analiz grafiği.

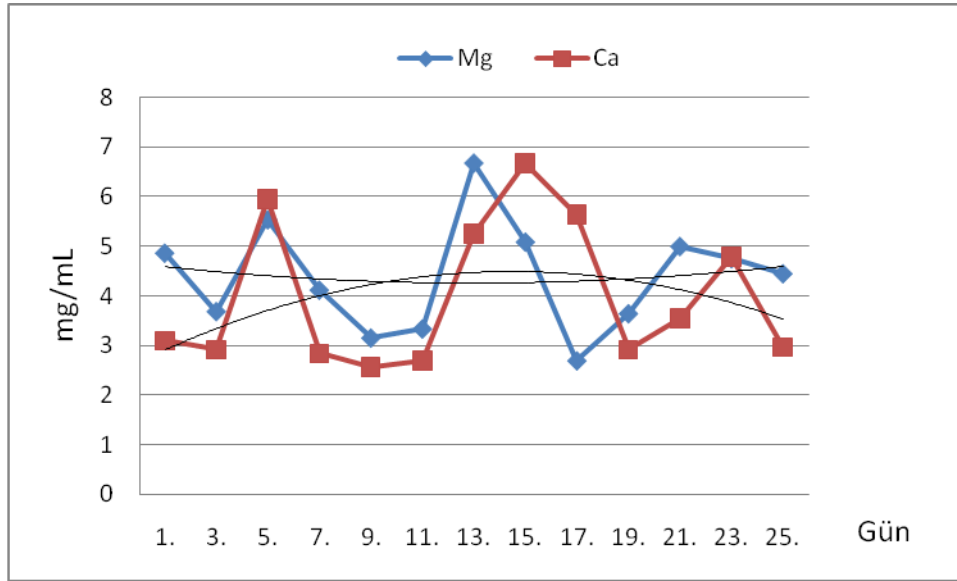




Şekil 19. OTM ortamındaki  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , ve  $\text{SO}_4^{2-}$  analiz grafiği.



Şekil 20. OTM ortamındaki  $\text{Na}^+$  ve  $\text{K}^+$  analiz grafiği.



Şekil 21. OTM ortamındaki  $Mg^{2+}$  ve  $Ca^{2+}$  analiz grafiği.

Su içinde serbest yaşayan fotosentetik organizmalar besinlerini doğal olarak suda çözülmüş halde bulunan gaz ve katı maddeleri difüzyon ile ozmozla alır. Suda çözünen madde miktarı ortamın ozmotik basıncını buna bağlı olarak ta madde alışverişini etkiler. Bu yüzden kültür ortamındaki iyon miktarı, mikroalg hücrelerinin ortamdaki maddelerden faydalanma ve hücre içindeki zararlı maddelerin uzaklaştırılması için optimum şartlarda tutulması gereken bir değerdir. Bunun yanında kültür sıvısında gerçekleşen iyonizasyon ile oluşan farklı özellikteki maddeler ortam pH'sının ve buna bağlı olarak uygun koşulların bozulmasına yol açar. Yapılan çalışmada OTM'nin elde edilmesi sürecinde kullanılan kimyasal maddelerin ortam ve mikroalg hücreleri ile etkileşimi sonucu  $NO_3^-$ ,  $PO_4^{3-}$  ve  $SO_4^{2-}$  anyonları ile  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  ve  $Ca^{2+}$  katyonları oluşmuştur.

Yeşil Algler, sağlıklı gelişim ve çoğalma gösterebilmek için yapısal maddelerden olan azota yüksek oranda ihtiyaç duyar ve azotu genellikle  $NO_3^-$  formunda kullanırlar. Yüksek hücre yoğunluğu, azot ve diğer makronütrientlerin alımı konusunda hücreler arasında bir rekabete neden olur, pek çok çalışmada farklı alg türlerinin yüksek azot yoğunluğu altında büyüme hızının, ortamdaki azot kaynağı çeşidine göre değiştiği belirtilmiştir (El-Sayed ve Abdel-Maguid, 2010).

Çalışması yapılan taksonun OTM'de  $NO_3^-$  kullanım miktarı, yaklaşık olarak 80 mg/mL, ortamdaki nitrat miktarına oranı ise % 50 olarak bulunmuştur. Hücrelerin OTM'de belirlenen şartlarda azımsanmayacak hücre yoğunluğuna ulaşmış olması, elde edilen

ortamın söz konusu algin biyokütle artışını sağlayacak yeterlilikte azot içerdiğini göstermektedir (Şekil 20).

Fosfor, hücre için vazgeçilmez maddelerden olan nükleik asitler ve ATP için temel yapısal madde olup bunun yanında biyokimyasal tepkimelerde koenzim olarak görev yapan düzenleyici bir maddedir. Alg hücrelerinin fosfat alımı ortamdaki fosfat çeşidi, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> ve çeşitli ağır metallerin bulunuşuna göre değişiklik gösterir (El-Sayed ve Abdel-Maguid, 2010). *Chlorella kessleri* mikroalgi, ortamdaki PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> yoğunluğu 10 mg/L olduğunda %50 oranında fosfor alımı gerçekleştirmiştir (Lee ve Lee, 2001). Gonzales ve arkadaşları (1997), *Chlorella vulgaris* ve *Scenedesmus dimorphus* mikroalgleri tarafından zirai-endüstriyel atık sulardan fosfor alınımının % 55 olduğunu rapor etmişlerdir. Aslan ve Kapdan (2006), *Chlorella vulgaris* mikroalginin PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> yoğunluğunun %93 mg/L olduğu durumda fosfor alınımının % 55 olduğunu belirtmişlerdir. An ve arkadaşları (2003), *Botryococcus braunii* mikroalginin kültürün başlangıcından 6 gün sonra 510 mg/L NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ve 29 mg/L PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> alımı gerçekleştirebildiğini ifade etmişlerdir.

Çalışmada kullanılan algin OTM'de yaklaşık 40 mg/L PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> iyonunu % 50 oranında kullandığı belirlenmiştir (Şekil 20). Bu oranın yeşil alglerin kullandığı fosfat oranına yakın ve alg gelişimi için ortamdaki fosfat miktarının da yeterli olduğu görülmüştür.

Sodyum, potasyum, magnezyum ve kalsiyum kültür ortamındaki tuzluluğu oluşturan ana iyonlardır. Bu iyonlar, alg hücrelerinin madde alışverişi, ozmotik dengenin sağlanması gibi faaliyetlerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadırlar. Sodyum ve potasyum çoğu kültür ortamındaki tuzluluk oranını % 50'lere kadar çıkarabilen temel iyonlardır ve bu iyonların hücreler tarafından alınımı ortamdaki yoğunluğuna göre değişim göstermektedir (El-Sayed ve Abdel-Maguid, 2010).

Yapılan çalışmada OTM'deki Na<sup>+</sup> ve K<sup>+</sup> miktarının algin gelişimini olumsuz yönde etkilemediği (Şekil 21), Na-K miktarının küçük değişimler göstererek artıp azaldığı ve bu değişimlere bağlı olarak hücre sayısında dikkate değer bir değişimin olmadığı gözlenmiştir.

Canlı alg hücrelerinin Ca alım oranı fizyolojik ve fiziksel nedenlere bağlı olarak artış göstermektedir. Fizyolojik nedenler, hücre bölünmesi ve kültürün hızlı gelişimi iken fiziksel nedenler ise konsantrasyon artışı ve ozmotik etki olarak belirtilebilir. Algal sistemlere CO<sub>2</sub> uygulamasının aralıklarla yapılması alglerin kendi kendilerine çökmesi olarak tanımlanan otoflokulasyona neden olur. Bu durum, genellikle fotosentetik CO<sub>2</sub>'nin tüketilmesi ve magnezyum, kalsiyum, fosfat ve karbonat tuzlarının alg hücreleri ile birlikte

çökmesi nedeniyle artan pH değeri ile ilişkilendirilir. Kalsiyum ve fosfatın kullanıldığı durumlarda pozitif yüklü  $Ca^{+2}$  iyonları, alg hücrelerinin negatif yüklenmesine ve otoflokulasyonun gerçekleşmesine neden olur.  $Mg^{2+}$  konsantrasyonundaki değişimin sonucu olarak oransal bir alım gerçekleşmektedir (El-Sayed ve Abdel-Maguid, 2010).

Yapılan çalışmada OTM'deki  $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  miktarının algin gelişimini olumsuz yönde etkilemediği (Şekil 22), iyon miktarındaki dalgalanmalara bağlı olarak hücre sayısında dikkate değer bir değişimin olmadığı gözlenmiştir.

#### 4.5. Vitamin ve Beta-Karoten Miktarları

Algin bir kilogram kuru ağırlığında bulunan beta-karoten, A ve E vitaminlerinin miligram cinsinden ölçüm sonuçları aşağıdaki tabloda belirtilmektedir (Çizelge 10).

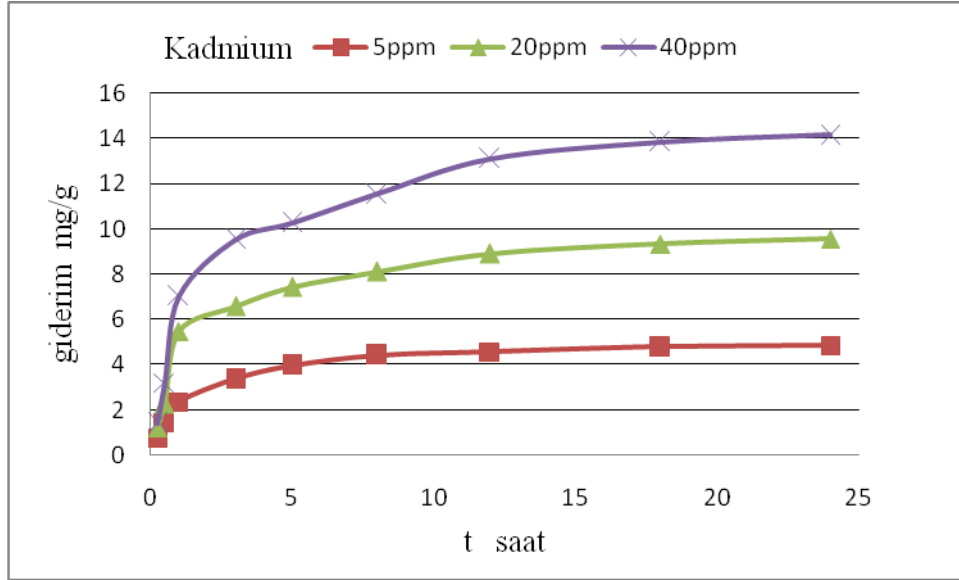
Çizelge 10. Beta-Karoten, A ve E vitaminlerinin biyokütle içindeki ağırlıkları

Vitamin A		Vitamin E		B-Karoten	
O.Data	Sonuç (mg/Kg)	O.Data	Sonuç (mg/Kg)	O.Data	Sonuç (mg/Kg)
0.4734	28.40	5.03	301.8	13.59	815.40

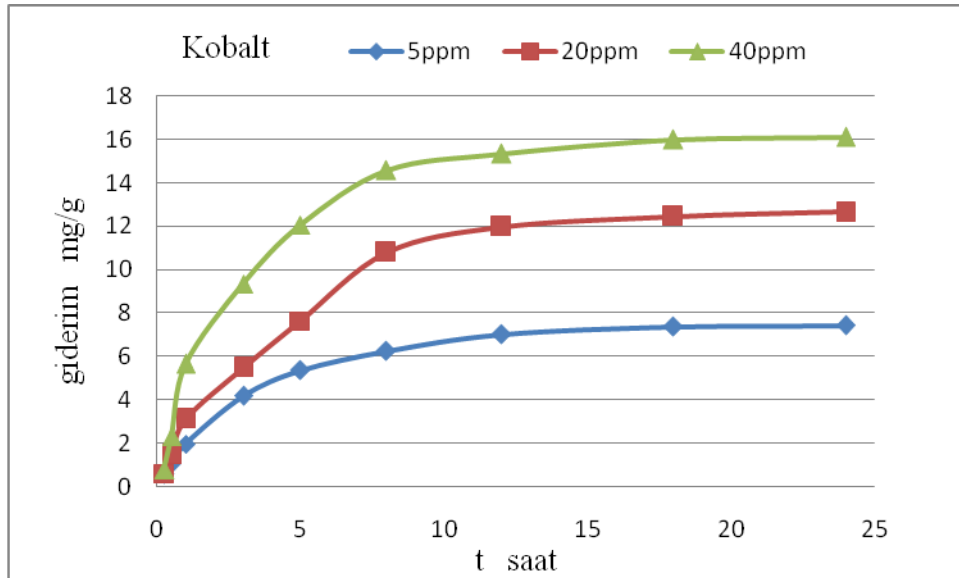
Canlı hücrelerde çeşitli metabolik olaylar ile oluşan serbest radikallere karşı antioksidan denilen bileşiklerle doğal bir savunma mekanizması oluşturulur. Doğal antioksidanlar olarak enzimler (superoksit dismutaz-SOD, katalaz-CAT, glutation peroksidaz-GP, glutation redüktaz, sitokrom-C-oksidad, hidroksiperoksidaz), makromoleküller (seruloplazmin, transferrin, ferritin, myogloblin, haptoglobilin) ve mikromoleküller ( $\beta$ -karoten, A-vitamini, C-vitamini, E-vitamini, tokoferoller, thiol içerenler, glutation (GSH), N-asetil sistein, metionin, kaptopril, ubiguinon) sayılabilir (Gökpınar ve ark., 2006). Mikroalgler, antioksidan maddeler bakımından oldukça zengin bir canlı grubudur. Çizelge 2. incelendiğinde bazı mikroalg türlerinin içeriğindeki antioksidan özellik gösteren maddelerin miktarları görülmektedir. Araştırılması yapılan mikroalg türünde 28,40 mg/kg A vitamini, 301,8 mg/kg E vitamini ve 815,40 mg/kg beta-karoten miktarının bulunması, söz konusu algin antioksidan özellikteki bu maddeleri biyoteknolojik çalışmalarda kullanılan pek çok alg türüne göre daha fazla içermesi onun besinsel ve ticari açıdan önemli olduğunu ortaya çıkarmaktadır.

#### 4.6. Ağır Metal Giderim Sonuçları

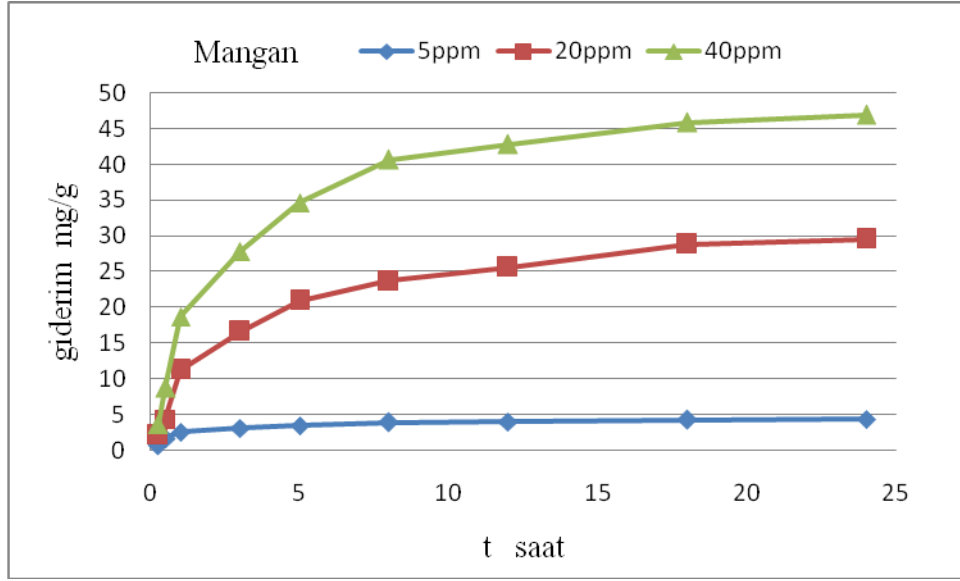
Kültür ortamındaki canlı mikroalg hücrelerinin farklı yoğunluklardaki kadmiyum ( $Cd^{+2}$ ), kobalt ( $Co^{+2}$ ), mangan ( $Mn^{+2}$ ), kurşun ( $Pb^{+2}$ ) ve çinko ( $Zn^{+2}$ ) ağır metallerinin absorpsiyonunda zamana bağlı dağılım grafikleri aşağıdaki şekillerde belirtilmektedir (Şekil 23-27).



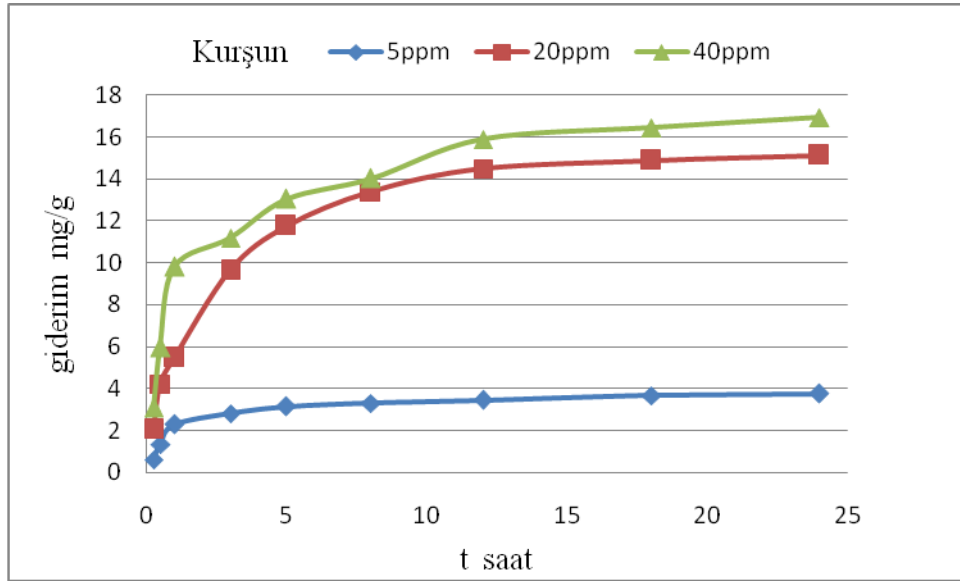
Şekil 22. Canlı *T. isobilateralis* mikroalg hücrelerinin OTM kültür ortamındaki kadmiyum ağır metal iyonlarını giderim grafiği.



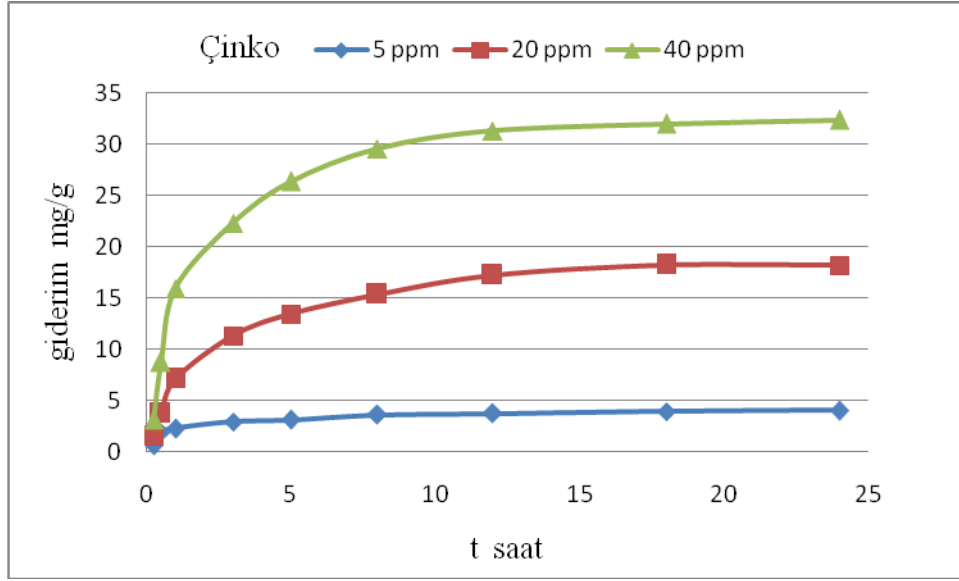
Şekil 23. Canlı *T. isobilateralis* mikroalg hücrelerinin OTM kültür ortamındaki kobalt ağır metal iyonlarını giderim grafiği.



Şekil 24. Canlı *T. isobilateralis* mikroalg hücrelerinin OTM kültür ortamındaki mangan ağır metal iyonlarını giderim grafiği.



Şekil 25. Canlı *T. isobilateralis* mikroalg hücrelerinin OTM kültür ortamındaki kurşun ağır metal iyonlarını giderim grafiği.



Şekil 26. Canlı *T. isobilateralis* mikroalg hücrelerinin OTM kültür ortamındaki çinko ağır metal iyonlarını giderim grafiği.

Doğal su kaynakları, kuyu suları ve atık sularda var olan ağır metal iyonları belli miktarlarda bulunduğu suda yaşayan canlılar için toksik etki yaratmaktadır. Ağır metaller, zehirleyici etkilerinden dolayı ekosistemi ve doğrudan ya da dolaylı olarak ta insan sağlığını tehlikeye sokmaktadır. Bu nedenle; doğal kaynaklardaki suların canlı kullanımına sunulmadan önce analizinin yapılması, kirlilik kaynaklarından oluşan atık suların ise çevreye verilmeden önce, belirlenmiş kirlilik değerlerinin altına düşürülmesi gerekmektedir. Bakır, kurşun, çinko, krom gibi metaller, sulu ortamdan nötralizasyonu izleyen çöktürme yoluyla ayrılabilirler. Sulu ortamlardan ağır metal iyonlarının giderilmesinde kullanılan geleneksel yöntemlerin bazı dezavantajlarından dolayı; son yıllarda alternatif yöntemler araştırılmaya başlanmıştır. Bu yeni yöntemlerden biri de biyosorpsiyon yöntemidir. Bu yöntemde canlı veya ölü mikroorganizmalar ile metal iyonları arasında gerçekleşen çeşitli mekanizmalar sonucunda metal iyonu mikroorganizma bünyesine alınarak giderim sağlanmaktadır. Ölü mikroorganizmalar; sürekli bir nütrient ihtiyacı olmaması ve kolay uygulanabilirliği nedeniyle daha çok kullanılmaktadır. Biyosorpsiyon yöntemi ekonomik oluşu ve ağır metal içeriği çok seyreltik olan sulardan bile verimli metal giderebilme kapasitesinden dolayı avantajlı bir yöntemdir (Aslan ve ark., 2007).

Absorpsiyon olayını gerçekleştirebilen canlı gruplarının başında mikroalgler gelmektedir. Absorpsiyonu mikroorganizmanın yüzey özellikleri, hacimsel ölçüleri ve

çözeltinin sıcaklık, pH, başlangıç metal iyon derişimi, karıştırma hızı, mikroorganizma derişimi gibi fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler etkilemektedir (İleri, 2000). Ağır metallerin su ortamından uzaklaştırılmasında canlı mikroorganizmaların kullanılmasının temel nedenleri, düşük konsantrasyonlarda bulunan metal iyonlarının hücreler tarafından rahatlıkla alınabilmesi ve kültür ortamında hızlıca üretilebilmesidir (İleri ve ark. , 1994).

Metal biyosorbsiyonunda etkin olarak kullanılacak biyolojik moleküller oldukça geniş bir spektruma sahiptir. Özellikle mikroorganizma grubu içerisinde algler de dahil olmak üzere çeşitli bakteri, maya, mantar türlerini saymak mümkündür. Örnek olarak bakterilerden *Arthrobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter* ve *Pseudomonas*; mayalardan *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* ve *Candida*; mantarlardan *Neurospora*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus* ve *Pleurotus*; alglerden *Chlorella*, *Microcystis*, *Scenedesmus*, *Anabeana*, *Ascophyllum* türleri başlıcalarındandır (Sağlam ve Cihangir, 1995).

*Dunaliella salina*, *Oocystis sp.*, *Porphyridium cruentum* ve *Scenedesmus protuberans* algleri ile yapılan çalışmada sudaki  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  ve  $Ni^{2+}$  iyonlarını en yüksek oranda *Dunaliella salina*; onu, sırasıyla *Oocystis sp.*, *Scenedesmus protuberans* ve *Porphyridium cruentum* alglerinin izlediği görülmüştür. Ayrıca tüm alglerin, çalışılan ağır metal iyonları içinde en çok  $Pb^{2+}$ 'yi tutma eğilimi gösterdiği;  $Cd^{2+}$  ve  $Ni^{2+}$  daha sonra geldiği belirtilmiştir (Karaca, 2008).

Çinkonun adsorbsiyon miktarı *Scenedesmus subspicatus* mikroalgi için 0,123 L/ $\mu$ mol olarak, *Chlamydomonas variabilis* algi için ise 0,039 L/ $\mu$ mol olarak bulunmuştur (Bates ve ark.,1982).

Atık sularda bulunan bakır, kobalt, kurşun, mangan gibi ağır metaller biyosorpsiyon yoluyla siyanobakteri (*Nostoc muscorum* ve *Anabaena subcylindrica*) kültürleri kullanılarak sırasıyla % 12.5–81.8, 11.8–33.7, 26.4–100 and 32.7–100 oranlarında uzaklaştırılmıştır (El-Sheekh ve ark., 2004).

Yapılan çalışmada söz konusu algin OTM'de ağır metal giderim miktarlarının, ortam pH'ına ve ortamda bulunan metal yoğunluğuna bağlı olarak değiştiği görülmektedir. Ağır metallerin zamana bağlı giderim miktarlarını gösteren grafikler incelendiğinde en fazla giderimin yapıldığı ağır metalin mangan olduğu ve onu sırasıyla; çinko, kurşun, kobalt, kadmiyumun izlediği görülmektedir. Tüm bu veriler; *T. isobilateralis* taksonunun atık sulardaki ağır metallerin biyosorpsiyon yoluyla arıtılmasında kullanılabileceğini göstermektedir.



**BÖLÜM 5****SONUC VE ÖNERİLER**

*Tetracystis isobilateralis* mikroalginin daha önce literatürde geçen klasik yetiştirme ortamlardaki hücresel yoğunluğu ile OTM kültür ortamında ulaştığı hücresel yoğunluk karşılaştırıldığında, bu algin OTM’de diğer fiziksel şartlar uygulandığından maksimum büyüme gösterdiği saptanmıştır. Çalışılan örneğin besinsel ve biyokimyasal içeriği ile ağır metal sorpsiyon kapasitesi araştırma sonuçları bu algin mikroalgal biyoteknolojik çalışmalarda kullanılabilir düzeyde öneme sahip olduğunu göstermektedir.

Artan dünya nüfusu, tarım alanlarının yetersizliği ve tarım ürünlerinin kalitesizliği düşünüldüğünde besinsel olarak kullanılabilir birkaç alg türüne alternatif olarak gösterilebilecek bu mikroalg türü, doğal ve beşeri etkilerle su kaynaklarına salınan ağır metallerin biyolojik olarak giderilmesinde de kullanılabilir.

Doğal ortamında maksimum büyüme gösteren ve kültüre alındığında istenilen büyümeyi sağlamayan alglere farklı koşullar ve ortam sağlandığında istenilen sonuçlara ulaşılabilirliği de bu çalışmayla kanıtlanmıştır.

Laboratuvar ortamında rahatlıkla kültürü yapılabilen bu algin, açık havuz kültürlerinin verimli bir şekilde yapılabilmesi için, daha geniş çaplı ve mühendislik bilgileri gerektiren farklı uygulamaların söz konusu olduğu açıktır. Yapılan çalışma, bu tür çalışmalara temel olup yol gösterebileceği gibi, ülkemizde henüz gelişme aşamasında olan mikroalgal biyoteknoloji bilim dalının daha da ilerlemesine katkı sağlayacak özelliktedir.

Ülkemizde henüz değeri tam olarak anlaşılmayan alg kültürü konusunda daha ileri adımlar atılabilmesi için var olan kaynakların yanında henüz çalışılmamış ve yüksek öneme haiz türlerin bu tür çalışmalarla aydınlığa kavuşacağı, bu anlamda deneyime sahip bilim adamlarımıza gerekli destek sağlandığı takdirde daha da önemli çalışmalar gerçekleştirileceği inancındayız.

## KAYNAKLAR

- Aaronson, S. ve Dubinsky Z., 1982. Mass Production of Microalgae. *Experientia* 38: 36-40
- Akyıldız, R., 1984. Yemler Bilgisi Uygulama Kılavuzu, A.Ü. Ziraat Fakültesi, Yay: 895, Uygulama Kılavuzu: 213, Ank. Üniv. Basımevi, Ankara. 105-149
- An, J., Sim, S., Lee, J.S. ve Kim, B.W., 2003. Hydrocarbon Production From Secondarily Treated Piggery Wastewater by the Green Alga *Botryococcus brauni*, *Journal of Applied Phycology*, 15, 185-191.
- AOAC,2000 Official Methods of Analysis. 17th Edition vol.II. *Assoc. Off. Anal.Chem*, Wash. D. C.,USA.
- Aslan, S. ve Kapdan, I., 2006. Batch Kinetics of Nitrogen and Phosphorus Removal From Synthetic Wastewater by Algae. *Ecological Engineering*, 28:64-70.
- Aslan, S., Bozkurt, Z. ve Tekeli, A. N., 2007. Removal of Cu (II), Ni (II), Cd (II) and Cr (VI) İons From Aqueous Solutions by Biosorption Processes. *Journal of Engineering and Natural Sciences Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, 25(2):209-222.
- Banerjee, A., Sharma, R., Chisti, Y. ve Banerjeel, U. C., 2002. *Botryococcus braunii*: A Renewable Source of Hydrocarbons and Other Chemicals. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(3):245–279.
- Bates, S.S., Tessier, A., Cambell, P.G.C. ve Buffle, J., 1982. Zinc Adsorption and Transport by *Chlamydomonas variabilis* and *Scenedesmus subspicatus* (Chlorophyceae) Grown in Semicontinuous Culture. *Journal of Phycology* 18: 521-529.
- Bates, S.S., Tessier, A., Campbell, P.G.C. ve Buffle, J., 1982. Zinc Adsorption and Transport by *Chlamydomonas varzabius* and *Scenedesmus subspicatus* (Chlorophyceae) Grown in Semicontinuous Culture. *J. Phycol.*, 18: 521-529.
- Becker, E. W., 1994. Microalgae Biotechnology and Microbiology. *Cambridge University Press*, Cambridge, 230 p.

- Becker, E.W., 2004. Microalgae in Human and Animal Nutrition. in: Richmond A., Editor. Handbook of Microalgae Culture. Biotechnology and Applied Phycology. Oxford: Blackwell Science
- Belcher, H. ve Swale E., 1982. *Culturing Algae. In: Natural Environment Research Council, Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP)*. Freshwater Biological Association, The Ferry House, Ambleside, Cumbria, United Kingdom, 18, 22.
- Borowitzka, M. A. ve Borowitzka, L. J., 1988. Microalgal Biotechnology, 477 p.
- Brinza, L., Dring, M. J. ve Gavrilescu, M., 2007. Marine Micro and Macro Algal Species as Biosorbents for Heavy Metals. *Environmental Engineering and Management Journal*, 6(3):237-251.
- Brown, M.R. ve Bold, H.C., 1964. Comparative Studies of the Algal Genera *Tetracystis* and *Chlorococcum*. *The Univ. Texas Publication*, No:6417, 213p.
- Burtin, P., 2003. Nutritional Value of Seaweeds. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 2(4):498-503.
- Caswell, M., ve Zilberman, D., (February 12, 2010). *Algoculture*. Retrieved (December 02, 2010), from <http://en.scientificcommons.org/54921181>.
- Cohen, Z., Bigogno, C., Goldberg, K.I., Boussiba, S. ve Vonshak, A., 2002. Lipid and Fatty Acid Composition of the Green Oleaginous Alga *Parietochloris incisa*, the Richest Plant Source of Arachidonic Acid. *Phytochemistry* 60:497–503
- Czerwik-Marcinkowska, J. ve Mrozinska, T., 2009. Epilithic Algae From Caves of the Krakowsko-Czestochowska Upland (Southern Poland), *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 78 (4):301-309.
- Dayanandaa C., Saradaa R., Usha Ranib M., Shamalab T.R. ve Ravishankarr G.A., 2006. Autotrophic Cultivation of *Botryococcus braunii* for the Production of Hydrocarbons and Exopolysaccharides in Various Media. *Biomass and Bioenergy*, 31:87-93.
- De Groot, C., 1991. Aquatic Microbial Life, Source of Hope An Expectation. *Biotechnology and Development Monitor. University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands*. No: 7, pp. 7-9.

- El-Sayed, A. B. ve Abdel-Maguid, A.A., 2010. Immobilized-Microalga *Scenedesmus* sp. for Biological Desalination of Red Sea Water: II. Effect on Macronutrients Removal. *Journal of American Science*, 6(9): 637-643.
- El-Sheekh, M. M., El-Shouny, W.A., Osman, M. E.H. ve El-Gammal, E.W.E., 2005. Growth and Heavy Metals Removal Efficiency of *Nostoc muscorum* and *Anabaena subcylindrica* in Sewage and Industrial Wastewater Effluents. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19:357–365.
- El-Sheekh, M.M., El-Shouny, W.A., Osman, M. E.H. ve El-Gammal, E.W.E., 2004. Growth and Heavy Metals Removal Efficiency of *Nostoc muscorum* and *Anabaena subcylindrica* in Sewage and Industrial Wastewater Effluents. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19(2): 357-365.
- Fabregas, J. ve Herrero, C., 1985. Marine Microalgae as a Potential Source of Single Cell Protein (SCP). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23: 110-113.
- Fabregas, J., Dominguez, A., Regueiro, M., Maseda, A. ve Otero, A., 2000. Optimization of Culture Medium for the Continuous Cultivation of the Microalga *Haematococcus pluvialis*. *Appl. Microbiol Biotechnol.*, 5:530-535.
- Fırat, C., Öztürk, M., Taşkın, E. ve Kurt, O., 2007. *Caulerpa racemosa* (Forsskal) J. Agardh'nın (Chlorophyceae=Yeşil Algler) Biyokimyasal İçeriği. *E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 24(1-2):89-91.
- Folch, J., Lees, M. ve Stanley, G.H., 1956. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipids From Animal Tissues. *The Jour. Biol. Chem.*, 2261: 497-509.
- Gonzales, L.E., Canizares, R.O., & Baena, S. (1997). Efficiency of Ammonia and Phosphorus Removal From a Colombian Agroindustrial Wastewater by the Microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Biosource Technology*, 60, 259-262.
- Gökpinar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T. ve Durmaz, Y., 2006. Algal Antioksidanlar . *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 23:85-89.

- Gökpınar, Ş., ve Büyükkışık, B., 1994. Cultures of Microalgae:II Culture Methods. *J.Fisheries*,11:42-43.
- Göksan T. ve Gökpınar, Ş., 2005. *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae)'un Farklı Işık Şiddetlerinde Vejetatif Büyüme Özellikleri. *E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 22 (1-2):21- 24.
- Guiry, M.D. ve Guiry, G.M., 2010. *AlgaeBase*, World-wide Electronic Publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 04 November 2010.
- Hameed, A. ve Hasnain, S., 2005. Cultural Characteristics of Chromium Resistant Unicellular Cyanobacteria Isolated from Local Environment in Pakistan. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 23(4):433-441.
- Horvatic, J., Persic, V. ve Popovic, Z., 2006. The Assessment of Nutrient Availability for the Growth of Freshwater Green Algae *Chlorella kessleri* by Bioassay (Lake Sakadaš, NP Kopački Rit). *36th International Conference: Danube.River.Life*. April 12, 2010 from <http://www.oen-iad.org/conference/index.html>
- Hurtado, S. A., Rodriguez, S. N., Nogues, M. T. V. ve Font, A. M., 1997. Determination of Vitamins A and E in Infant Milk Formulae by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A*, 778:243-246
- İleri R., Sümer B. ve Şengörür B., 1994. Atık Sulardaki Bakır II İyonlarının Biyosorpsiyon ile Uzaklaştırılması. *Ekoloji Dergisi* Sayı :11.
- İleri, R., 2000. Çevre Biyoteknolojisi. Değişim Yayınları, 62.
- Johnston, H.W., 1976. The Biological and Economic Importance of Algae. Part 4: The Industrial Culturing of Algae. *Tuatara*, 22(2):1-108.
- Karaca, M., 2008. Biosorption of Aqueous Pb<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, and Ni<sup>2+</sup> Ions by *Dunaliella salina*, *Oocystis sp.*, *Porphyridium cruentum*, and *Scenedesmus protuberans* Prior to Atomic Spectrometric Determination (Doktora tezi). Graduate School of Engineering and Sciences of İzmir Institute of Technology, İzmir.

- Lee, K. ve Lee, C., 2001. Effect of Ligth/Dark Cycles on Wastewater Treatments by Microalgae. *Biotechnology, Biotechnology, Bioprocess Engineering*, 6, 194-199.
- Mcgurck, L. L., 1975. *Soil Algal Relationships to Onychiurus folsomi , a Minute Arthropod. Island Ecosystems IRP*. U. S . International Biological Program, 66p.
- Mendoza, H., Jara, A., Freijanes, K., Carmona, L., Ramos, A. A., Duarte, V. S. ve Varela, J. C. S., 2008. Characterization of *Dunaliella salina* Strains by Flow Cytometry: a New Approach to Select Carotenoid Hyperproducing Strains. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11:4
- Miles, R. ve Chapman, R., 2009. The Benefits of Fish Meal in Aquaculture Diets. *Institute of Food and Agricultural Sciences (IFAS)*. University of Florida, 122:1-7
- Nakiboğlu, T. ve Sevindir, H.C., 2006. Deri Endüstrisi Atık sularından Kromun Çeşitli Alglerle Biyosorpsiyonu. *Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10(2):284-291.
- Ohki, K. ve Fujita, Y., 1982. Laboratory Culture of the Pelagic Blue-Green Alga *Trichodesmium thiebautii*: Conditions for Unialgal Culture. *Marine Ecology - Progress Series*, 7:185-190.
- Pena-Castro, J.M., Martinez-Jeronimo, F., Esparza-Garcia, F. ve Canizares-Villanueva, R.O., 2004. Heavy Metals Removal by the Microalga *Scenedesmus incrassatulus* in Continuous Cultures. *Bioresource Technology*, 94:219-222.
- Pratoomyot, J., Srivilas, P. ve Noiraksar, T., 2005. Fatty Acids Composition of 10 Microalgal Species. *Songklanakarın J. Sci. Technol.*, 27(6):1179-1187.
- Pringsheim, E.G., 1946. *Pure Cultures of Algae*. Cambridge Press. London, 119 p.
- Radmer, R. J., 1996. Algal Diversity and Commercial Algal Products. *Bioscience*, 46(4):263-270.
- Richmond, A., 2004. *Handbook of Microalgal Culture:Biotechnology and Applied Phycology*, 1-3.

- Rocha, J.M.S., Garcia, J.E.C. ve Henriques, M. H.F., 2003. Growth aspects of the Marine Microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Biomolecular Engineering*, 20:237-242.
- Sağlam, N. ve Cihangir, N., 1995. Ağır Metallerin Biyolojik Süreçlerle Biyosorbsiyonu Çalışmaları. *Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi* 11: 157-161.
- Sanchez, S., Martinez, E. ve Espinola, F., 2000. Biomass Production and Biochemical Variability of the Marine Microalga *Isochrysis galbana* in Relation to Culture Medium. *Biochemical Engineering Journal*, 6:13–18
- Sasson A., 1997. Microalgal Biotechnologies: Recent Developments and Prospects for Developing Countries. *BIOTEC Publication, 2nd Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference and 3rd Asia-Pacific Conference on Algal Biotechnology*, Thailand. 3-4.
- Stanier, R.Y., Rippka, R., Deruelles, J.B., ve Herdman, M., 1979. Assignments Strain History and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Journal General Microbiology*, 111:1-61.
- Stein, J. R., 1973. *Handbook of Phycological Methods: Culture: Methods and Growth Measurements*. Cambridge Univ. Press, London. 7-24.
- Ting, Y. P., Lawson, F. ve Prince, I. G., 1989. Uptake of Cadmium and Zinc by the Alga *Chlorella vulgaris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 34(7):990-999.
- Toyub, M. A., Ahmed, S.R., Miah, M. I. ve Habib, M. A. B., 2007. Growth Performance and Nutritional Value of *Chlorella ellipsoidea* in Fertilizer Factory Effluent Media. *Asian Fisheries Science*, 20:65-79
- Trautenberg, C. R. ve Ah-Peng, C., 2004. A Procedure to Purify and Culture a Clonal Strain of the Aquatic Moss *Fontinalis antipyretica* for Use as a Bioindicator of Heavy Metals. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 46: 289–295.
- Volkman, H., Imianovsky, U., Oliveira, J. L.B., ve SantAnna, E. S., 2002. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in Desalinator Wastewater and Salinated Synthetic medium: Protein Content and Amino-Acid Profile. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39:98-101

Wiltshire, K.H., Boersma, M., Möller, A. ve Buhtz, H., 2000. Extraction of Pigments and Fatty Acids from the Green Alga *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). *Aquatic Ecology*, 34:119-126.



## ŞEKİLLER

Sayfa No:

Şekil 1. <i>Tetracystis isobilateralis</i> mikroalginin hücre ve zoosporları.....	21
Şekil 2. <i>Tetracystis isobilateralis</i> taksonunun beş farklı sıvı kültür ortamındaki görüntüsü	23
Şekil 3. <i>Tetracystis isobilateralis</i> taksonunun farklı kültür ortamlarında ulaştığı hücre yoğunluğu .....	29
Şekil 4. <i>Tetracystis isobilateralis</i> yağ asitleri GC-MS spektrumu.....	31
Şekil 5. B3N ortamındaki NO <sub>3</sub> analiz grafiği .....	33
Şekil 6.. B3N ortamındaki PO <sub>4</sub> ve SO <sub>4</sub> analiz grafiği.....	33
Şekil 7.. B3N ortamındaki Na <sup>+</sup> ve K <sup>+</sup> analiz grafiği .....	34
Şekil 8.B3N ortamındaki Mg ve Ca analiz grafiği.....	34
Şekil 9.BG11 ortamındaki NO <sub>3</sub> analiz grafiği .....	35
Şekil 10.BG11 ortamındaki PO <sub>4</sub> ve SO <sub>4</sub> analiz grafiği.....	35
Şekil 11.. BG11 ortamındaki Na analiz grafiği.....	36
Şekil 12.. BG11 ortamındaki K, Mg ve Ca analiz grafiği. ....	36
Şekil 13.Bold Basal ortamındaki NO <sub>3</sub> , PO <sub>4</sub> , ve SO <sub>4</sub> analiz grafiği.....	37
Şekil 14.Bold Basal ortamındaki Na <sup>+</sup> ve K <sup>+</sup> analiz grafiği .....	37
Şekil 15.Bold Basal ortamındaki Mg ve Ca <sup>+2</sup> analiz grafiği.....	38
Şekil 16.Chu 10 ortamındaki NO <sub>3</sub> , PO <sub>4</sub> , ve SO <sub>4</sub> analiz grafiği .....	38
Şekil 17.Chu 10 ortamındaki Na ve K analiz grafiği .....	39
Şekil 18.. Chu 10 ortamındaki Mg ve Ca analiz grafiği.....	39
Şekil 19.OTM ortamındaki NO <sub>3</sub> , PO <sub>4</sub> , ve SO <sub>4</sub> analiz grafiği.....	40
Şekil 20.OTM ortamındaki Na ve K analiz grafiği.....	40
Şekil 21.OTM ortamındaki Mg ve Ca analiz grafiği .....	41
Şekil 22. Canlı <i>T. isobilateralis</i> mikroalg hücrelerinin OTM kültür ortamındaki kadmium ağır metal iyonlarını giderim grafiği .....	44
Şekil 23.Canlı <i>T. isobilateralis</i> mikroalg hücrelerinin OTM kültür ortamındaki kobalt ağır metal iyonlarını giderim grafiği .....	44
Şekil 24.Canlı <i>T. isobilateralis</i> mikroalg hücrelerinin OTM kültür ortamındaki mangan ağır metal iyonlarını giderim grafiği .....	45
Şekil 25.Canlı <i>T. isobilateralis</i> mikroalg hücrelerinin OTM kültür ortamındaki kurşun ağır metal iyonlarını giderim grafiği .....	45
Şekil 26.Canlı <i>T. isobilateralis</i> mikroalg hücrelerinin OTM kültür ortamındaki çinko ağır metal iyonlarını giderim grafiği .....	46

## ÇİZELGELER

Sayfa No:

Çizelge 1. Mikroalgler ve ticari besinsel ürünlerin % olarak besinsel karşılaştırılması. ....	9
Çizelge 2. Bazı mikroalglerin ve besinsel ürünlerin vitamin değerleri .....	11
Çizelge 3. <i>Chlorella</i> sp. mikroalginin mineral değerleri .....	12
Çizelge 4. Ağır metal sorpsiyonları için sorbent olarak test edilen mikroalgler .....	13
Çizelge 5. Ağır metal absorpsiyonları için sorbent olarak test edilen makroalgler .....	14
Çizelge 6. Sıvı kültür ortamlarının besin kompozisyonu .....	22
Çizelge 7. <i>Tetracystis isobilateralis</i> mikroalginin toplam ham yağ, toplam ham protein, nitrojensiz öz madde ve toplam kül miktarları .....	30
Çizelge 8. Yağ asidi çeşitlerinin toplam yağ asidine bağlı yüzdesel oranları .....	31
Çizelge 9. Bazı mikro ve makro alglerde yağ asitleri kompozisyonu .....	32
Çizelge 10. Beta-Karoten, A ve E vitaminlerinin biyokütle içindeki ağırlıkları .....	43

## **ÖZGEÇMİŞ**

Adı Soyadı: Cumhur MİÇOOĞULLARI

Doğum Yeri: Samandağ/HATAY

Doğum Tarihi: 29/10/1981

### **EĞİTİM DURUMU:**

Lisansans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi (2002-2007)

Yüksek Lisans: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi (2008-2010)

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce (İleri Seviye)

Arapça (İleri Seviye)

Rusca (Orta Seviye)

### **BİLİMSEL FALİYETLERİ**

Miçooğulları, C., Akgül, R., Burhan, A., 2010. *Choricystis minor* var. *gallica* (Bourrelly) Komarek, *Tetracystis isobilateralis* Brown & Bold, ve *Neochloris pseudoalveolaris* Deason & Bold Mikroalglerinin Kültür Optimizasyonu. 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, Denizli. poster sunumu.

Akgül, R., Miçooğulları, C., Erduğan, H., Aysel, V., 2010. Ergene Havzasından (Trakya, Türkiye) İzole Edilen Mikroalgler. 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, Denizli. poster sunumu.

Hüseyin Erduğan., Veysel Aysel., Berrin Dural., Rıza Akgül., Özcan Balıkçı., Cumhur Miçooğulları., Füsün Akgül (2009). A new record for *Caulerpa mexicana* Sonder ex Kützing from Eastern Mediterranean coast of Turkey. J. Black Sea /Mediterranean Environment 15: 271-285.

Hüseyin ERDUĞAN, Rıza AKGÜL, Fulya AYSEL SARPAS, Cumhur MİÇOOĞULLARI, Selin SAĞBAS, Aysel ÖZTÜRK, Tuğba SEN, Zeynep Gökçen KOÇOĞLU, Gamze TURAN, Veysel AYSEL. 2009. Küresel Isınmanın Çanakkale Boğazı (Çanakkale, Türkiye) Alglerine Etkisi. 13. Sualtı Bilim ve Teknolojileri Toplantısı. 7-8 Kasım. Uluslararası Kıbrıs Üniversitesi. s. 98-103

### **İLETİŞİM**

E-Posta Adresi: biyolog\_cumi@hotmail.com