T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DENİZEL DİATOM İZOLASYONU, TANIMLANMASI VE BESİN MADDELERİNİN DİATOM BÜYÜMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

SAİT ÇİNAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI

DANIŞMAN
DOÇ. DR. DİDEM ÖZÇİMEN

İSTANBUL, 2017

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DENİZEL DİATOM İZOLASYONU, TANIMLANMASI VE BESİN MADDELERİNİN DİATOM BÜYÜMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Sait Çinar tarafından hazırlanan tez çalışması 09.11.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Didem Özçimen

Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş Danışman

Doç. Dr. Mete Yılmaz

Bursa Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Didem Özçimen

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Musa Türker

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Fatma Gülen İskender

İstanbul Teknik Üniversitesi _____

ÖNSÖZ

"Denizel Diatom İzolasyonu, Tanımlanması ve Besin Maddelerinin Diatom Büyümesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi" başlıklı tez çalışmam esnasında bilgi birikimi, tecrübesi, öngörüsü ve sabrıyla desteğini benden esirgemeyen tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. Didem ÖZÇİMEN'e,

Çalışmam esnasında laboratuvarının tüm imkânlarından faydalanmamı sağlayan, yol gösterici vizyonuyla beni destekleyen saygıdeğer eş danışman hocam Doç. Dr. Mete YILMAZ'a,

Deneysel çalışmalarım sırasında yardımını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Yük. Biyomühendis Benan İNAN, Yük. Biyomühendis Anıl Tevfik KOÇER, Moleküler Biyolog Cem DİRLİK, Moleküler Biyolog Esra DÖKÜMCÜOĞLU, Biyomühendis Kübra ŞENTÜRK'e ve hocalarım Dr. Burcu TURANLI YILDIZ, Yük. Biyolog Mihriban ÖZEN, Dr. Ebru ÖZKAN OKTAY'a,

Hayatımın her anında beni maddi ve manevi olarak destekleyen aileme,

Çalışmalarım sırasında sevgisi ve manevi desteğini her zaman yanımda hissettiğim nişanlım Aylin YILMAZ'a teşekkür ederim.

Ekim, 2017

Sait ÇİNAR

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ vii
KISALTMA LİSTESİ viii
ŞEKİL LİSTESİ ix
ÇİZELGE LİSTESİ x
ÖZET xi
ABSTRACT xiii
BÖLÜM 1
GİRİŞ 1
1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 2
1.3 Orijinal Katkı 2
BÖLÜM 2
MİKROALGLER ve DİATOMLAR 3
2.1 Mikroalgler 3
2.1.1 Mikroalglerin Kullanım Alanları 4
2.1.2 Mikroalgal Biyokütle Üretimi 5
2.1.2.1 Fototrofik Üretim 5
2.1.2.2 Heterotrofik üretim 5
2.1.2.3 Miksotrofik Üretim 6
2.2 Diatomlar 6
BÖLÜM 3
MİKROALG İZOLASYON ve TEMİZLEME YÖNTEMLERİ 9
3.1 İzolasyon Yöntemleri 10
3.1.1 Geleneksel Yöntemler 10
3.1.1.1 Mikropipet ile Tek Hücre İzolasyonu 10
3.1.1.2 Kültür Zenginleştirme 11
3.1.1.3 Agar Kullanarak İzolasyon 12
3.1.1.4 Dilüsyon Teknikleri 12
3.1.1.5 Yerçekimi İle İzolasyon 13

3.1.1.6 Fototaksis ile İzolasyon 13
3.1.2 İleri İzolasyon Teknikler 14
3.1.2.1 Mikromanipülasyon 14
3.1.2.2 Flow Sitometri 14
3.2 Temizleme Teknikleri 15
3.2.1 Antibiyotik Kullanımı 15
3.2.2 Filtrasyon Metodu 16
3.2.3 Sonikasyon ve Vorteks 16

BÖLÜM 4

MİKROALGAL BÜYÜMEYİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER 17

4.1 Besin 17
4.1.1 Azot 17
4.1.2 Fosfor 18
4.1.3 Silisyum 19
4.2 Işık 19
4.3 Sıcaklık 20
4.4 pH 21
4.5 Tuzluluk 21
4.6 Karıştırma/Havalandırma 22

BÖLÜM 5

MATERYAL ve METOT 23

5.1 Materyal 23
5.1.1 Mikroalg 23
5.1.2 Kültür Ortamları 24
5.1.3 Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar 24
5.1.4 Kullanılan Kimyasallar 25
5.2 Metot 26
5.2.1 Tür İzolasyonu 26
5.2.2 Kültür Ortamlarının Hazırlanması 27
5.2.3 Kültürlerin İnkübasyonu 29
5.2.4 Mikroskobik Yöntemle Hücre Sayımı 29
5.2.5 Büyüme Hızı Hesaplamaları 29
5.2.6 Tür karakterizayonu 30
5.2.6.1 Moleküler Tür Tanımlama 30
5.2.6.2 TGA Analizi 31
5.2.6.3 FTIR Analizi 32
5.2.6.4 Toplam Karbonhidrat Analizi 32
5.2.6.5 Toplam Yağ Analizi ve Yağ Asidi Kompozisyonu Analizi 33
5.2.7 Besin Maddelerinin (N, Si, P) Diatom Büyümesi Üzerine Etkileri 34

BÖLÜM 6

BULGULAR ve TARTIŞMA 36

6.1 İzolasyon Denemelerinde Elde Edilen Türler 36
6.2 Kültüre Edilen Türün Büyüme Hızı 38
6.3 Tür Karakterizasyonu 39

6.3.1 Moleküler Tür Tanımlama 39
6.3.1.1 Jel Elektroforezi 39
6.3.1.2 Dizi Analizi 40
6.3.2 TGA Analizi 41
6.3.3 FTIR Analizi 42
6.3.4 Toplam Karbonhidrat Analizi 43
6.3.5 Toplam Yağ Miktarı ve Yağ Asidi Kompozisyonu Analizi 44
6.4 Besin Maddelerinin Diatom Büyümesi Üzerine Etkileri 46
6.4.1 Azotun Diatom Büyümesi Üzerine Etkileri 48
6.4.2 Silisyumun Diatom Büyümesi Üzerine Etkileri 50
6.4.3 Fosforun Diatom Büyümesi Üzerine Etkileri 51
BÖLÜM 7
SONUÇ ve ÖNERİLER 56
KAYNAKLAR 59
ÖZGEÇMİŞ 71

SİMGE LİSTESİ

%	Yüzde değer
µE	Mikroeinstain
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
cm	Santimetre
^{o}C	Santigrat derece
dk	Dakika
d_2	İkilenme süresi
g	Gram
L	Litre
Ln	Doğal logaritma
m	Metre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
s	Saniye
β	Beta
Δ	Delta
ω	Omega
μ	Spesifik büyüme hızı

KISALTMA LİSTESİ

ANOVA	Analaysis of variance
ARA	Araşidonik asit
ATP	Adenozin trifosfat
BLAST	Basic local alignment search tool
bp	Base pair (Baz çifti)
DHA	Dokozohegzanoik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EPA	Eikosapentaenoik asit
FACS	Floresan aktif hücre ayrımı
FTIR	Fouirer transform infrared
GPS	Küresel konumlama sistemi
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ppt	Parts per thousand (Binde bir)
RNA	Ribo nükleik asit
SSU	Small subunit
TGA	Termogravimetrik analiz
Vd.	Ve diğerleri

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1. 1 Diatom Früstül Yapısı 7
Şekil 3. 1 Pastör pipetinden mikropipet yapımı 11
Şekil 3. 2 Dilüsyon tekniğinin gösterimi 13
Şekil 5. 1 96'lı ve 4'lü plakalar içerisinde izolasyonu yapılan diatom örnekleri 26
Şekil 5. 2 Marmara denizi mudanya kıyılarından izole edilen diatom türü 27
Şekil 6. 1 İzole Edilen türün 40 X mikroskop görüntüsü (*Pleurosigma sp.)* 36
Şekil 6. 2 İzole Edilen türün 40 X mikroskop görüntüsü (*Cylindrotheca sp.*) 37
Şekil 6. 3 İzole Edilen türün 40 X mikroskop görüntüsü *(Thalassiosira sp.)* 38
Şekil 6. 4 Diatom koloni PCR jel görüntüsü 40
Şekil 6. 5 NCBI internet sitesinde BLAST analizi sonucu 41
Şekil 6. 6 Diatom FTIR Spektrumu 42
Şekil 6. 7 Diatom örneğinin yağ asidi metil esterlerinin kromatogramı 45
Şekil 6. 8 Besin elementlerinin etkisi incelemek için çoğaltılan diatom hücreleri 47
Şekil 6. 9 *Pleurosigma sp.* hücrelerinin mikroskop altındaki görüntüsü 47
Şekil 6. 10 Farklı fosfat konsantrasyonlarında hücre sayısı 53

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1. 1 Bazı mikroalgler ve ticari uygulamaları 4
Çizelge 5. 1 Çalışmada kullanılan cihaz ve ekipmanlar 24
Çizelge 5. 2 Çalışmada kullanılan kimyasallar 25
Çizelge 5. 3 İz element solüsyonu hazırlamak için gerekli bileşenler 28
Çizelge 5. 4 Vitamin karışımı hazırlamak için gerekli bileşenler 28
Çizelge 5. 5 L1 ortamı hazırlamak için gerekli bileşenler 29
Çizelge 5. 6 Koloni PCR'da kullanılan primerler 30
Çizelge 5. 7 PCR reaksiyonu 31
Çizelge 5. 8 Termal döngü şartları 31
Çizelge 5. 9 TGA kısa analiz prosedürü 32
Çizelge 5. 10 PO_4, NO_3 ve SiO_3 konsantrasyonlarının faktöriyel seviyeleri 34
Çizelge 5. 11 Seçilen parametreler için faktöriyel tasarım matrisi 34
Çizelge 6.1 Bazı diatomların spesifik büyüme hızı 38
Çizelge 6.2 Diatom TGA kısa analiz sonucu 42
Çizelge 6.3 FTIR analizi fonksiyonel gruplar 43
Çizelge 6.4 Bazı diatomların karbonhidrat içerikleri 44
Çizelge 6.5 Bazı diatomların lipit içerikleri 44
Çizelge 6.6 Varyans analizi sonuçları 48
Çizelge 6.7 PO_4 konsantrasyonları 52

ÖZET

DENİZEL DİATOM İZOLASYONU, TANIMLANMASI VE BESİN MADDELERİNİN DİATOM BÜYÜMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Sait ÇİNAR

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Didem ÖZÇİMEN

Eş Danışman: Doç. Dr. Mete YILMAZ

Mikroalgler son yıllarda oldukça dikkat çeken, biyoyakıt eldesinde, sağlık, gıda, kozmetik ve çevre alanlarında kullanılabilen çok değerli yeni nesil hammadde kaynaklarıdır. Bu çalışmada, ülkemiz deniz ve göllerinde çok miktarda bulunduğu düşünülen ve bir mikroalg çeşidi olan diatomların elde edilmesi, tanımlanması ve besin maddelerinin diatom büyümesi üzerine etkisinin incelenmesi hedeflenmiş, bu amaçla Marmara Denizi Mudanya kıyılarından toplanan su örnekleri üzerinde izolasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sonucu elde edilen izolatın yapılan DNA dizi analizi sonucunda *Pleurosigma sp.* olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmada izole edilen *Pleurosigma sp.* kromotografik, spektroskopik ve termogravimetrik olarak analiz edilmiş ve besin elementlerine verdiği tepkiyi gözlemlemek için farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış azot, fosfor ve silisyum içeren besin solüsyonlarında yetiştirilmiştir. İstatistiksel olarak diatomun hücre yoğunluğunun, silisyum ve azot ile belirgin şekilde pozitif korelasyon gösterdiği, ancak fosfor ile korelasyonunun seçilen fosfor aralığı için net olmadığı gözlenmiştir.

Pleurosigma sp.'nin yağ asidi profili kromotografik olarak incelendiğinde, literatürde diatomlarda sıklıkla karşılaşılan yağ asidi profiliyle örtüştüğü görülmektedir. Çalışmada izole edilen *Pleurosigma sp.*'nin yüksek silisyum içeriği ve spesifik yapısıyla biyosensör, filtrasyon, ilaç taşıma uygulamaları için malzeme üretiminde ve fosfor

konsantrasyonundaki değişimden kolay etkilenmesi sebebiyle çevresel kirlilik izleme uygulamalarında kullanılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Diatom, izolasyon, mikroalg, *Pleurosigma sp.*

ABSTRACT

MARINE DIATOM ISOLATION, IDENTIFICATION AND INVESTIGATION OF NUTRIENTS EFFECT ON THE DIATOM GROWTH

Sait ÇİNAR

Department of Bioengineering

MSc. Thesis

Adviser: Assoc. Prof. Didem ÖZÇİMEN

Co-Adviser: Assoc. Prof. Mete YILMAZ

Microalgae are very valuable, new generation raw material resources that have been attracting attention in recent years and can be used in the fields of health, food, cosmetics, environment and biofuels. In this study, isolation and identification of diatom, a kind of microalgae very common in the sea and lakes of Turkey, and investigation of nutrient effect on diatom growth were aimed. For this purpose isolation studies were carried out on the water samples collected from Mudanya shores of the Marmara Sea. Isolated species was identified as *Pleurosigma sp.* by DNA sequencing.

In this study, the diatom was grown in the presence of nitrogen, phosphorus and silica at different concentrations to observe its response to the nutrients and growth behavior of the diatom species was examined. Statistically, cell density of the diatom was positively correlated with silicon and nitrogen, however correlation with phosphorus was not clear in the phosphorous range setting.

When *Pleurosigma sp.*'s fatty acid profile was analyzed chromatographically, it overlapped with the fatty acid profiles of the frequently studied diatoms in literature.

Pleurosigma sp. which isolated in this study can be used in material production for biosensor, filtration, drug transport applications because of high silica content and its specific structure, and monitoring of environmental pollution with its phosphorous concentration sensitivity.

Keywords: Diatom, isolation, microalgae, diatom, *Pleurosigma sp.*

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Yeryüzünün en eski yaşam formlarından biri olan mikroalgler, genetik ve fenotipik çeşitlilikleriyle biyosferin neredeyse her yerinde bulunabilen, fototrofik, heterotrofik veya miksotrofik olarak yaşayan, genellikle basit morfolojide organizmalardır [1, 2, 3]. Yüksek büyüme hızları ve lipit içeriklerine sahip mikroalgler, uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri başta olmak üzere değerli ürünlerin üretimleri için alternatif kaynaklardır. Mikroalgler, yığın üretim için çevresel açıdan güvenli ve kontrol edilmesi kolay olacak şekilde süspansiyon olarak kültüre edilirler, bu sayede üretimlerinde daha az arazi kullanılır [4, 5, 6].

Okyanuslarda üretilen birincil karbonun en az % 30'undan sorumlu olan diatomlar ise genellikle 5-200 µm boyutunda olmakla birlikte 2 mm'den daha uzun da olabilen, tek hücreli mikroalg çeşididirler [7, 8]. Diatomlar; su saflaştırma ve filtrasyon prosesleri, biyomedikal, biyosensör ve ilaç taşıma gibi pek çok konuda uygulama alanına sahip olup, değerli yağ asitleri, antibiyotikler/antifungallar, enzim inhibitörleri, farmakolojik aktif bileşikler ve toksinler gibi önemli biyolojik bileşikleri de içermektedirler [9, 10].

Biyosferin her tarafına yayılmış mikoalgal çeşitlilik araştırmacılara, hedeflenen ürünü üretmek için; tatlı/ tuzlu su gibi yetiştirme ortamının ya da ototrofik/heterotrofik üretim gibi üretim şeklinin esnetilmesine olanak sağlayacak şekilde potansiyel birçok uygun suş sunar [11]. Tatlı su kaynaklarından, tuzlu sulara, çöllerden, buzullara çok farklı coğrafik şartlarda varlık gösterebilen mikroalgler sahip oldukları çeşitlilikle değerli ürünler eldesinde bilim insanları için çok önemli araştırma konusudur.

Biyoçeşitliliklerinin yanında mikroalgler, açık veya kapalı alanlarda kültüre edilebilmeleri, yüksek büyüme hızları ve yağ içeriklerine sahip olabilmeleri, ticari açıdan değerli ürünleri endüstriyel üretimde kolaylık sağlayabilecek şekilde spesifik olarak üretebilmeleri gibi pek çok avantaja sahiptirler [4, 5, 6].

Son yıllardaki çalışmalara bakıldığında, ürün hedefli olarak mikroalglerin farklı yetiştirme şartlarındaki büyüme parametrelerinin ve değerli ürün açısından hücresel kompozisyonlarının incelendiği, endüstriyel üretime uygunluklarının araştırıldığı görülmektedir. Araştırmalarda ulusal/uluslararası kültür koleksiyonlarından elde edilen ve yerel olarak izole edilen alg türleri kullanılmaktadır. Yerel izole türlerin bölgesel adaptasyonunun daha kolay olması, bilinen potansiyelden fazlasını vaat etmesi gibi sebepler araştırmacıları yerel türleri keşfetmeye iten sebeplerdir [12, 13]. Bu amaçla mikropipet ile izolasyon, dilüsyon, çöktürme gibi geleneksel izolasyon teknikleri [14] ve mikromanipülasyon, flow sitometri gibi ileri izolasyon teknikleri [15, 16] kullanılmakta bu tekniklere ilaveten antibiyotik ve filtrasyon gibi teknikler [14, 17] ile türler aksenik hale getirilmektedir.

1.2 Tezin Amacı

Tez çalışmasında; ülkemizin yerel alg kaynaklarının değerlendirilmesi kapsamında, Marmara Denizi Mudanya kıyılarından toplanan su örneklerinde diatom izolasyonu, izolasyon sonucu elde edilen izolatın moleküler tanımlanması, türün besin elementlerine verdiği tepkiyi gözlemlemek için farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış azot, fosfor ve silisyum içeren besin solüsyonlarında yetiştirilmesi, hücre yoğunluğu üzerine parametrelerin etkisinin faktöriyel tasarım yapılarak istatistiksel olarak yorumlanması, ve elde edilen türün yağ asidi profilinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

1.3 Orijinal Katkı

Tez çalışmasında Marmara Denizi Mudanya kıyılarından *Pleurosigma sp.* diatom izole edilmiş olup, literatürde bu yerel türün büyümesi esnasında, azot, fosfor ve silisyum gibi besin elementlerinin büyüme üzerine etkisinin faktöriyel tasarım metoduyla istatistiksel olarak incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmanın bu açıdan literatüre orijinal katkı yapacağı düşünülmektedir.

BÖLÜM 2

MİKROALGLER ve DİATOMLAR

2.1 Mikroalgler

Klofil a ve farklılaşmamış tallus içeren organizmalar olarak tanımlanan algler, gözle görülebilen makroalg ve mikroskop altında görülebilen mikroalg olarak iki temel gruba ayrılırlar [1]. Prokaryotik yada ökaryotik olabilen mikroalgler, yeryüzünün hemen hemen her noktasında bulunabilir, basit yapılarıyla dinamik ve kompleks yarışmacı çevrede, aşırı tuzluluk ve sıcaklık gibi sert iklim koşullarında, ışık ve besin eksikliği durumlarında hayatta kalabilirler [1, 18, 19]. Prokaryotik (Siyanobakter) hücreler membrana bağlı organellerden yoksun olarak alglerden ziyade bakterilere daha çok benzerken pek çok yaygın alg türünü içeren ökaryotik olanlar ise hücresel fonksiyonları kontrol eden organellere sahiptirler [2]. Diatomlar (*Bacillariophyceae*), yeşil algler (*Chlorophyceae*), ve altın sarısı algler (*Chrysophyceae*) doğada bulunma miktarı bakımından en önemli mikroalg gruplarıdır [20].

Mikroalgler farklı türde ürünlere hammadde olabilecek şekilde yüksek miktarda protein, lipit ve karbonhidrat içerebilirler [21] . Genellikle hücre kompozisyonları % 40-70 protein, %12-30 karbonhidrat, % 4-20 lipit ve %8-14 oranında karoten içerir, ancak hücresel içerik türden türe ve yetiştirilme şartlarına göre değişiklik gösterebilmektedir [12, 18].

2.1.1 Mikroalglerin Kullanım Alanları

Mikroalgler, yakıt, çevre, gıda, sağlık, kozmetik, materyal bilimi, gibi pek çok alanda kullanım alanı bulunan mikrofabrikalardır.

Mikroalgler, yüksek ve uygun lipit içerikleriyle biyodizel hammaddesi [22], anaerobik çürüme ile biyogaz hammaddesi olarak kullanılmaktadır [23]. Bazı mikroalg türleri, özellikle bebeklerde beyin ve göz gelişiminde önemli rolü olan [24], yetişkinlerde dolaşım sistemi hastalıkları ve psikiyatrik hastalıklara pozitif etki eden omega-3 yağ asitleri ve omega-6 yağ asitleri başta olmak üzere uzun zincirli yağ asitlerini önemli miktarda içermekte ve bu alanda ticari olarak kullanılmaktadır [25, 26].

Mikroalgler, gıda katkı maddesi, hayvansal besleme, kozmetik gibi alanlarda kullanılan karotenoid (β-karoten, astaksantin, lutein vb.), klorofil ve fikobiliprotein gibi pigmentler, [21, 27] A, B_1, B_2, B_6 B_{12}, biotin, folik asit gibi esansiyel vitaminler içerirler [12]. Yüksek protein içerikleri ve aktif peptitleri ile de algler, insan beslenmesinde kullanılan önemli hammaddelerdendir. Özellikle diatomlar özgün hücresel yapılarıyla filtrasyon, biyomedikal implantlar ve ilaç taşıma gibi alanlarda kullanım potansiyeline sahiptirler [9, 10, 18].

Çizelge 1.1 Bazı mikroalgler ve ticari uygulamaları [2]

Mikroalg	**Uygulama ve Ürün**
Spirulina	İnsan Beslenmesi Hayvan Beslemesi Kozmetik Fikobiliprotein
Chlorella	İnsan Beslenmesi Kozmetik Aquakültür (Balık Yetiştiriciliği)
Dunaliella salina	İnsan Beslenmesi Kozmetik B-Karoten
Aphanizomenon flos-aquae	İnsan Beslenmesi
Haematococcus pluvialis	Aquakültür Astaksantin
Crypthecodinium cohnii	DHA
Shizochytrium	DHA

2.1.2 Mikroalgal Biyokütle Üretimi

Mikroalglerden etkin biyokütle üretimi için türe ve şartlara uygun üretim teknolojisi kullanılması önem arz etmektedir. Genel olarak mikroalgler fototrofik, heterotrofik ve miksotrofik olmak üzere üç şekilde kültüre edilebilirler [28]. Fototrofik üretimde ışık enerji kaynağı olarak, CO_2 karbon kaynağı olarak kullanılır; heterotrofik üretimde organik maddeler enerji ve karbon kaynağı olarak kullanılırken; miksotrofik üretimde ise birincil enerji kaynağı için fotosentez gerçekleşse de hem organik maddelere hem de CO_2'e ihtiyaç duyulur [29].

2.1.2.1 Fototrofik Üretim

Fototrofik üretimde mikroalgler güneş ışığını enerji kaynağı olarak absorbe eder, havadaki CO_2 'i ve ortamdaki inorganik maddeleri kullanırlar [3]. Işığa bağımlılığın en yüksek olduğu bu üretim sisteminde ışığın algal büyüme için yeterli olması ve inhibisyona sebep olmaması gerekir. Fototrofik üretim ışık açısından biyokütle üretiminde sınırlamalara sahiptir [28] , ancak ticari ölçekte mikroalg yetiştirimi için fototrofik üretim yöntemi teknik ve ekonomik açıdan en uygun üretim yöntemi olarak görülmektedir [2]. Fototrofik olarak mikroalgler; doğal çevreye özdeş olan en eski ve kolay üretim sistemlerinden açık havuz sistemlerinde [30], sıcaklık, pH ve CO_2 gibi kültür şartlarının kontrol altında tutulduğu kapalı fotobiyoreaktörlerde [31, 32] veya her iki sistemin basamaklı olarak uygulandığı hibrit sistemlerinde [11, 33] yetiştirilirler.

2.1.2.2 Heterotrofik üretim

Heterotrofik üretimde türler, ışık varlığından bağımsız bir biçimde glikoz gibi organik maddeleri enerji ve karbon kaynağı olarak kullanarak karıştırmalı biyoreaktörde yetiştirilirler [34]. Heterotrofik üretimde, fototrofik üretimde kullanılan ortamlara ilaveten organik maddeler ortama eklenir. Büyüme için en önemli öğe karbon kaynağıdır. Kullanılan mikroalg türüne göre glikoz, früktoz, asetat, etanol, gliserol gibi farklı karbon kaynakları kullanılabilir [35].

Heterotrofik üretim, yüksek büyüme hızlarına ve hücre yoğunluğuna erişilmesi ve bu sayede hasat maliyetlerinin azalması, yüksek hacimsel üretimin mümkün olması,

mikrobiyal fermentörler gibi mevcut teknolojiye kolayca adapte edilmesi [34], ölçek büyütmeyi kolaylaştıracak şekilde ışıktan bağımsız olması, büyümenin sıkıca kontrol edilebilmesi vb. sebeplerden dolayı çeşitli avantajlara sahiptir [2, 34].

Heterotrofik üretim sistemleri, sınırlı sayıda türün heterotrofik olarak kültüre edilebilmesi, kullanılan organik maddelerden dolayı başka türlerle yarışma ve kontaminasyona sebep olabilmesi, organik maddelerde meydana gelen artışın büyümeyi inhibe etmesi, ışıkla indüklenen metabolitlerin üretimine elverişli olmamasıyla bazı kısıtlamalara sahiptir [36].

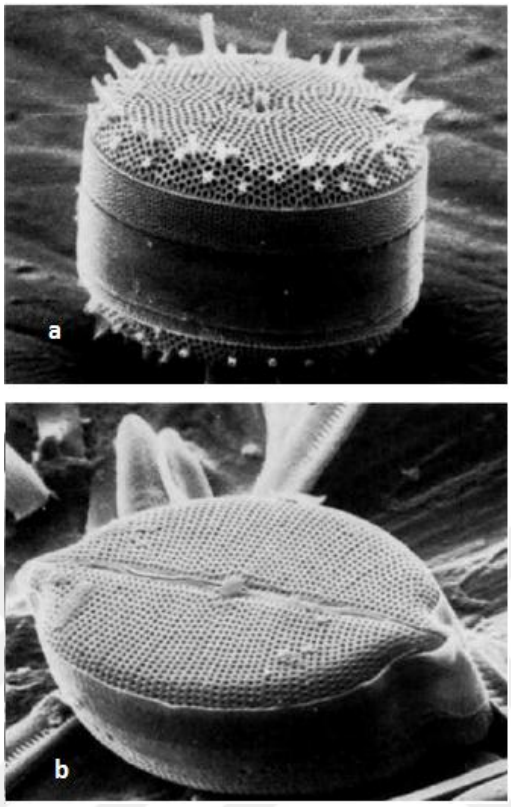
2.1.2.3 Miksotrofik Üretim

Miksotrofik üretimde mikroalgler ışık varlığına ve karbon kaynağının varlığına göre fototrofik, heterotrofik ya da her iki şekilde de büyüyebilirler [37]. Miksotrofik üretim sisteminde ışık, büyüme için sınırlayıcı bir faktör değildir ve organik karbon kaynağı büyümeyi destekleyebilir. Miksotrofik üretim, fototrofik ve heterotrofik üretimle karşılaştırıldığında fotoinhibisyonu engeller ve biyokütle ile yağ üretkenliği bakımından daha avantajlıdır. Fotosentezin ve organik maddelerin eş zamanlı kullanımı miksotrofik üretimi heterotrofik üretimden daha ekonomik hale getirebilir [28, 38].

2.2 Diatomlar

Okyanuslarda üretilen birincil karbonun en az % 30'undan sorumlu tutulan [8] ve yaklaşık 5-200 μm boyutlarına sahip tek hücreli mikroalg olan diatomlar [7] doğada, filamentli, hücre zinciri formunda, müsilaj tüpleri içerisinde düzenlenmiş halde birbirleriyle ilişkili halde, bir su kolonunda serbest halde veya bir zemine yapışık halde olacak şekilde bulunabilirler. Tutunma ve büyüme formları büyüdükleri zemine göre farklılık gösterir. Taş ve kayalıklarda büyüyen türler (epilitik) suların sürükleyici kuvvetine direnç gösterecek şekilde adapte olmuşlardır ve sıkı bir tutunma sağlayacak şekilde form oluştururlar. Katı partikül sürüklemesine maruz kalan yüzeyler yassı hücreleri tutar ya da burada tutunan hücreler güçlü bir şekilde yüzeye bağlanır. Bitki yüzeylerine tutunanlar (epifitik) konak organizmanın hidrodinamik korumasından faydalandıklarından daha az bağlıdırlar. Tortu tabakalarda yaşayan türler (epipelik) tutunma ihtiyacı duymasalar da hareket kabiliyetine gereksinim duyarlar. Kum taneleri

üzerinde yaşayan türler (epipsamik) harekete ve tutundukları materyalin aşınmasına direnç gösterebilmek için kum tanelerine sıkıca tutunurlar [39].



Şekil 1.1 Diatom Früstül Yapısı a. *Thalassiosira* früstülü b. *Mastogloia* früstülü. SEM [40]

Genel olarak diatomlar yapılarına göre radyal simetri gösteren sentrik diatomlar ve bilateral simetri gösteren pennat diatomlar olmak üzere ikiye ayrılırlar ve kayda değer oranda mekanik dayanıma sahip, früstül olarak adlandırılan silika yapılı hücre duvarı ile karakterizedirler. Früstül formları ışığın hücre içindeki kloroplasta ulaşmasına izin verecek şekilde saydam, gaz ve eriyiklerin hücre içine taşınmasına izin verecek şekilde delikli yapıdadır [40]. Bu hücre duvarları, epiteka ve hipoteka adında iki adet yarım yapının birbiriyle örtüştüğü ilaç kutusu ya da petri kabı benzeri bir yapıdadır. Teka yapıları, uçlarındaki epivalve ve hipovalve adındaki türe morfolojik özgünlük kazandıran iki kapakçıktan (*valve*) ve girdle elementleri olarak adlandırılan epicingulum ve hipocingulum'dan oluşur [4].

Diatomların, çeşitli lipit sınıfı içerikleri ve önemli miktarda amino asit ile vitamin içerikleriyle akuakültürde rotifer beslemesine uygun bir hammadde oldukları bilinmektedir [9, 42].

Türe ve yetiştirme koşullarına bağlı olarak diatomlarda meydana gelen farklı morfolojik yapıdaki silikonlu früstüller nanoteknoloji başta olmak üzere birçok endüstriyel ve teknolojik proseste kullanılabilir. Diatomlar; ağır metal absorpsiyonu gerektiren biyoremediasyon uygulamalarında, aşındırıcı olarak diş pastası vb. ürünlerde, deodorant içeriklerinde, renk giderici ajan olarak, su saflaştırma ya da kromotografik ayrımda kullanılan filtrasyon proseslerinde, biyosensör uygulamalarında (biyosensör içerisine giren molekülleri büyüklüğüne göre kontrol eden seçici sorbent olarak), makro gözenekli yapılarıyla biyomedikal implantlarda, immünoizolasyon uygulamalarında, nanomateryal mikro fabrikasyonunda, ilaç taşınımında kullanılabilir ve potansiyelleri çok farklı alanlarda değerlendirilebilir [9, 10]. Bunların yanında içeriklerinde yağ asitleri, antibiyotikler/antifungallar, enzim inhibitörleri, toksinler gibi ticari açıdan kıymetli pek çok biyolojik aktif bileşik vardır [9, 43].

1980 yılında ABD'de sucul türler programı kapsamında 3000 alg suşu üzerinde yapılan tarama sonuçlarına göre lipit içeriği açısından ticari üretim için potansiyel olabilecek türlerin %60'ının diatom türü olduğu belirtilmiştir [44]. Genel olarak diatomların toplam yağ asidi içeriğinin %25'inin çoklu doymamış yağ asitleri olduğu bilinmektedir, bu özellikleri diatomları ticari uygulamalar için çekici kılmaktadır. Biyodizel için de kullanıma uygun olabilecek diatom türleri bulunmakla beraber diatomlarda değerli yağ asitlerinden özellikle Eikosapentaenoik asit (EPA, 20:5 ω -3) ve araşidonik asidin (ARA, 20:4 ω-6) yer aldığı pek çok çalışmada gösterilmiştir [9, 42].

BÖLÜM 3

MİKROALG İZOLASYON ve TEMİZLEME YÖNTEMLERİ

Doğal ortamda birçok mikroorganizmayla karışık halde bulunan mikroalglerin bulundukları ortamdan ayrılıp tek bir tür halinde izole edilmesi ve izole edilen türün ileri seviyede temizleme işlemlerinin yapılması bir dizi işlemi gerektirir. İzolasyon için yaygın olarak geleneksel yöntemlerden; kültür zenginleştirme, mikropipet ile tek hücre izolasyonu, dilüsyon, santrifüj ve çöktürme gibi yerçekimi ile izolasyon yöntemleri, agar kullanarak izolasyon, fototaksis ile izolasyon yöntemleri ve/veya ileri otomatize yöntemlerden; mikromanipülasyon ve floresan aktif hücre ayrımı gibi yöntemler kullanılmaktadır. Genellikle en iyi sonucu almak için mevcut şartlara ve hedef hücre türüne uygun olarak izolasyon teknikleri birbiriyle kombine edilerek kullanılır [1, 45].

İzolasyonu yapılan türün ileri seviyede temizlenmesi ve aksenik hale getirilmesi için de izolasyon tekniklerinde kullanılan mikropipet ile izolasyon, dilüsyon, santrifüj, agar plaka gibi yöntemlerin yanında antibiyotik tatbiki, filtreleme, sonikasyon, vorteks gibi yöntemler birbirleriyle kombine edilerek kullanılmaktadır [17, 46].

Doğal ortamdan mikroalg izolasyonunda mikroalgal örneklerin toplanması önemli bir noktadır. Doğru örnekleme tekniği, örnekleme mevsimi, yaşam alanının değerlendirilmesi ve örneklerin korunması mikroalgal örneklerin toplanmasındaki temel faktörlerdir [1]. Örnekleme için genel olarak bıçak gibi kesici aletler, kavanoz, şişe gibi örnek toplama kapları, çözünmüş O_2 ve CO_2 analizörü, ışıkölçer, GPS cihazı, tuzluluk, pH, sıcaklık vb. değerlerin ölçümü için cihazlar gereklidir. Kaya gibi alanlardan

kazıma, yontma ve fırçalama gibi tekniklerle örnekler alınır. Göl gibi derin sulardan örnek alınırken en az üç farklı derinlikte örnek alınır [14, 47].

3.1 İzolasyon Yöntemleri

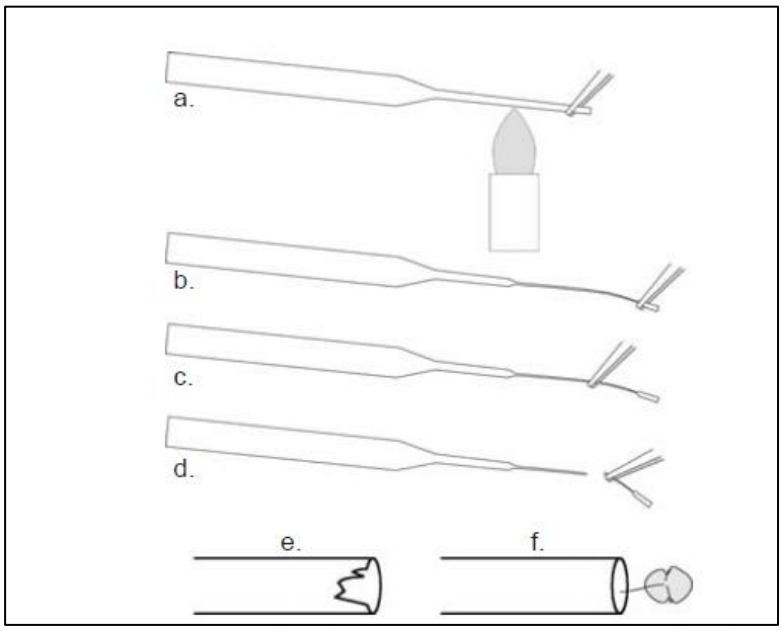
3.1.1 Geleneksel Yöntemler

3.1.1.1 Mikropipet ile Tek Hücre İzolasyonu

Mikropipetle tek hücre izolasyonu mikroskop altında genellikle bir pastör pipeti ya da cam kapiller ile gerçekleştirilir [1, 14, 45]. Pastör pipeti sol elde, cımbız sağ elde tutularak pipet ateşte ısıtılır, pipetin ucu yeterli yumuşaklığa geldiğinde cımbızla uç noktasından çekilerek uzatılır ve pipetin ucunda bir tüp biçiminin oluşması sağlanır. Uzayan tüp kısımdan cımbız ile tutularak kırılır ve pastör pipeti izolasyona hazır hale getirilir (Şekil 3.1) [14].

Mikropipet ile tek hücre izolasyonu metodunda karışık halde bulunan hücre kümesinden hedef hücre, mikropipetle bulunduğu ortamdan alınarak yeni, temiz bir damlaya transfer edilir ve ardından buradan alınarak tekrar temiz bir damlaya daha transfer edilir. Bu işlem hedef hücre diğer hücreler ve kontaminantlardan arındırılıncaya kadar tekrar edilir [14, 45].

Metot uygulanırken plastik, esnek bir hortumun bir ucu pastör pipetine takılır, diğer ucu ise ağza alınır. Pastör pipeti damlaya değdirilerek bir miktar sıvının tüp boyuca yukarı ilerlemesi sağlanır ardından dil hortumun ucuna değdirilerek sıvı pastör pipetinin ucunda tutulur. Mikroskopta yeri tespit edilen hücre, pastör pipetinin ucuna denk getirilip tek hücre olarak tüpe çekilir. Pipete alınan hücre temiz damlaya getirilip üfleme ile yeni damlaya transfer edilir. Temizleme işlemi biten hücre, petri kabı ya da çoklu plaka gibi nihai ortamına transfer edilir [14].



Şekil 3.1 Pastör pipetinden mikropipet yapımı a) Pastör pipeti ateşte tutulur. b) Cam yumuşayınca cımbızla ucundan tutarak uzatılır. c) Cımbız ile oluşan tüp formundan tutulur. d) Mikropipet oluşturmak için nazikçe kırılır. e)Pipet ucu dişli bir şekilde kırılmış, bu kırma kullanıma uygun değildir. f) Oldukça yumuşak şekilde kırılan uç kullanıma uygundur [14].

Mikropipet ya da kapillerden meydana gelen kayma stresi hücrelere zarar verebilir. Bu yüzden bu yöntem uygulanırken çok dikkatli olunmalıdır [1]. Transfer yapılacak pipet ucunun çapı hedef hücrenin çapından en az iki kat daha büyük olmalıdır. Küçük olması durumunda hedef hücre zarar görebilir çok büyük olması durumunda ise izolasyon işlemi zorlaşır. Transfer yapılan damlacıklar hücrenin kolayca hayatta kalmasına izin verecek ve hücreyi strese sokmayacak şekilde steril deniz suyu, steril havuz suyu yada kültür ortamı olabilir [14].

3.1.1.2 Kültür Zenginleştirme

Tek hücre izolasyonuna ön hazırlık olarak özellikle de hızlı bir şekilde besin alımı yapan ve hızlı büyüyen türlerin seçimi için kültür zenginleştirme metodu kullanılır [16]. Doğal ortamda mikroalglerin büyümesi için gerekli besin maddeleri diğer organizmaların fizyolojik faaliyetlerinden ya da geri dönüşümünden sağlanır. Ancak örnekleme yapıldığında mikroalg tarafından bu besin maddeleri temin edilemez ve mikroalgler ölebilir. Spesifik besleme ortamları, toprak ekstraktları, nitrat ve fosfat gibi besinler ve

iz metaller kültür zenginleştirmede kullanılır. Ayrıca maya ekstraktları ve kazein de ortamlara eklenebilmektedir [1].

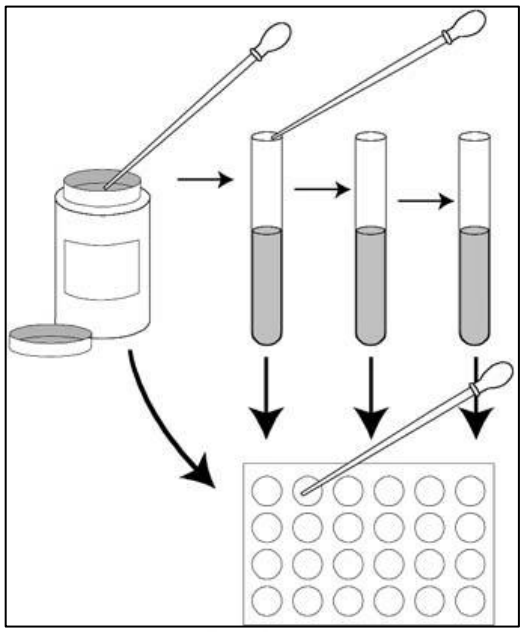
3.1.1.3 Agar Kullanarak İzolasyon

Çizgi plaka yöntemi kullanılarak mikroalg izolasyonu yaygın olarak kullanılan bir metottur [1]. Aseptik agar plakaları hazırlanır ve inokülasyon çubuğu marifetiyle alg örnekleri plaka üzerine çizgi şeklinde yayılır. Nihayetinde çoklu kültürden tek bir hücre kolonisi elde edilir [47]. Başka herhangi bir manipülasyon yada modifikasyon tekniğine gerek kalmadan aksenik kültürlerin izole edilebileceği en iyi yöntemdir. Kokoidler, diatomlar, toprak mikroalgleri, filamentöz algler ve küçük siyanobakteriler başta olmak üzere birçok alg türü için başarılı olarak kullanılabilir. Agar konsantrasyonu algal büyümede önemli rol oynamamaktadır ve % 0,8'den %2'ye kadar her orandaki agar konsantrasyonu agar yüzeyinde mikroalg büyümesi için yeterlidir [1].

Agar yüzeyinde değil içine gömülü olarak büyüyen mikroalg türlerinin izolasyonunda dökme plak yöntemi kullanılır. Bu yöntemde dökme agar içinde seyreltilen kültür plağa döküldüğünde ayrılma gerçekleşir [47].

3.1.1.4 Dilüsyon Teknikleri

Alınan örnekte daha yoğun olarak bulunan türlere uygulanırken etkili olan ancak daha az bulunan türler hedeflendiğinde etkinliği düşen bir yöntemdir. Yöntemde amaç çoklu tür içeren örneği, test tüpü, erlen ya da plakaya tek hücre olarak düşürmektir. Eğer hücre konsantrasyonu biliniyorsa tek hücre için gerekli dilüsyon hesaplanabilir. Eğer bilinmiyorsa 1:10 seri şeklinde tekrarlanan dilüsyon ile 5 ya da 6 dilüsyonda muhtemelen tek hücreye ulaşılacaktır (Şekil 3.2). Dilüsyon; kültür ortamı, distile su, deniz suyu, örnek ortamından alınan suyun filtre edilmesiyle hazırlanan su ya da bunların kombine edilmesiyle oluşacak sularla yapılabilir [14].



Şekil 3.2 Dilüsyon tekniğinin gösterimi. Örnek kavanozdan (sol) bir miktar alınıp steril ortam içeren test tüpüne konulur. Karıştırıldıktan sonra çoklu plakaya dağıtılır. Ardından birinci tüpten alınan bir miktar örnek ortadaki tüpe konulup karıştırılır ve çoklu plakaya dağıtılır. Her bir döngü orijinal örneği seyreltir. Bu işlem muhtemel olarak transfer edilecek hücre kalmayana kadar devam ettirilir.

3.1.1.5 Yerçekimi İle İzolasyon

Yerçekimsel ayrım ile büyük ve küçük organizmalar birbirinden ayrılabilir. Yöntemde büyük ve ağır olan mikroalgleri daha küçük mikroalgler ve bakterilerden ayırmak amaçlanır. Ayrım için santrifüj veya çöktürme yapılır. Santrifüjde silika çözeltisi gibi yoğunluk gradienti oluşturan çözeltiler yardımıyla türler bariz bantlar halinde ayrılabilirler. Çöktürme işlemi de yüzemeyen, daha ağır ve büyük hücrelere uygulanır. Her iki yöntem de genellikle tek hücre izolasyonu yapmak yerine hedef organizmayı konsantre hale getirmek için kullanılan yöntemlerdir ve diğer izolasyon teknikleriyle kombine edilerek kullanılırlar [45].

3.1.1.6 Fototaksis ile İzolasyon

Fototaktik flagellatlar için uygun olan bu yöntemde, ışığa yönlenen organizmanın izolasyonu yapılır. İçinde az miktarda steril ortam bulunan kabın kenarına hücreler mikropipetle bırakılır. Hücreler ışıklandırma yapılan taraftan karşı tarafa doğru göç

ederler ve bu sayede ayrımı yapılan hücreler mikropipet ile yeni temiz bir ortama alınırlar. Bu işlemin defalarca tekrar edilmesi ile bakterisiz izolatlar elde edilir [48].

3.1.2 İleri İzolasyon Teknikler

3.1.2.1 Mikromanipülasyon

Kompleks bir karışımdan hedef tek hücreyi izole etmeye imkân veren bir metottur. Ters faz mikroskopa monte edilmiş mikromanipülatörle gerçekleştirilir. Çok küçük hücrelerin izole edilebildiği bu sistemle kapiller araçlar pnömatik ya da ya hidrolik basınç ile hızlı ve doğru konumlanmayı sağlarlar. 400X ile 1000X 'e kadar büyütme yapılarak gerçekleştirilen teknikte hücrelerin görsel olarak kontrol edilerek tek bir hücrenin izole edilmesi ve bu sayede geleneksel metotlara göre kısa sürede saf kültür elde edilmesi sağlanır [15].

3.1.2.2 Flow Sitometri

Floresans aktif hücre ayrımı *(Fluorescence activated cell sorting-FACS)* mikroalg türünü orijinal örnekten ayırıp saf kültür elde etmek için kullanılan hızlı bir yöntemdir. Verimliliğinin yüksek olması ve yüksek çıktılara sahip olmasından dolayı teknik izolasyonda yaygın olarak kullanılmaktadır [16].

Floresans aktif hücre ayrımı ile hücreler, ışıklandırılan alandan akarak büyüklük, şekil ve floresans tepkisine göre birbirinden ayrılırlar [49, 50]. Bu şekilde aksenik kültür için ihtiyaç duyulan ayrım yapılmış olur. Geleneksel izolasyon yöntemleriyle karşılaştırıldığında başarı oranı oldukça yüksektir. Bu yöntemle *Chlamydomonas sp., Chlorella sp.*, *Coelastrum sp., Scenedesmus sp.* gibi birçok mikroalg türü aksenik olarak kontaminantlardan arındırılmıştır. Hücreler akışkan ivmelenmesi, elektrik/mekanik şok ya da optik stresten dolayı zarar görüp ölebilir. Ayrım yapıldıktan sonra yeterli hücrenin yaşamasını garanti etmek için örnekte 100'den fazla hücre olması tavsiye edilmektedir [50].

3.2 Temizleme Teknikleri

İzolasyonda kullanılan mikropipet ile ayrım, dilüsyon, santrifüj, agar plaka gibi yöntemler izole edilen kültürün temizlenmesi aşamasında da benzer şekilde kullanılır. Bu yöntemlerle beraber kültüre antibiyotik tatbiki, boyut seçici filtreleme, sonikasyon, vorteks gibi yöntemler birbirleriyle kombine edilerek kullanılarak alg kültürü bakteri ve diğer kontaminantlardan arındırılır.

3.2.1 Antibiyotik Kullanımı

Aksenik kültür elde etmek için 1950'lerden beri uygulanan antibiyotik tatbiki yöntemi ile kültürdeki istenmeyen bakteriler öldürülebilir ancak kültürdeki hedef alg türünün zarar görmeyeceği ya da değişime uğramayacağının garantisi yoktur. Birçok bakteri türünün antibiyotik hassasiyeti mikroalglerden daha düşüktür bu durum onların kültürden elimine edilmesini olanaklı kılar, ancak bakteri türlerinin antibiyotiğe ya da antibiyotik karışımına direnci değişkenlik göstermektedir. Aynı durum alg türleri için de geçerli olup oldukça yakın türlerin antibiyotik dirençliliği birbirinden çok farklı olabilmektedir [17].

Hedef alg türünün minimum seviyede zarar görmesini sağlamak için mümkün olan en az miktarda antibiyotik kullanımı ve en az tatbik süresi arzu edilir. Antibiyotik çeşitlerinin etki mekanizmaları farklı olduğundan uygulanacak kültürdeki bakteri türünün bilinmesi hangi antibiyotik karışımının kullanılacağını karar vermede yardımcı olabilir [51].

İzolasyon için antibiyotik tatbikinde üç yaklaşım yöntemi izlenebilir. Birincisinde antibiyotik, mikropipetle izolasyona ilave olarak kullanılır. Sağlıklı olan ve hızlı bir şekilde büyüyen alg kültürü test tüplerine bölünerek standardın altında ve standardın dört katına kadar üstünde değişen konsantrasyonlarda antibiyotik karışımı bu test tüplerine konur ve kültür 18-72 saat boyunca antibiyotiğe maruz bırakılır. Antibiyotik tatbik edilen test tüplerinden 15, 24, 36, 48 saat gibi aralıklarla antibiyotik içermeyen yeni ortama mikropipet ile bir ya da birkaç tane mikroalg transferi yapılır [14].

İkinci yaklaşımda güçlü bir antibiyotik karışımı hazırlanarak yarı yarıya indirmek suretiyle altı kere seyreltilir. Bir miktar organik madde ile birlikte 6 farklı

konsatrasyondaki antibiyotik karışımı, altı adet hedef mikroalgi içeren test tüpüne konur. 24-48 saat inkübasyona bırakılan türler inkübasyon sonrasında temiz kültür ortamına transfer edilir [14, 17].

Üçüncü yaklaşımda ise alg kültürü hayatta kalabileceği konsantrasyonlarda farklı antibiyotikleri içeren ortamlara seri bir şekilde sırayla transfer edilir ve hayatta kalabilen alg türü bakteriden arındırılmış olur. Bu yöntem algler için daha az toksik olması, bir antibiyotik türünde ölmeyen bakterinin diğer türde ölmesi, antibiyotik türüne direnç gösteren bakterilerin çoğalması için o tüp içerisinde bırakılmayıp diğer tüpe aktarılmasıyla avantajlıdır [14].

3.2.2 Filtrasyon Metodu

Birçok mikroalg türü heterotrofik bakterilerden büyük olduğundan filtreleme işlemi, kültürü istenmeyen prokaryot ya da mayalardan arındırmak için çeşitli seviyelerde kullanılabilir. Hedef türün büyüklüğüne göre 0.2 µm'den 10 µm'ye kadar farklı por büyüklüğüne sahip filtreler bir ya da birkaç kere kullanılarak kültür temizlenebilir. Bu metotta hedef mikroorganizmanın boyutunun hemen altındaki filtre kullanılarak istenmeyen küçük türler filtreden geçirilir ve hedef organizma filtreye takılır. Ardından steril su ya da kültür ortamı ile yıkama işlemi yapılarak kontaminantlar gönderilir ve filtre büyüyebileceği ortama alınır [14, 46].

3.2.3 Sonikasyon ve Vorteks

Kompakt algal kolonilerden, algal yığınlardan ya da nemli topraklardan alınan örnekler neşter, iğne, cımbız gibi aletlerle parçalanır ve ayrılır, bununla beraber gereken durumlarda örnekler vorteks yapılabilir, homojenizatörlere konulabilir. Burada amaç manipüle edilebilir alg elde etmektir. Manipülasyona hazır hale gelen alg kültürü uygun şiddet ve süreyle sonikasyona maruz bırakılıp santrifüj edilirse mikroorganizmalar diğer kontaminantlardan izole edilip temizlenebilir. Ancak vorteks ve sonikasyon mikroorganizma üzerinde stres yaratacağından hücreler zarar görebilir [14].

BÖLÜM 4

MİKROALGAL BÜYÜMEYİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER

4.1 Besin

Azot, fosfor, silisyum gibi makro besinler, -özellikle de demir [52] gibi- çeşitli iz elementleri ifade eden mikro besinler, tiyamin (B1), siyanokobalamin (B12) ve biotin gibi vitaminler diatom büyümesi için gerekli olan besin elementleridir [9]. Algal biyoteknolojide yüksek hücresel verim elde etmek için kültüre uygun miktarda ve lipit, pigment vs. birikimine sebep olan stres koşulları gibi özel amaçlar dışında büyümeyi sınırlandırmayacak miktarda besin temini önem arz eder [53].

4.1.1 Azot

Genellikle deniz ekosistemde [54] sınırlayıcı faktör olarak bulunan azot, hücre büyümesi ve algal metabolizma için önemli makro besinlerden biridir. Algal hücrelerin tüm yapısal ve fonksiyonel proteinlerinin ve nükleik asitlerinin oluşumunda yer alan temel besindir, hücre kuru ağırlığının % 7-20'sini oluşturur [55]. Alg tarafından alınan inorganik azot biyokimyasal olarak aktif bileşiklere çevrilir ve değişen fizyolojik ihtiyaçları karşılamak için kullanılır [55, 56, 57].

Mikroalgler azot kaynağını, NH_4^+, NO_3^-,NO_2^-, NO ve bazı durumlarda N_2 gibi inorganik formda ya da üre, amino asit gibi organik formda kullanabilirler. NO_3^- en stabil iyonik form ve fazla miktarda bulunan azot formu olmasına rağmen NH_4^+ algler tarafından en çok tercih edilen formdur ve hücre içine alımı için daha az enerji gerektiğinden enerji

açısından en verimli olanıdır [36, 58]. Ancak diatomlar diğer türlerden farklılık göstererek NO_3^-'ı tercih ederler [59].

Büyüme ortamında azot kaynağı olarak yalnız NH_4^+ kullanıldığında H^+ iyonları salındığından aktif büyüme fazında pH belirgin bir şekilde düşebilir. Aynı şekilde yalnız NO_3^- kullanıldığında pH yükselir [53]. Azot kaynağı olarak NH_4^+ kullanıldığında, bu bileşik kültür ortamında NH_3 ile denge halinde bulunur ve bu denge durumu pH yükseldiğinde mikroalg için toksik olan NH_3 lehine kayar ve mikroalg için ölümcül olabilir. NO_3^- ile karşılaştırıldığında azot kaynağı olarak NH_4^+ kullanımında elde edilen mikroalgal büyüme hızları benzerdir [60].

Azot yoksunluğu ile hücresel lipit [61, 62] ve triaçilgliserol (TAG) [63], B-karoten ve astaksantin gibi karotenoid [64, 65], karbonhidrat [66] biyosentezi/birikimi artarken, buna karşılık protein üretiminde [67] azalma meydana gelir. Azot yoksunluğunda lipit ya da karbonhidrattan hangisinde birikim meydana geleceği aynı cinsin farklı suşlarında farklılık gösterebilmektedir [68].

4.1.2 Fosfor

Fosfor, mikroalgal büyüme ve biyokütle üretimi için en önemli besin maddelerinden biridir [60] ve genellikle tatlı sularda [69] olmak üzere doğada sıklıkla büyümeyi sınırlandırıcı faktör olarak bulunur [70]. Fosfor, metabolizma için hayati öneme sahip nükleik asit, membran fosfolipitleri ve ATP gibi organik moleküllerin temelidir[71].

Fosfor doğada ortofosfat, polifosfat, pirofosfat, metafosfat formları ya da bunların organik formları [60] halinde bulunabilir ancak mikroalgler için tercih edilen formu ortofosfat (PO_4^{-3}) formudur ve hücre içine alımı enerji gerektirir [53]. Mikroalgler tipik olarak kuru ağırlıkça %1 oranında fosfor içerirler ancak bazı durumlarda gerekli olan fosfordan fazlasını ihtiyaç duymaları halinde kullanmak üzere polifosfat olarak depo edebilirler [72].

Hücre içine fosfor alımı, hücre kondisyonundan ve ışık (enerji), pH, sıcaklık, tuzluluk ve K^+, Na^+, Mg^{+2} vb. iyonların varlığı gibi çevresel etmenlerden etkilenir. Fosfor alımıyla ilgili enzimler fosfor ortamda az bulunduğunda artar [60]. Yapılan bazı çalışmalarda

[73] fosforun organik olarak alım hızı ortofosfat formunda alım hızından daha az olarak bulunurken, bazı çalışmalarda [74] ise alım hızının neredeyse eşit olduğu bildirilmiştir.

Fosfat limitasyonu, Kelvin döngüsündeki substratların sentez ve yenilenmesinde düşüşe neden olarak karbon fiksasyonu için gerekli olan ışık kullanımının azalmasını sağlar [55]. Fosfor limitasyonu ile hücrenin klorofil a ve protein içeriğinde azalma meydana gelirken karbonhidrat içeriğinde artış [75] ve hücre içinde lipit [76], astaksantin (*Haematococcus pluvialis)* [77] birikimi gerçekleşir.

4.1.3 Silisyum

Mikroalgal büyüme için önemli olan azot ve fosfora ilave olarak diatomlar, silisyuma ihtiyaç duyarlar [78, 79]. Silisyum, früstül olarak adlandırılan diatom hücre duvarının ana maddesidir [80]. Früstül yapılarının haricinde hücresel metabolizma için önemli olan bazı proteinlerin sentezinde, sitrik asit döngüsünde, klorofil sentezinin regülâsyonunda yer alır [81]. Diatomlar için silisyum kaynağı çözünmüş silisilik asittir ($Si(OH)_4$) [82]. Bu silisyum formu ortamda düşük konsantrasyonda bulunduğunda taşıyıcı proteinler yardımıyla içeri alınırken yüksek miktarda bulunduğunda ise pasif taşıma ile difüze edilir [83].

Ortamda silisyum konsantrasyonu düşük, diğer besinler yeterli olduğunda hücre çevrimi yavaşlar, bu şekilde hücre bölünmesi tamamen duraksamaz fakat daha yavaş gerçekleşir. Hücre çevrimini yavaşlatan diatomlar, komşu bireylerin früstüllerinde çözünen biyojenik silikattan veya doğada ortaya çıkacak başka silikat kaynaklarından yararlanırlar [84].

Silisyum yoksunluğunda diatomlarda lipit birikimi [85] ve ω-3 yağ asidi olan EPA birikimi [86] gözlenmiştir. Silisyum sınırlı kültürlerde hücre içine silisyum alımı için harcanan enerjinin lipit birikimine harcandığı görülmektedir [87].

4.2 Işık

Mikroalgler, fotosentez yapmak için ışığa gereksinim duyarlar ancak yeryüzüne düşen solar radyasyonun %45'ine denk gelen fotosentetik aktif radyasyonu

(photosynthetically active radiation-PAR-) kullanabilirler. Bu radyasyon görünür ışığa yakın 400-700 nm aralığındaki dalga boyuna denk gelir [88].

Aydınlatma kaynağı, ışık yoğunluğu, dalga boyu gibi ışıkla ilgili değişkenler büyümeyi etkiler. Işık yoğunluğunun artması fotosentez verimliliğini ve algal büyümeyi arttırırken aşırı miktarda ışık fotosentezde gerekli olan elektron transfer proteinlerine zarar vererek fotoinhibisyon meydana getirir ve mikroalgal verimliliği azaltır. Mavi ya da kırmızı ışık spektrumu fotosentez için tercih edilir [89, 90].

Mikroalg kültüründe doğal gün ışığı ya da yapay ışıklar kullanılabilir. Gün ışığı bol ve ucuz olmasıyla tercih sebebiyken büyük ölçekli üretimde kültürün yoğunluğunun artması gün ışığının penetrasyonunu zorlaştırır. Bu durumda ışık, fotobiyoreaktörlerde limitleyici faktör haline gelir. Yapay ışık kullanımı ise stabil olması, kolay kontrol edilebilirliği ve fotobiyoreaktörlere uygulanabilir olmasıyla avantajlı olmakla birlikte maliyet açısından dezavantaja sahiptir [90].

4.3 Sıcaklık

Sıcaklık algal büyümeyi, hücre büyüklüğünü, biyokimyasal kompozisyonu ve besin ihtiyacını etkileyen en önemli parametrelerden biridir. Optimal sıcaklığın altında büyüme hızı sıcaklıkla beraber artarken optimum sıcaklığın üzerine çıktığında büyüme belirgin derecede azalır [55]. Birçok mikroalg türü 15^{o}C - 30 ^{o}C gibi geniş bir sıcaklık aralığında büyüme gösterirken optimal büyüme sıcaklığı genellikle 20^{o}C ile 25^{o}C arasındadır. Her mikroalg türü farklı optimal büyüme sıcaklığına sahiptir ancak çevresel şartların değişimi ile optimal büyüme sıcaklığı da değişebilir [91].

Optimum sıcaklığın altındaki sıcaklıklarda sitoplazmik viskozitenin değişiminin karbon ve azot kullanımının verimliliğini düşürdüğü düşünülmektedir. Ayrıca düşük sıcaklık, algal büyüme hızını etkileyen fotoinhibisyonda çeşitli mekanizmalarla rol oynamaktadır. Optimum sıcaklığın üstündeki sıcaklıklarda protein sentez hızı düştüğünden büyüme hızı azalır [55]. Morris vd. [92] denizel diatom türü olan *Phaeodactylum tricornutum* ile yaptıkları çalışmada gece düşük sıcaklıklarda protein sentez hızının daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Sıcaklık değişimleri membrandaki yağ asitlerinin doymamışlık seviyelerini etkiler. Düşük sıcaklıklarda hücre membranındaki akışkanlık azalır ve hücre bu durumu telafi etmek için doymamış yağ asitleri miktarını arttırarak hücre zarındaki akışkanlığı arttırır [55].

4.4 pH

pH mikroalg büyümesini ve hücre kompozisyonunu etkileyen faktörlerden biridir ve optimum değeri mikroalgler arasında büyük farklılıklar gösterebilmektedir. Birçok alg türü pH 7-9 aralığında kültüre edilirken, bazı türler için optimum pH daha düşüktür [89, 93]. Denizel diatomlar genel olarak alkali ortamları tercih ederek pH 8.1 civarında optimum büyüme gösterirler ve pH 8.5-9 üzerinde denizel diatomların büyümeleri kaydedeğer ölçüde düşer [94, 95]**.** Tatlı su diatomları ise daha asidik (pH 5-7.6) ortamları tercih ederler [96]. Yüksek alg yoğunluğuna ulaşıldığında optimum değerin üstüne çıkan pH değerini düzeltmek için CO_2 beslemesi yapılır [89]. pH seviyesindeki değişim sadece algal büyümeyi değil aynı zamanda membran transport prosesini, membran konformasyonunu ve enzimlerin çalışma etkinliğini etkileyerek metabolik süreçleri de etkiler [97].

4.5 Tuzluluk

Tuzluluk mikroalgal büyümeyi ve hücre içi kompozisyonu etkileyen parametrelerden bir diğeridir [55]. Her bir mikroalg türünün yaşayabildiği kendi tuzluluk konsantrasyonu vardır. Genel olarak denizel mikroalgler tuz konsantrasyonunu tatlı su alglerine göre daha iyi tolere ederler [98]. *D.salina*, *Tetraselmis sp.* gibi bazı türler yüksek tuzlulukta yaşama kabiliyetleriyle diğer türlere seçici avantaj sağlarlar. *Tetraselmis sp.* gibi bazı türler tuz konsantrasyonundaki ani ve kademeli değişimlere adaptasyonu sağlayacak mekanizmalara sahiptir [29]. Tuz konsantrasyonundaki değişiklikler algleri üç şekilde etkileyebilir: ozmotik stres, iyon (tuz) stresi ve membran seçici iyon geçirgenliğinden dolayı hücresel iyon oranındaki değişiklikler [99].

4.6 Karıştırma/Havalandırma

Karıştırma, algal hücreleri süspansiyonda tutarak, termal tabakalaşmayı ortadan kaldırarak, besin dağılımını sağlayarak, gaz değişimini sağlayarak ve kültürün aydınlık/karanlık bölgelerini karıştırıp gölgeleme derecesini azaltıp fotoinhibisyonu azaltarak mikroalgal büyüme üzerine önemli şekilde etki eder [100, 101, 102]. Ancak kültürün yoğunluğu ve kültüre düşen ışığın yoğunluğu az ise karıştırmanın pozitif etkisi daha az olacaktır [103].

Kullanılan biyoreaktör tipine göre açık havuz sistemlerinde pedal [104], karıştırmalı tank sistemlerde pervane [105] , borusal fotobiyoreaktörlerde kabarcık [106], ya da baloncuk fotobiyoreaktörlerde bölme gibi sistemlerle karıştırma yapılır [107]. Hava ile yapılan karıştırmada CO_2 ile zenginleştirilmiş hava aynı zamanda pH dengelemeye yardımcı olur.

Karıştırma seviyesi dikkatli bir şekilde optimize edilmelidir çünkü fazla karıştırma kayma stresi meydana getireceğinden hücresel ölüme sebep olur [100]. Biyoreaktörlere küçük miktarda eklenen boya gibi izlenebilir maddeler ile ideal karıştırma süresi takip edilebilir [101].

BÖLÜM 5

MATERYAL ve METOT

5.1 Materyal

5.1.1 Mikroalg

Çalışmada 11.12.2016 tarihinde Marmara Denizi Mudanya kıyılarından yapılan örneklemeden izole edilen diatom kullanılmıştır. İzole edilen diatomun moleküler tanımlaması sonrası belirlenen türünün sınıflandırılması aşağıda verilmektedir:

Pleurosigma sp.'nin Sistematik Sınıflandırılması

Âlem (Kingdom): Chromista

Alt Âlem (Subkingdom): Harosa

Şube (Phylum): Ochrophyta

Alt Şube (Subphylum): Khakista

Sınıf (Class) : Bacillariophyceae – Diatoms

Alt Sınıf (Subclass): Bacillariophycidae

Üst takım (Superorder): Bacillariophycanae

Takım(Order): Naviculales

Aile (Family): Pleurosigmataceae

Cins (Genus): Pleurosigma sp. [108]

5.1.2 Kültür Ortamları

Çalışmada 27 ve 37 ppt tuzluluk değerlerinde hazırlanmış L1 kültür ortamı kullanılmıştır.

5.1.3 Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar

Çalışmada kullanılan cihaz ve ekipmanlar Çizelge 5.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 5.1 Çalışmada kullanılan cihaz ve ekipmanlar

Adı	**Marka/Model**
TGA Cihazı	TA Instrument (SDT Q600)
FTIR Spektrofotometre	Bruker (Alpha)
UV Spektrofotometre	Vwr (UV-1600PC)
GC-FID	YL Instruments (6100 GC)
Termal Cycler	BioRad (T100)
Sanger Dizileme Cihazı	ABI (3130 XL)
İnkübatör	Panasonic
Otoklav	Hmc Hiroyama (HV-50L)
Mikroskop ve fotoğraf çekim aparatı	Olympus (CKX41)
Biyogüvenlik kabini	Telstar
Saf su cihazı	Merck
Dondurucu	Siemens
Etüv	Test (T420 S)
pH metre	WTW (3110)
Işıkölçer	LI-COR (LI-1500)
Tuzluluk ölçer	Ysi
Analitik terazi	KERB (PFB 300-3)
Manyetik karıştırıcı	IKA (C-MAG HS 7)
Hava pompası	Millipore(WP6122050)
Rotary Evaporatör	Stuart (RE300)

5.1.4 Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar Çizelge 5.2'de gösterilmektedir.

Çizelge 5.2 Çalışmada kullanılan kimyasallar.

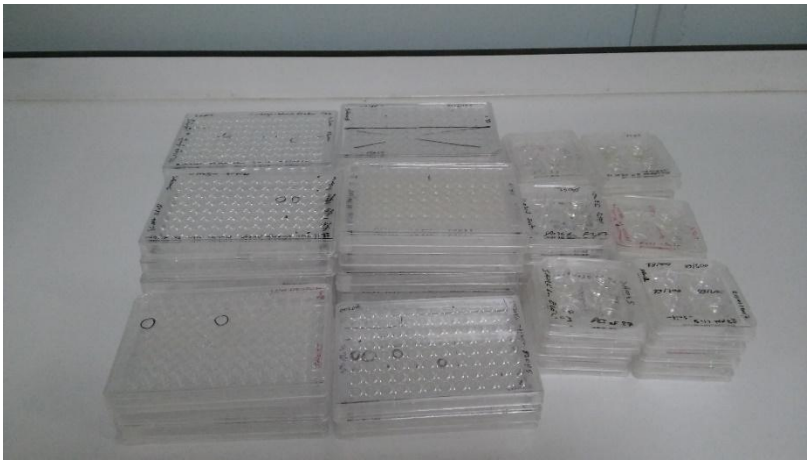
Adı	**Marka**
Agaroz	Merck
İzoporpanol	Panreac
$Na_2EDTA.2H_2O$	Merck
$FeCl_3.6H_2O$	Merck
$MnCl_2.4H_2O$	Merck
$ZnSO_4.7H_2O$	Merck
$CoCl_2.6H_2O$	Merck
$CuSO_4.5H_2O$	Merck
$Na_2MoO_4.2H_2O$	Alfa Aesar
Na_2SeO_3	Merck
$NiSO_4.6H_2O$	Alfa Aesar
Na_3VO_4	Merck
K_2CrO_4	Merck
$NaNO_3$	Merck
$NaH_2PO_4.2H_2O$	Aldrich
$Na_2SiO_3.9H_2O$	Merck
C_6H_6O	Merck
H_2SO_4	Merck
NaCl	Merck
Thiamine HCl (B1)	
Cyanocobalamin (B12)	

5.2 Metot

5.2.1 Tür İzolasyonu

Yürütülen tez çalışmasındaki diatom izolasyonu, Bursa Teknik Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü'nde Aquameb Laboratuvarında (*Aquatic Microbial Ecology and Biotechnology Research Laboratory)* gerçekleştirilmiştir. 11.12.2016 tarihinde Marmara Denizi Mudanya kıyılarından alınan örnekler bir saklama kabına konularak laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvara getirilen örneklerin bazıları doğrudan bazları ön santrifüjleme yapılarak yoğunlaştırıldıktan sonra -alınan bölgedeki tuzluluk değerlerine yakın olması amacıyla- 27 ppt ve 37 ppt tuzluluktaki iki farklı L1 ortamıyla çoklu (96'lı) mikroplakaya 1:10 seyreltme oranıyla seyreltilerek ekimleri yapılmış ve ardından 12:12 aydınlık karanlık rejiminde inkübatöre koyulmuştur. İzolasyonda hedeflenen türün diatom olmasından dolayı kültür ortamı silisyum içerecek şekilde seçici olarak hazırlanmıştır.

Büyüme gözlenen 27 ppt L1 ortamını içeren çoklu plakadan tek hücre izolasyonu yapılmıştır. Tek hücre izolasyonu plakada büyüme gösteren örnekten bir miktar alınarak ters faz mikroskop altında gerçekleştirilmiştir. Lama alınan örnek mikroskopta göz ile kontrol edilerek mikropipet ile tek bir hücre şeklinde alınıp temiz ortam içeren lama transfer edilmek suretiyle yıkanmıştır. Bu işlem tek bir hücrenin bulunduğu ortam bakımından temiz olduğundan emin olunana kadar tekrar edilmiş ve nihayetinde temizlenen hücre, çoklu plakanın bir kuyusuna ekilerek inkübatöre konulmuştur.



Şekil 5.1 96'lı ve 4'lü plakalar içersinde izolasyonu yapılan diatom örnekleri

Mikroskop altında incelenen çoklu mikroplakalardan iyi olduğu gözlemlenen kuyular temizlenmek ve seyreltilmek suretiyle tekrar ekilmiş ve kültürlerin hayatta kalması sağlanmıştır. 96'lı plakada büyüme gösteren türler daha fazla besin solüsyonu koyulabilen 4'lü plakalara alınmış ve burada da büyüme gösteren türler 50 ml'lik falkon tüpte 15 ml ortam olacak şekilde kültüre edilerek büyütülmüştür. Bakteriyel kontaminasyon içeren falkonlarda çöken hücreler mikropipetle yeni ortam içeren temiz falkon tüpe alınarak bir temizleme safhası daha gerçekleştirilmiştir.



Şekil 5.2 Marmara Denizi Mudanya Kıyılarından İzole edilen diatom kültürü

5.2.2 Kültür Ortamlarının Hazırlanması

Ortam hazırlamada kullanılacak deniz suyu Marmara denizinden alınıp 2 µm'lik filtrelerden 3 kere 0,2 µm'lik filtrelerden 2 kere süzülerek otoklavlanmıştır.

Tez çalışmasında kullanılan L1 ortamındaki iz elementleri solüsyonunu hazırlamak için Çizelge 5.3'de verilen kimyasal maddeler belirtilen son konsantrasyona sahip olacak

şekilde bir miktar distile suda çözdürülmüş, ardından 1L'ye tamamlanarak otoklavlanmıştır.

Çizelge 5.3 İz element solüsyonu hazırlamak için gerekli bileşenler [14]

Bileşen	**Stok solüsyon** ***(g · L^{-1} dH$_2$O)***	**Miktar**	**Son konsantrasyon (M)**
$Na_2EDTA.2H_2O$	-	4.36 g	1.17 x 10^{-5}
$FeCl_3.6H_2O$	-	3.15 g	1.17 x 10^{-5}
$MnCl_2.4H_2O$	178.10	1 mL	9.09 x 10^{-7}
$ZnSO_4.7H_2O$	23.00	1 mL	8.00 x 10^{-8}
$CoCl_2.6H_2O$	11.90	1 mL	5.00 x 10^{-8}
$CuSO_4.5H_2O$	2.50	1 mL	1.00 x 10^{-8}
$Na_2MoO_4.2H_2O$	19.90	1 mL	8.22x 10^{-8}
Na_2SeO_3	1.29	1 mL	1.00 x 10^{-8}
$NiSO_4.6H_2O$	2.63	1 mL	1.00 x 10^{-8}
Na_3VO_4	1.84	1 mL	1.00 x 10^{-8}
K_2CrO_4	1.94	1 mL	1.00 x 10^{-8}

L1 ortamında kullanılmak üzere vitamin karışımı Çizelge 5.4'de belirtilen konsantrasyonlara sahip olacak şekilde distile suda çözdürülerek 1000 mL'ye tamamlanmış ve filtre ile sterilize edilmiştir.

Çizelge 5.4 Vitamin karışımı hazırlamak için gerekli bileşenler [14]

Bileşen	**Stok solüsyon** ***(g · L^{-1} dH$_2$O)***	**Miktar**	**Ortamdaki son konsantrasyon (M)**
Thiamine.HCl	-	100 mg	2.96 x 10^{-7}
Biotine (Vitamin H)	0.5	1 mL	2.05 x10^{-9}
Cyanocobalamin(B12)	0.5	1 mL	3.69x 10^{-10}

L1 ortamı için $NaNO_3$ ve $NaH_2PO_4.2H_2O$ karışımı ile $Na_2SiO_3.9H_2O$ distile suda çözdürülüp, 50'şer mL distile suyla tamamlanarak hazırlanmış ve filtre ile sterilize edilmiştir. Tuz konsatrasyonlarını ayarlamak amacıyla 235.92 g NaCl 250 ppt tuzlulukta stok çözeltisi hazırlamak üzere 1 L distile suda çözdürülerek otoklavlanmıştır.

Çizelge 5.5 L1 ortamı hazırlamak için gerekli bileşenler [14]

Bileşen	**Stok solüsyon** ***(g · L^{-1} dH$_2$O)***	**Kullanılan miktar**	**Ortamdaki son konsantrasyon (M)**
$NaNO_3$	75.00	1 mL	8.82 x 10^{-4}
$NaH_2PO_4.2H_2O$	5.00	1 mL	3.62 x 10^{-5}
$Na_2SiO_3.9H_2O$	30.00	1mL	1.06 X 10^{-4}
İz element solüsyonu	Diğer tabloda	1mL	-
Vitamin solüsyonu	Diğer tabloda	0.5 mL	-

Ortamların tuzlulukları, NaCl stok çözeltisini deniz suyu yerine farklı miktarlarda kullanmak suretiyle ayarlanmıştır. Stok solüsyonlarının hazırlanmasından sonra çizelge 5.5'te belirtilen miktarlardaki stok solüsyonları toplamları 950 mL olacak şekilde deniz suyu+NaCl çözeltisine konularak L1 ortamı hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin pH ve tuzluluk değerleri ölçülerek pH'nın yaklaşık 8 olması sağlanmıştır.

5.2.3 Kültürlerin İnkübasyonu

Türün izolasyonu, kültürün sürdürülmesi ve optimizasyonu esnasında inkübatör koşulları; 12:12 aydınlık karanlık, 60 µmol foton m^{-2} s^{-1} ışık ortamı ve yaklaşık 23 ^{o}C ortam sıcaklığı şeklinde uygulanmıştır.

5.2.4 Mikroskobik Yöntemle Hücre Sayımı

Mudanya'dan izolasyonu gerçekleştirilen diatom türünde çökme ve topaklanma gözlemlendiğinden UV spektrofotometrede optik yoğunluk ölçümü yapmak yerine mikroskop altında hücre sayımı yapılmış, sayım utermol ve hemositometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

5.2.5 Büyüme Hızı Hesaplamaları

Birim zamanda biyokütledeki veya hücre sayısındaki artış oranı olarak ifade edilen spesifik büyüme hızı (μ) logaritmik büyüme fazındaki hücre yoğunluğu ile eşitlik 5.1 ve eşitlik 5.2 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$K' = \frac{Ln(\frac{Nt2}{Nt1})}{t2-t1} \quad (5.1)$$

$$\mu = K'/Ln2 \quad (5.2)$$

Eşitliklerde N_{t2} ve N_{t1}, t_1 ve t_2 zamanlarındaki biyokütleleri veya hücre yoğunlukları, K' bölünme zamanı, μ spesifik büyüme hızıdır [109].

5.2.6 Tür karakterizasyonu

5.2.6.1 Moleküler Tür Tanımlama

Marmara Denizi Mudanya kıyılarından izole edilen türün moleküler tanımlaması için ilgili gen bölgesi koloni PCR (gradient olarak) yöntemiyle çoğaltılmıştır. Dizileme yapılacak hedef bölgeyi çoğaltmak için 18S RNA gen bölgesi hedeflenmiş ve bu amaca uygun olarak diatomlarda yaygın şekilde kullanılan ve Çizelge 5.6 'da verilen D512F/ D978R 18S RNA gen bölgesi primerleri kullanılmıştır. Moleküler çalışmalar, Sentegen Biyoteknoloji laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 5.6 Koloni PCR'da kullanılan primerler [110, 111]

Primer Adı	**Dizi**
D512F	ATT CCA GCT CCA ATA GCG
D978R	GAC TAC GAT GGTATC TAATC

Koloni PCR (gradient olarak) için PCR reaksiyonu çizelge 5.7'de belirtilen şekilde New England Biolabs markalı reaktifler ile 50 µl reaksiyon hacminde kurulmuştur. Kalıp DNA olarak santrifüjlenen diatom peletinden pipet ucu kadar kullanılmıştır.

Çizelge 5.7 PCR Reaksiyonu

İçerik	**Kullanılan Miktar**
5X Reaksiyon Tamponu	10 µl
dNTP Mix (10 mM)	1 µl
D512F Primeri (10 uM)	2.5 µl
D978R Primeri (10 uM)	2.5 µl
HF DNA Polimeraz	0.5 µl

Çizelge 5.7 PCR Reaksiyonu (devamı)

İçerik	Kullanılan Miktar
Saf Su	33.5 µl
Kalıp DNA	Diatom Pellet

Hazırlanan PCR karışımı çizelge 5.7'de belirtilen termal döngü şartlarında BioRad T100 termal döngü cihazına konularak PCR gerçekleştirilmiştir. Gradient uygulanan PCR'da 56.0^{o}C, 54.2^{o}C, 51.9^{o}C, 49.9^{o}C ve 48.0^{o}C olmak üzere beş farklı bağlanma sıcaklığı uygulanmış ve PCR ürünleri elektroforez jeline sırasıyla yüklenmiştir. Elektroforez jelinde DNA bandının yerinin tespit edilmesi amacıyla New England Biolabs 100 bp DNA Ladder kullanılmıştır.

Çizelge 5.8 Termal döngü şartları

Durum	Döngü	Sıcaklık/Zaman
İlk Denatürasyon	1	98^{o}C / 30 sn
Denatürasyon	35	98^{o}C / 10 sn
Bağlama	35	48 ^{o}C - 56 oC / 30 sn
Uzama	35	72^{o}C / 10 sn
Son Uzama	1	72^{o}C / 2 dk
Soğuma Sınırsız	1	10 ^{o}C / ∞

Koloni PCR ürünleri elektroforez jelinde yürütülmüş ve ilgili bant bölgesi elektroforez jelinden geri alınmıştır. Çoğalan PCR ürünü ABI 3130 XL 16 capillary cihazıyla sanger dizileme yapılmıştır. Dizileme sonuçları SnapGeneViewer programı ile düzenlenmiş ve NCBI (National Center for Biotechnology Information -https://www.ncbi.nlm.nih.gov-) internet sitesinde nükleotit veri bankası aracılığıyla BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) [112, 113] analizine tabi tutulmuştur.

5.2.6.2 TGA Analizi

Diatom örneğinin nem içeriğinin, uçucu madde içeriğinin, sabit karbon içeriğinin ve kül içeriğinin belirlenmesi için çizelge 5.9'da verilen şartlar altında termogravimetrik kısa

analiz gerçekleştirilmiştir. Analizde TA Instrument marka ve SDT Q600 model TGA cihazı kullanılmış, diatom numunesi analizden önce etüvde kurutulmuştur.

Çizelge 5.9 TGA kısa analiz prosedürü

İşlem No	İşlem	Sıcaklık	Ortam
1	Isıtma	110^{o}C'ye kadar	Azot
2	Bekleme	110^{o}C'de	Azot
3	Isıtma	600^{o}C'ye kadar	Azot
4	Bekleme	600^{o}C'de	Azot
5	Geçiş	600^{o}C'de	Hava
6	Bekleme	600^{o}C'de	Hava

Analizde ikinci işlem sonrasında nem miktarı, dördüncü işlem sonrasında uçucu madde miktarı, altıncı işlem sonrasında ise kül miktarı tespit edilmiş, sabit karbon içeriğinin tespiti eşitlik 5.3 yardımıyla [114] yapılmıştır.

$$\%\ sabit\ karbon\ içeriği\ =\ 100\ -\ (uçucu\ karbon\ yüzdesi\ +\ kül\ yüzdesi) \quad (5.3)$$

5.2.6.3 FTIR Analizi

İzole edilen diatomun içerdiği fonksiyonel grupların bulunması amacıyla 400-6000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında Bruker marka cihaz ile FTIR analizi gerçekleştirilmiş, analiz sonucunda elde edilen absorbans değerleri literatür ile karşılaştırılarak yorumlanmıştır.

5.2.6.4 Toplam Karbonhidrat Analizi

Diatomun toplam karbonhidrat içeriği fenol-sülfürik asit yöntemi [115] ile belirlenmiştir. 20 g distile suya 80 g fenol ilave edilerek ağırlıkça %80 'lik fenol reaktifi hazırlanmış, glikoz analiz için standart olarak kullanılmıştır. Standart eğriyi oluşturmak için 2 ml toplam hacimde distile su ve glikoz ile hazırlanan 0-50 µg glikoz/ml konsantrasyonlarındaki glikoz çözeltilerine ve örneklere 0.05 ml fenol reaktifi eklenmiş ardından 5 ml H_2SO_4 ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiş örneklerin

spektrofotometrede 490 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Ölçüm değerlerinden meydana getirilen standart eğri grafiği ile diatom içerisindeki toplam karbonhidrat miktarı hesaplanmıştır.

5.2.6.5 Toplam Yağ Analizi ve Yağ Asidi Kompozisyonu Analizi

Diatom içindeki toplam yağ miktarı, biyokütlenin etanol ile muamele edilmesiyle belirlenmiştir. Yöntemde kurutulmuş biyokütle, çözücüyle ekstrakte edilmiş ardından çözücü evaporatör yardımıyla ortamdan uzaklaştırılmıştır. Nihayetinde elde edilen yağ tartılmak suretiyle toplam yağ miktarı tayin edilmiştir.

Yöntemde kurutulmuş diatom biyokütlesine etanol eklenmiş, 120 rpm'de karıştırma yapılarak oda sıcaklığında 48 saat saatte diatomun yağı etanolde çözündürülmüştür. 48 saat sonra meydana gelen karışım süzülüp, etanol sıvı kısımdan rotary evaporatör ile ayrılmıştır. Geri kalan yağ tartılarak eşitlik 5.4 yardımıyla % yağ içeriği belirlenmiştir.

$$\%\ yağ\ miktarı\ =\ [\ (Ws - Wd)\ /\ Wö\ ]\ x\ 100 \qquad (5.4)$$

Eşitlik 5.4'de Ws, ekstraksiyon sonrası kalan yağ ile ekstraksiyon kabının kütlesinin toplamını; Wd, ekstraksiyon kabınının kütlesini; Wö ekstraksiyon için kullanılan diatomun kütlesini ifade etmektedir.

Yağ asidi komposizyonu incelenecek numune önce etüv içerisinde 40^{o} C'de fazla sıvı maddesi uçurularak konsantre hale getirilmiştir. Konsantre hale gelen kültüre % 99'luk etil alkol eklenmiş ve iki gün boyunca ekstraksiyona bırakılmıştır. Ekstraksiyonun ardından tekrar etüve 40^{o} C'ye konulmak suretiyle kültürden sıvı kısım uçurulmuştur. Standartlara uygun olarak hazırlanan metil ester örnekleri metil heptadekonat ve n-heptan ile karıştırılarak gaz kromatografisi için hazır hale getirilmiş, metil heptadekonat (C17:0) iç standart olarak kullanılmıştır.

Yağ asidi kompozisyonu analizi için örneklere GC-FID prosedürü uygulanmış, analizler YL Instruments 6100 GC marka gaz kromatografisi cihazında gerçekleştirilmiştir. Gaz kromatografisi cihazı alev iyonizasyon dedektörü (FID) ve 30 m x 0.32 mm x 0.25 µm ZB-FFAP kolonu içermekte olup, kolon sıcaklık programı 50°C ile başlayıp, 15°C/dk hızla 175°C'ye, ardından 5°C/dk hızla 230°C'ye çıkmaktadır. Enjektör sıcaklığı 230°C olup,

akış hızı 1.8 ml/dk olarak ayarlanmıştır. Dedektör sıcaklığı 280°C'de tutularak taşıyıcı gaz olarak hidrojen gazı kullanılmıştır.

5.2.7 Besin Maddelerinin (N, Si, P) Diatom Büyümesi Üzerine Etkileri

Diatomlar için temel besin maddelerinden olan N, Si ve P elementlerinin diatom büyümesi üzerine etkilerini incelemek amacıyla, L1 besin solüsyonu ortamındaki PO_4, NO_3 ve SiO_3 konsantrasyon değerleri, faktöriyel tasarım çalışması yapmak için, -1, 0 ve 1 olarak normalize edilmiş olup, literatür araştırması sonucu belirlenmiş olan, "0" değeri ticari L1 besin solüsyonundaki gerçek konsantrasyon değerlerini, -1 değeri minimize edilmiş konsantrasyon değerlerini ve +1 değeri de maksimize edilmiş konsantrasyon değerlerini ifade etmektedir (Çizelge 5. 10). Farklı PO_4, NO_3 ve SiO_3 konsantrasyon değerleri için 2^3 faktöriyel tasarım uygulanarak hücre yoğunluğu üzerine besin elementlerinin etkisi incelenmiş ve seçilen parametreler için oluşturulmuş faktöriyel tasarım matrisi Çizelge 5. 11'da verilmiştir.

Çizelge 5.10 PO_4, NO_3 ve SiO_3 konsantrasyonlarının faktöriyel seviyeleri

Bileşen	**Alt seviye**	**Temel seviye**	**Üst seviye**
PO_4 konsantrasyonu	0.007 mM	0.036 mM	0.064 mM
NO_3 konsantrasyonu	0.17 mM	0.88 mM	1.58 mM
SiO_3 konsantrasyonu	0.021 mM	0.106 mM	0.189 mM

Çizelge 5.11 Seçilen parametreler için faktöriyel tasarım matrisi

Deney No	**NO_3**	**PO_4**	**SiO_3**
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1
4	-1	+1	+1
5	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1
7	+1	+1	-1

Çizelge 5.11 Seçilen parametreler için faktöriyel tasarım matrisi (devamı)

Deney No	**NO_3**	**PO_4**	**SiO_3**
8	+1	+1	+1
9	0	0	0

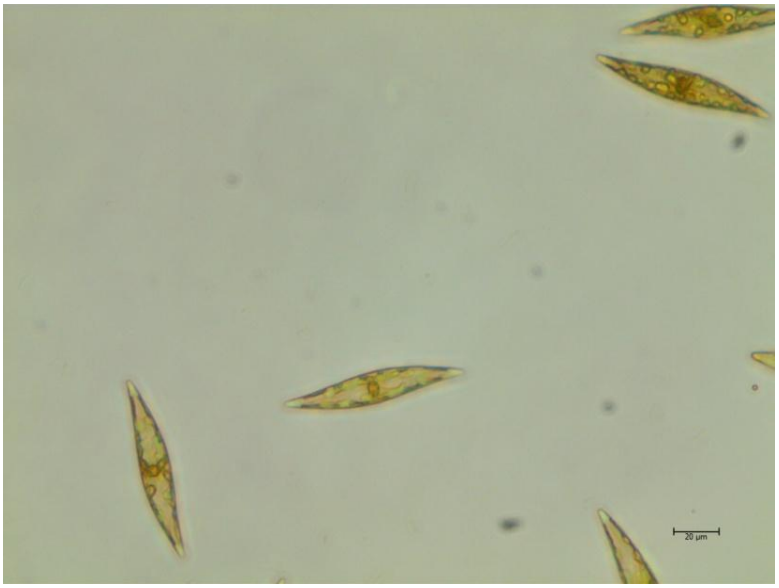
Planlanan şekilde hücreler katı kültürde 19 gün boyunca inkübe edilmiş, inkübasyonun ardından elde edilen hücre sayımı değerleri MiniTab programı vasıtasıyla istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

BÖLÜM 6

BULGULAR ve TARTIŞMA

6.1 İzolasyon Denemelerinde Elde Edilen Türler

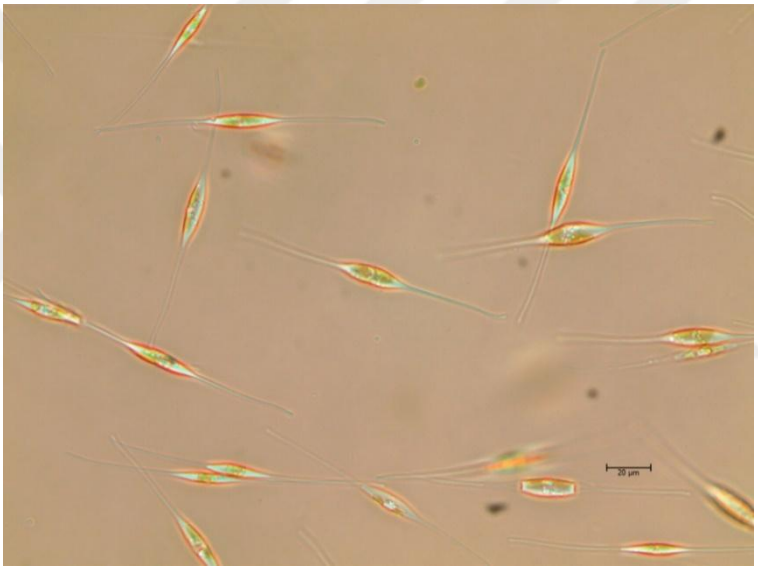
Tez çalışmasında mikropipet ile tek hücre izolasyonu, dilüsyon, santrifüjleleme ve çöktürme gibi tekniklerle laboratuvar ortamında üç tür diatom (Şekil 6.1-6.3) izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ancak izole edilen diatom türlerinden sadece bir tanesi büyük hacme (Şekil 6.1) alınabilirken diğerleri (Şekil 6.2-6.3) büyük kültürde iyi büyümediğinden sadece çoklu plakada yetiştirilmiştir.



Şekil 6.1 İzole Edilen türün 40 X mikroskop görüntüsü (*Pleurosigma sp.)*

İzolasyon çalışmaları sırasında büyük hacimde kültürü sürdürülemeyen türlerin, habitat değişimiyle strese girmiş olabilecekleri, büyümeleri için temel besin elementlerinin yetersiz kalmış olabileceği veya spesifik besin elementi ihtiyaçlarının olabileceği, ışık, sıcaklık vb. fiziksel şartların optimize olmamasından olumsuz etkilenebilecekleri, farklı mikrobiyal türlerle yarışmaya girmiş olabilecekleri veya diğer türlerle allelopatik ilişki içinde bulanabilecekleri düşünülmektedir.

İleride ayrıntılı olarak açıklanacağı üzere yapılan morfolojik değerlendirme ve moleküler tanımlama sonrası izole edilen ve başarıyla kültüre edilebilen türün *Pleurosigma* cinsi diatom olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 6.2 İzole Edilen türün 40 X mikroskop görüntüsü (*Cylindrotheca sp.*- morfolojik değerlendirmede)



Şekil 6.3 İzole Edilen türün 40 X mikroskop görüntüsü (*Thalassiosira sp.*- morfolojik değerlendirmede)

6.2 Kültüre Edilen Türün Büyüme Hızı

Pleurosigma sp. hücreleri birbirine ve ekim yapılan cam erlenin dibine yapıştığı için büyüme takibi spektrofotometre ile değil doğrudan mikroskop altında steril bir çubuk yardımıyla karıştırılıp alınan örnekten sayım yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Pleurosigma sp. İçin büyüme hızı eşitlik 5.1 ve 5.2 kullanarak hesaplanmış ve büyüme hızı 0,173 gün^{-1} olarak elde edilmiştir. Çizelge 6.1'de tez çalışması kapsamında izole edilen *Pleurosigma sp.* ile literatürdeki bazı diatomların spesifik büyüme hızlarının karşılaştırması yapılmıştır.

Çizelge 6.1 Bazı Diatomların Spesifik büyüme hızı

Tür	**Spesifik Büyüme Hızı (gün^{-1})**	**Referans**
Pleurosigma sp.	0.173	Tez çalışması
Thalassiosira antarctica	0.31	[116]
Thalassiosira nordenskioeldii	0.34	[116]
Thalassiosira bulbosa	0.38	[116]

Çizelge 6.1 Bazı Diatomların Spesifik büyüme hızı (devamı)

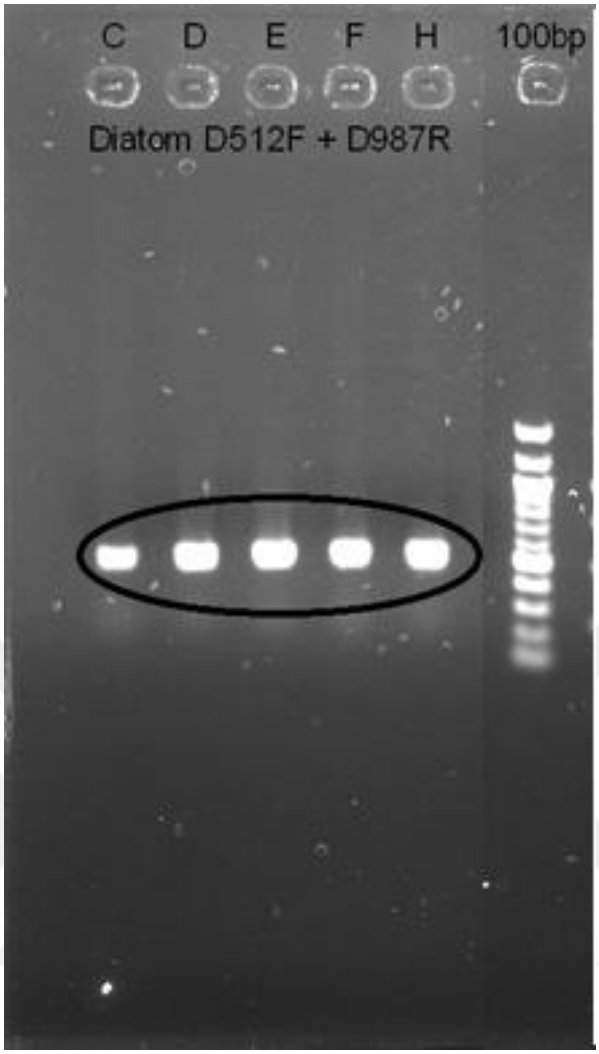
Tür	Spesifik Büyüme Hızı ($gün^{-1}$)	Referans
Thalassiosira bioculata	0.15	[116]
Porosira glacialis	0.29	[116]
Amphiprora sp.	0.18	[116]
Pseudo-nitzschia multiseries	0.80	[117]
Pseudo-nitzschia Australis	0.48	[117]
Nitzschia arctica	<0.1	[118]
Nitzschia pseudodelicatissim	0.1-0.3	[118]
Chaetoceros sp.	0.1 - 0.4	[118]
Cyclotella cryptica	0.138	[119]

6.3 Tür Karakterizasyonu

6.3.1 Moleküler Tür Tanımlama

6.3.1.1 Jel Elektroforezi

Şekil 6.4 gradient PCR uygulanan izolatın elektroforez jelinde yürütülmesi ile elde edilen görüntüyü göstermektedir. 400 bp civarındaki hedef diatomik DNA bandının ladder DNA'ya göre doğru noktada konumlandığı görülmektedir. C, D, E, F ve H ile adlandırılan kuyular beş farklı bağlanma sıcaklığında (48^oC - 56^oC) uygulanan reaksiyonun tamamında PCR başarılı bir şekilde çalışmıştır.



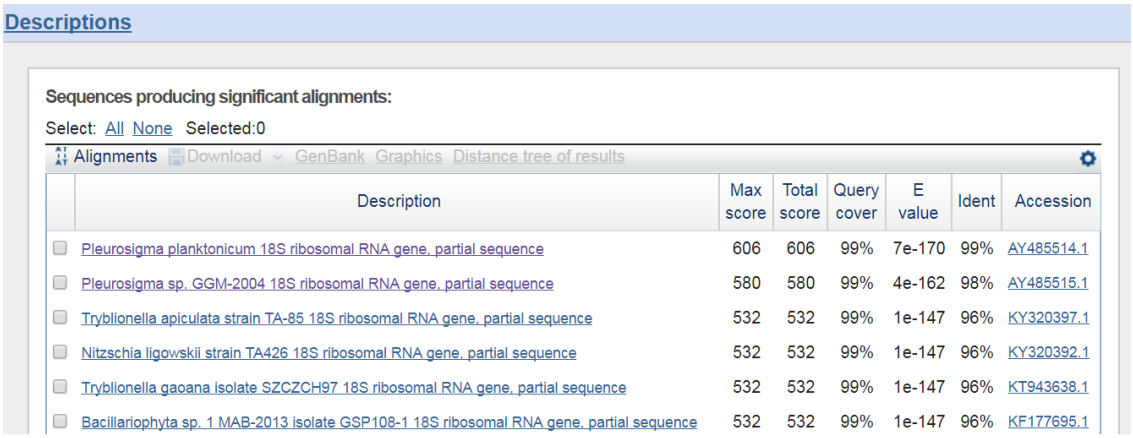
Şekil 6.4 Diatom koloni PCR elektroforez jel görüntüsü

6.3.1.2 Dizi Analizi

Tür tanımlama için diatomlarda yaygın olarak kullanılan ve 1800 bp büyüklüğündeki 18S rRNA (SSU rRNA) gen bölgesinin, yaklaşık 400 bp uzunluğundaki (V4 barkod bölgesi) bölgesi Sanger dizileme metodu ile dizilenmiş ve dizileme sonuçları NCBI internet sitesinde BLAST analizine tabi tutulmuştur. Şekil 6.5 BLAST analizine ait skor değerlerini göstermektedir. BLAST analizine göre izolatın *Pleurosigma sp.* olduğu belirlenmiştir. Şekil 6.5 elde edilen DNA baz dizisinin BLAST analizinde skor değerlerini göstermektedir.

*Pleurosigma sp.'*nin 18S rDNA kısmi dizisi

>TGCCATCCTTGGGTGGAATCTGTGTGGCATTAGGTTGTCGTGCAGGGGATGCCCATCGTTTA
CTGTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTTATGCCGTTGAATATGTTAGCATGGAATAAT
AAGATAGGACATTGGTACTATTTTGTTGGTTTGCGCACCAATGTAATGGTTAAAAGGAACGGA
TAGGGGTATTCGTATTCAGCTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTTCTGAAGACGAACTACTG
CGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGATGAT
TAGATACCATCGTAGTCA



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Pleurosigma planktonicum 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	606	606	99%	7e-170	99%	AY485514.1
Pleurosigma sp. GGM-2004 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	580	580	99%	4e-162	98%	AY485515.1
Tryblionella apiculata strain TA-85 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	532	532	99%	1e-147	96%	KY320397.1
Nitzschia ligowskii strain TA426 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	532	532	99%	1e-147	96%	KY320392.1
Tryblionella gaoana isolate SZCZCH97 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	532	532	99%	1e-147	96%	KT943638.1
Bacillariophyta sp. 1 MAB-2013 isolate GSP108-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	532	532	99%	1e-147	96%	KF177695.1

Şekil 6.5 NCBI internet sitesinde BLAST analizi sonucu

6.3.2 TGA Analizi

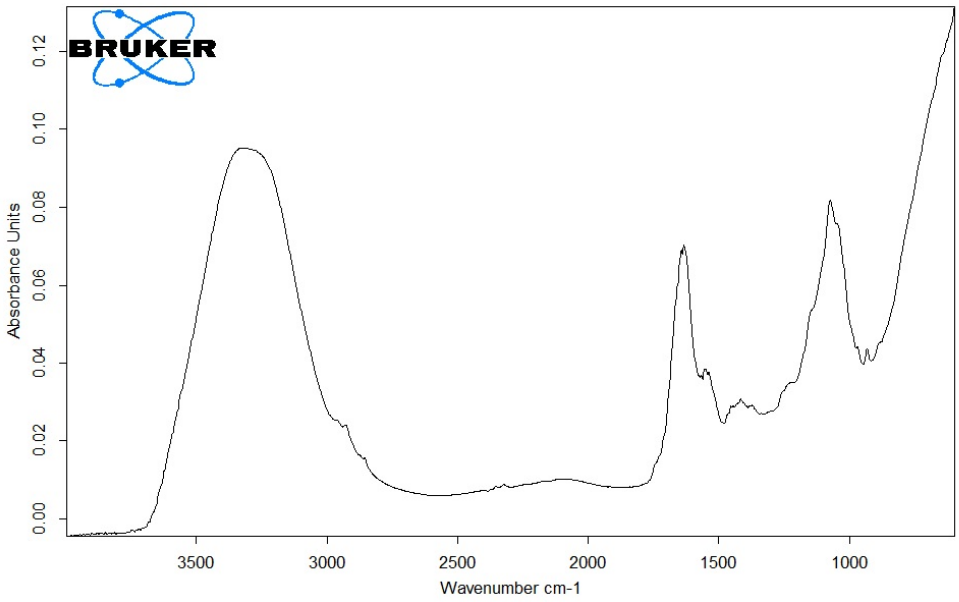
Çizelge 6.2'de termogravimetrik kısa analizi yapılan diatom hücrelerine ait veriler görülmektedir. Çalışmada nem içeriği % 8.6, uçucu madde içeriği % 8.37, sabit karbon içeriği % 1.82 ve kül içeriği % 81.66 olarak bulunmuştur. Yüksek kül içeriği birçok diatom türü için tipik bir durumdur [120]. İzole edilen *Pleurosigma sp.'*nin kül içeriğinin literatürde yapılan çalışmalara göre yüksek olduğu görülmektedir [13] ancak bazı diatom türlerinde kül içeriği kuru ağırlıkça % 55-60 [121, 122] gibi değerlere çıkabilmektedir. Silisyumlu früstül yapılarıyla karakterize diatomların yüksek miktarda silisyum ihtiyacı olduğu göz önünde bulundurulduğunda kül içeriğinin büyük oranda silisyumdan kaynaklandığı görülmektedir.

Çizelge 6.2 Diatom TGA kısa analiz sonucu

Diatom	Nem (%)	Uçucu Madde (%)	Sabit Karbon (%)	Kül (%)
Pleurosigma sp.	8.60	8.37	1.82	81.66

6.3.3 FTIR Analizi

Analiz sonucu elde edilen FTIR spektrumu şekil 6.6'da görülmektedir.



Şekil 6.6 Diatom FTIR spektrumu

Spektrum değerleri literatürle karşılaştırılarak Çizelge 6.3'deki fonksiyonel gruplar tanımlanmıştır. FTIR analizi sonucuna göre izole edilen diatom türünde yüksek miktarda silisyumlu yapılar bulunmaktadır. Özellikle de früstül yapılarıyla bilinen diatomlar için silisyum, früstül yapılarının temel taşı görevindedir. FTIR analizinde net bir şekilde görülen 930 cm^{-1} ve 1100 cm^{-1} dalga sayısındaki [123, 124] pikler diatoma spesifik silisyumlu yapıları göstermektedir. 3300 cm^{-1} dalga sayısı [125] civarındaki geniş pik örnek içerisindeki nemden kaynaklanmaktadır. Çizelge 6.3'deki diğer pikler protein, yağ asidi, karbonhidrat gibi hücre için organik yapılarla ilişkili piklerdir.

Çizelge 6.3 FTIR analizi fonksiyonel gruplar

Dalga Sayısı (cm^{-1})	Fonksiyonel Gruplar	Referans
931	Si-OH Gerilmesi	[123]
1072	Si-O-Si Gerilmesi	[124]
1416	CH_2 Bükülmesi	[123]
1554	NH_2 Bandı	[126]
1633	Amidlerdeki C-O Gerilmesi	[123]
2856	Alifatik CH_3	[127]
2929	C-H Bandı	[125]
3320	O-H Gerilmesi	[125]

6.3.4 Toplam Karbonhidrat Analizi

Pleurosigma sp. için fenol-sülfürik asit metoduna göre standart eğri ile hesaplanan toplam karbonhidrat miktarı % 29.25 olarak bulunmuştur. Literatürde diatom türleri için ağırlıkça karbonhidrat içeriklerinin türe, kültür içeriğine ve yetiştirme koşullarına göre değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir. Çizelge 6.4'de literatürde yapılan diğer çalışmalarla, izole edilen *Pleurosigma sp.*'nin kuru ağırlıkça karbonhidrat içeriklerinin karşılaştırılması yapılmıştır.

Çizelge 6.4 Bazı diatomların karbonhidrat içerikleri

Diatom Türü	Karbonhidrat İçeriği (kuru ağırlıkça %)	Referans
Pleurosigma sp.	29.25	Tez çalışması
Pleurosigma angulatum	8.1	[13]
Gyrosigma peisoneis	20.8	[13]
Gyrosigma littorale	36.3	[13]
Gyrosigma spenceri	37.1	[13]
Chaetoceros afflni	25	[128]
Thalassiosira pseudonana	13	[129]
Navicula pelliculosa	21	[87]

Çizelge 6.4 Bazı diatomların karbonhidrat içerikleri (devamı)

Diatom Türü	Karbonhidrat İçeriği (kuru ağırlıkça %)	Referans
Phaeodactylum tricornutum	23	[130]
Coscinodiscus sp.	4.1	[121]

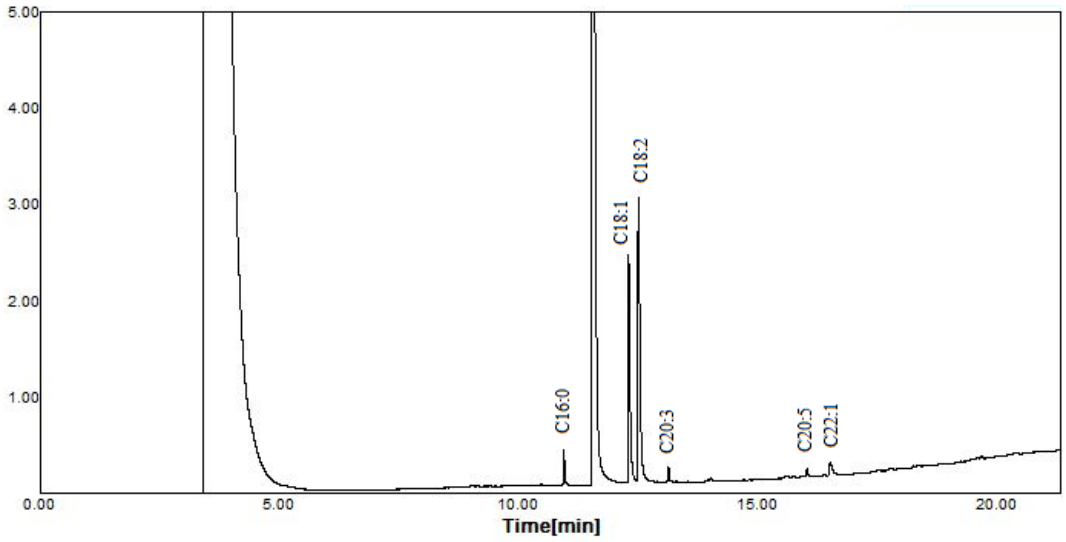
6.3.5 Toplam Yağ Miktarı ve Yağ Asidi Kompozisyonu Analizi

İzole edilen *Pleurosigma sp.'*nin toplam yağ miktarı kuru ağırlıkça % 20 olarak bulunmuştur. Diatomlarla yapılan önceki çalışmalar incelendiğinde lipit içeriğinin aynı cinsin alt türleri arasında ve farklı cinsler arasında oldukça farklılık gösterdiği, her bir türün lipit potansiyelinin farklı olduğu ve potansiyelin yetiştirme ortamındaki besin, sıcaklık, ışık, pH vb. parametrelerden etkilendiği görülmektedir. Çizelge 6.5 izole edilen diatom türünün, literatürde diatomlarla yapılan çalışmalarla karşılaştırılması verilmiştir.

Çizelge 6.5 Bazı diatomların lipit içerikleri

Diatom Türü	Yağ İçeriği (kuru ağırlıkça %)	Referans
Pleurosigma sp.	20	Tez çalışması
Pleurosigma normanii	9.1	[131]
Pleurosigma attenuatum	20.58	[132]
Pleurosigma angulatum	33.5	[13]
Gyrosigma peisoneis	30.1	[13]
Gyrosigma spenceri	22.4	[13]
Gyrosigma littorale	34.5	[13]
Chaetoceros afflni	4.5	[128]
Phaeodactylum tricornutum	8	[130]
Coscinodiscus sp.	1.8	[121]
Navicula *pelliculosa*	25	[87]
Diatom konsorsiyumu	21.5	[133]

Şekil 6.7'deki diatoma ait gaz kromotogramı incelendiğinde izole edilen türde palmitik asit (16:0), oleik asit (18:1), linoleik asit (18:2, ω-6), ekosatrionik asit (20:3, ω-6), ekosapentanoik asit (20:5) ve erüsik asit (22:1) varlığı görülmektedir. GC-FID ile elde edilen yağ asidi sonuçlarına göre izole edilen tür diatomlarda yaygın olarak gözlenen palmitik asit ve oleik asit gibi tipik yağ asitlerini içermekte ve ticari olarak büyük öneme sahip olan ω-3 yağ asidi eikosapentaenoik asidi (20:5) de içermektedir.



Şekil 6.7 Diatom örneğinin yağ asidi metil esterlerinin kromatogramı

Diatomlarla yapılan yağ asidi kompozisyonu analizi çalışmaları, en yüksek miktarda bulunan yağ asitlerinin 14:0, 16:0, 16:1 ve 20:5 (ω-3) olduğunu gösterirken C_{18} ve C_{22} de diatomlarda yaygın olarak bulunan yağ asitlerindendir [134, 135, 136].

Scholz ve Liebezeit [13], 600 µmol foton m^{-2} s^{-1} ışık yoğunluğu ve 18°C sıcaklıkta bentik denizel diatom türleri ile yaptıkları çalışmada, *Gyrosigma littorale, Gyrosigma spenceri, Gyrosigma peisoneis* türleri 14:0 16:0 16:1 16:4 20:5 yağ asitlerini yoğun olarak bulundururken 22:6 (ω-3) 18:0: 24:0 gibi yağ asitlerini de bulundurmaktadır. *Pleurosigma angulatum* için de aynı yağ asitleri bol miktarda bulunmakta fakat hem *Gyrosigma* cinsi içinde hem *Gyrosigma* ile *Pleurosigma* cinsleri arasında spesifik olarak oranlar değişim göstermektedir.

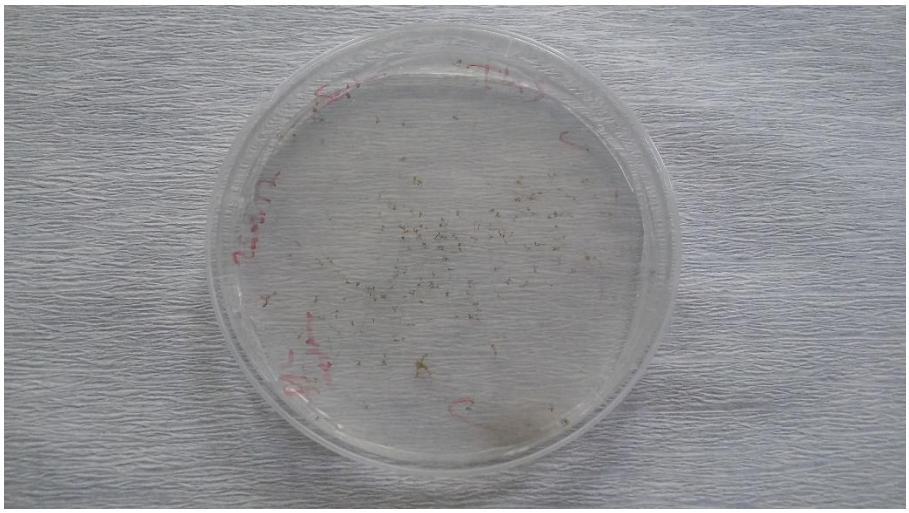
Tsurkan ve ark. [137] oda sıcaklığında yetiştirilen *Pleurosigma sp.* diatomunda 16:0, 16:1, 16:2, 16:3, 16:4 18:0, 18:1, 18:2 ve 18:3 20:4 ve 20:5 yağ asitleri bulunmaktadır.

Yağ asidi kompozisyonu analizinde görülen 20:3(ω-6) ve 22:1 yağ asitleri diatomlarda bol miktarda bulunmayan ve sıklıkla karşılaşılmayan yağ asitlerindendir, ancak 22:1 yağ asidi *Skeletonema sp., Amphiprora hyalina, Thalassiosira pseudonana, Thalassiothrix heteromorpha* gibi diatomlarda eser miktarda bulunmaktadır. 20:3(ω-6) yağ asidi *Thalassiosira fluviatilis* ve *Chaetoceros muelleri*'de kaydedeğer miktarda bulunurken *Coscinodiscus sp., Cylindrotheca fusiformis, Navicula sp., Thalassiosira stellaris* gibi bazı diatomlarda eser miktarlarda bulunmaktadır [134, 138]. Genel olarak benzer türlerin benzer yağ asitlerini içerdikleri görülse de, sıklıkla her bir türün spesifik olarak farklı yağ asidi profili ve/veya yağ asidi oranı vardır. Literatürde yağ asitlerinin çeşitlerinin ve hücrede bulunma oranlarının -soğuk şartlarda kültüre edilen türlerde viskozite artışına direnç göstermek amacıyla doymamış yağ asitlerinin miktarının artması gibi - yetiştirme ortamından önemli derecede etkilendiği bildirilmektedir. [55, 133, 134, 139].

6.4 Besin Maddelerinin Diatom Büyümesi Üzerine Etkileri

Mikroalglerin yetiştirilmesinde kullanılan besin solüsyonlarının formülasyonları ve her bir besin elementinin solüsyon içeriğindeki miktarı mikroalgin türüne, ihtiyacına göre değişiklik göstermektedir. Özellikle büyük ölçekli üretim planlandığında ekonomik üretim sağlamak amacıyla, her mikroalg türünün büyümesi için optimum koşulları belirlemek, ve ticari olarak satın alınabilecek türlerden ziyade, özellikle yerel olarak izole edilen türler için besin elementlerinin optimizasyonu ayrı bir önem taşımaktadır. Bu bağlamda yapılan çalışma öncesinde literatürde mevcut diatom çalışmaları incelenmiş, izole edilen türe ait optimizasyon çalışmasına rastlanmamasına karşın, bu türe benzer olabilecek diğer diatomların çalışmaları referans alınarak besin elementleri için alt ve üst seviyeler belirlenmiştir.

Besin maddelerinin diatom büyümesi üzerine etkilerinin incelenmesi faktöriyel tasarım metodu kullanılarak katı kültürde gerçekleştirilmiştir. Şekil 6.8 ve Şekil 6.9 katı kültürde çoğaltılan *Pleurosigma sp.* hücrelerinin sırasıyla kültür kabındaki ve mikroskop altındaki görüntüleridir.



Şekil 6.8 Besin elementlerinin etkisini incelemek üzere katı kültürde çoğaltılan diatom hücreleri



Şekil 6.9 Pleurosigma *sp.* hücrelerinin mikroskop altındaki görüntüsü

2^3 faktöriyel tasarıma göre seçilen 9 koşul altında iki tekrarlı olarak gerçekleştirilen deneylerden elde edilen hücre sayımı verilerine "çoklu lineer regresyon" yöntemi uygulandığında;

$$X_4 = 155 + 35{,}2X_1 - 21{,}9X_2 + 38{,}1\,X_3 \qquad (6.1)$$

normalize denklemi elde edilmiştir. En yüksek katsayı silisyum etkisi için gözlenmiş, sonra sırayla azot ve fosfor etkisinin katsayıları gelmektedir.

Üç bağımsız parametrenin hücre sayısına etkileri istatistiksel olarak analiz edildiğinde Çizelge 6.6'da gösterilen varyans analizi sonuçları (*ANOVA*) elde edilmiştir. Varyans

analizi sonucu elde edilen regresyon denkleminin kabul edilebilir R^2 ve p değerlerine sahip olduğu görülmüştür.

Çizelge 6.6 Varyans analizi sonuçları

Source	DF	SS	MF	F	P
Regression	3	25344.2	8448.1	2318	0.002
Residual Error	5	1822.4	364.5	5	
Total	8	27166.6			
R^2	%93.3				

6.4.1 Azotun Diatom Büyümesi Üzerine Etkileri

Azot elementinin büyüme üzerine etkisini görmek için yapılan faktöriyel tasarım sonucu elde edilen Denklem 6.1'de X_1 ile ifade edilen bağımsız NO_3 parametresinin katsayısının pozitif çıktığı görülmüştür. Bu denklem, 0.18 - 1.58 mM NO_3 (10.94-99.48 mg/l NO_3 ve 2.47-22.25 mg/L N açısından) konsantrasyonu aralığında azotun diatom büyümesi üzerine pozitif etki ettiğini göstermektedir. Proteinleri oluşturan amino asitlerin, nükleik asitlerin (DNA, RNA), klorofil ve fikosiyanin gibi pigmentlerin yapısında yer alan, hücresel büyüme ve metabolizma için hayati öneme sahip azotun diatom büyümesini pozitif yönde etkilediği literatürde yapılan pek çok çalışmada gösterilmektedir [140, 141, 142, 143, 144].

Shelfor'un tolerans kanununa göre organizmanın büyümesi ve çoğalmasını etkileyen faktörlerin minimum ve maksimum değerde olması organizmayı sınırlandırır. Çok düşük besin konsantrasyonlarında büyüme inhibe olurken yüksek besin konsatrasyonları ise toksik etki yapar. Bu iki değerin arasında organizmanın en iyi şekilde büyüme ve çoğalma gösterdiği optimal değerler vardır.

Qui-Ha vd. [140] azotun diatom büyümesine pozitif etki ettiğini *Cocconeis scutellum* için optimum azot konsantrasyonunun 3.08 mg/L, *Amphora coffeaeformis, Navicula corymbosa ve Navicula mollis* için 1.54 mg/L olduğunu bildirmişlerdir.

Khan vd. [141] denizel diatom *Skeletonema costatum* 'un 25 ^{o}C, 60 µE m^{-2} s^{-1} ve 12:12 aydınlık karanlık döngü şartlarında 0.1-300 mg/L NO_3 konsantrasyonu aralığında 10 mg/L NO_3 konsantrasyona kadar bölünme hızı artarken 10 mg/L den sonra düşme görülmüştür. Optimum büyüme konsantrasyonu çalışmada 3-10 mg/L NO_3 olarak verilmekte ancak 300 mg/L nitrat konsantrasyonuna kadar yeterli büyüme görülebilmektedir.

Qui-Ha vd. ile Khan vd.'nin yaptığı çalışmalarda optimum azot konsantrasyonlarının literatürdeki diğer çalışmalara göre ve tez kapsamında *Pleurosigma sp.* ile yapılan denemeye göre oldukça düşük olduğu görülmektedir.

Yodsuwan vd. [142] denizel diatom *Phaeodactylum tricornutum* ile yaptıkları çalışmada 0 - 64.29 mg/L $NaNO_3$ konsantrasyonlarında biyokütlenin azot konsantrasyonuyla arttığı 64.29 mg/L $NaNO_3$ konsantrasyonunda maksimuma ulaştığı görülmektedir. Çalışmada kullanılan konsantrasyon aralığının en üst değerinde biyokütlenin maksimuma ulaşması daha yüksek konsantasyon değerlerinde daha da artabileceğini düşündürmektedir.

Yang vd. [143] *Navicula ve Nitzschia* cinsi denizel diatomların büyümelerinin 0 – 74.16 mg/L azot konsantrasyonu aralığında pozitif şekilde etkilediğini, *Navicula* türleri için optimal azot konsantrasyonunun 61.8 mg/L, *Nitzschia* türleri için 37.8 mg/L ve 12.36 mg/L olduğunu belirtmişlerdir.

Hemalatha vd. [144] *Chaetoceros simplex* diatomunun (441-2646 µM NO_3 konsantrasyon aralığında) hücre yoğunluğunun 1764 µM nitrat konsantrasyonuna kadar arttığı bu konsantrasyondan sonra azaldığı bildirmektedirler.

Yukarıda detayları verilen çalışmalarda diatomların cins ve tür bazında farklı miktarlarda azot ihtiyacı olduğu görülmektedir. Çalışmalarda birçok türün, standart L1 ortamındaki azot konsantrasyonuna göre oldukça yüksek azot konsantrasyonuna ihtiyaç duyduğu ancak bazı türler için L1 ortamının konsantrasyon değerinin yeterli olduğu görülmektedir. Bunun yanında *Cocconeis scutellum* gibi bazı türler için ise L1 ortamının konsantrasyon değerlerinin hücrelerin ihtiyacından fazla olduğu görülmektedir.

6.4.2 Silisyumun Diatom Büyümesi Üzerine Etkileri

Silisyum elementinin büyüme üzerine etkisini görmek için yapılan faktöriyel tasarım sonucu elde edilen Denklem 6.1'de X_3 ile ifade edilen bağımsız SiO_3 parametresinin katsayısının pozitif çıktığı gözlenmiştir. Bu denklem 0.021 – 0.189 mM SiO_3 (1.6-14.45 mg/L SiO_3 ve 0.59-5.33 mg/L Si açısından) konsantrasyonu aralığında silisyumun diatom büyümesi üzerine pozitif etki ettiğini göstermektedir. Früstül adı verilen diatom hücre duvarının ana maddesini oluşturan ve bu yüzden diatomların büyük miktarlarda ihtiyaç duyduğu, hücresel metabolizmada bazı proteinlerin sentezinde, klorofil sentezinde, sitrik asit döngüsünde rol alan silisyumun [78, 80, 81] diatomların hücre büyümesine pozitif etkisi yapılan literatürde yapılan çalışmalarda gösterilmektedir [79, 140, 142, 144, 145, 146].

Yang vd. [143] 5 diatom türü ile 0-69.03 mg/L silisyum konsantrasyonu aralığında yaptıkları çalışmaya göre silisyum, diatom büyümesi üzerinde pozitif olarak oldukça anlamlı etki etmektedir. *Çalışmada, Navicula* türleri için optimum silisyum konsantrasyonu 69.03 mg/L ilen *Nitzschia* türleri için 11.50 mg/L ve 34.51 mg/L olarak bulunmuştur. Optimum silisyum konsantrasyonları L1 ortamının değerlerinden anlamlı şekilde yüksek çıkmıştır.

Hillebrand ve Sommer [145] , tarafından 10-500 µM silisyum konsatrasyonlarında yapılan denemede diatom türlerinden *Pleurosigma elongatum*, *Melosira nummuloides* ve *Haslea cruciger* silisyum ile pozitif korelasyon göstermektedir.

Ke vd. [146] denizel ortamda yaptıkları çalışmada fitoplankton içerisinde diatom oranının silisyum ile pozitif korelasyon gösterdiğini, tuzluluk ile negatif korelasyon gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Qui-hu vd. [147] *Cocconeis, Amphora ve Navicula cinsi* üç diatomda silisyumun hücre büyümesini olumlu yönde etkilediğini ve hücre büyümesi için gerekli olduğunu vurgulamışlar türler için optimum silisyum konsantrasyonlarını 2-2.5 mg/L Si olarak bulmuşlardır.

Turpin vd. [79] denizel diatom *Haslea ostrearia* için silisyumun azot ve fosfora göre hücre büyümesi için daha önemli olduğunu ve büyümeyi sınırlandıran element olduğunu bildirmişlerdir.

Jorgensen [148] denizel diatom *Nitzschia palea'*un hücre yoğunluğunun 0 - 5 mg/L Si konsantrasyonu aralığında orantısal olarak pozitif etkilendiğini ancak 5 mg/L Si konsantrasyonundan sonra belirgin olarak etkilenmediğini vurgulamıştır.

Çalışmalarda, diatomların özellikle de früstül yapılarında yer alan silisyuma olan ihtiyaçlarının farklı cinsler ve türler arasında farklılık gösterdiği görülmektedir. Bu farklılığın früstül yapısından, yapıda yer alan silisyum formundan ve früstülün büyüklüğünden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. *Cocconeis* gibi diatom cinslerine L1 ortamının konsantrasyon değerleri yeterli gelirken, *Nitzschia* gibi cinslere ise L1 ortamının silisyum konsantrasyon değerleri yetersiz gelmektedir. Tez çalışmasındaki sonuçlarla benzer olarak, literatürdeki çoğu çalışmada diatomların standart L1 ortamı konsantrasyon değerlerinden daha fazlasına ihtiyaç duydukları görülmektedir.

6.4.3 Fosforun Diatom Büyümesi Üzerine Etkileri

Fosfor elementinin büyüme üzerine etkisini görmek için yapılan faktöriyel tasarım sonucu elde edilen denklem 6.1'de X_2 ile ifade edilen bağımsız PO_4 parametresinin katsayısı negatif çıkmıştır. Bu denklem, 0.007 mM - 0.064 mM PO_4 (0.69-6.19 mg/L PO_4 ve 0.23-2.02 mg/L P açısından) konsantrasyonu aralığında fosforun diatom büyümesi üzerine negatif etki ettiğini göstermektedir. Hücresel metabolizma açısından nükleik asitlerin, membran fosfolipitlerinin ve ATP gibi önemli moleküllerin yapısına katılan fosforun, azotun ve silisyumun diatomlar için literatürde çoğunlukla etkisinin pozitif olduğu [60, 82, 140, 142, 143] görülmektedir. Tez çalışmasında literatür taraması yapılarak seçilen sınır değer aralıklarında gerçekleştirilen faktöriyel tasarım sonucunda elde edilen model denklemindeki nitrat ve silikat etkisinin literatürle uyumlu olduğu ancak fosfor için görülen negatif etkiye literatürde çok rastlanmadığı görülmüştür. Bazı kaynaklarda fosforun hücresel büyümede önemli olduğu ancak yüksek fosfor değerlerinin büyümeyi inhibe edici etki gösterdiği gözlenmiştir. Bu nedenle, fosfat açısından sınırlayıcı değerin net olarak görülebilmesi için daha farklı fosfor konsantrasyonlarında detaylı olarak incelemenin uygun olacağı sonucuna varılmıştır.

Fosfat besin bileşeninin farklı konsantrasyonlarının (Çizelge 6.7) ayrıntılı incelemesi yapılmak üzere, diatom türü L1 besin ortamında nitrat konsantrasyonu 0.88 mM ve silikat konsantrasyonu 0,106 mM olacak şekilde, iz element ve vitamin değerleri sabit

tutularak, farklı fosfat konsantrasyonlarında (0.0076, 0.0096, 0.016, 0.036, 0.056, 0.076, 0.096 mM PO_4), inkübatör ortamında katı kültürde iki tekrarlı olarak 19 gün boyunca inkübe edilmiştir.

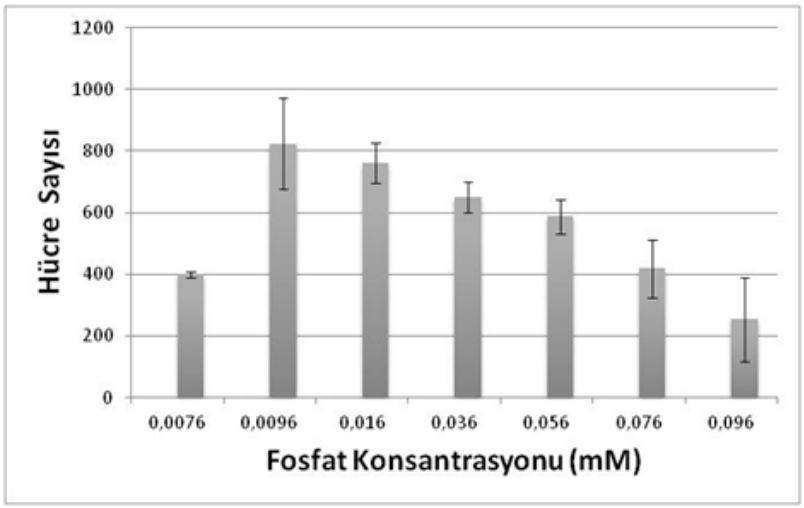
Şekil 6.10 sabit NO_3 ve SiO_3 konsantrasyonu altında farklı PO_4 konsantrasyonlarının diatom büyümesine etkilerini hücre sayısı fosfat konsantrasyonu grafiği şeklinde göstermektedir.

Çizelge 6.7 PO_4 konsantrasyonları

Faktöriyel Derece	**-3**	**-2**	**-1**	**0**	**+1**	**+2**	**+3**
PO_4 Konsantrasyonu	0.0076 mM	0.0096 mM	0.016 mM	0.036 mM	0.056 mM	0.076 mM	0.096 mM

Şekil 6.10 'da hücre sayısının 0,096 mM PO_4 konsantrasyonu değerinde maksimuma ulaştığı ardından düştüğü görülmektedir. 0.076 mM konsantrasyonun üzerinde belirgin bir düşüş görülmektedir.

Hücre sayısının maksimum değere ulaştığı 0.0096 mM'ın diatom için optimal PO_4 konsantrasyonu olduğu, bu konsantrasyondan önce ve sonra hücre sayısında meydana gelen belirgin değişikliklerden izole edilen türün fosfat konsantrasyonuna karşı hassas olduğu söylenebilir. Grafikte hücre sayısındaki azalmanın özellikle 0.076 mM ve 0.096 mM PO_4 konsantrasyonlarında ivme kazandığı görülmektedir. Optimal değere göre PO_4 konsantrasyonu on kat arttırıldığında hücre sayısının başlangıçtaki fosfor açlığı altındaki hücre sayısından daha az olduğu ve bu konsantrasyon değerinin hücre üzerinde negatif etki yaptığı görülmektedir.



Şekil 6.10 Farklı fosfat konsantrasyonlarında hücre sayısı.

Fosfor konsantrasyonu artmasıyla hücre sayısında görece azalma meydana gelmesinin en önemli sebebinin aksenik olmayan kültürde başka mikroorganizmaların fosfor zenginliğinden daha fazla avantaj elde etmesi ve böylece baskın hale gelmesi olduğu düşünülmektedir. Genel olarak ortamda besin miktarları arttığında ötrofikasyon meydana geldiği bilinse de bazı türlerin kaybolmasıyla da sonuçlanabilmektedir. Bunu sağlayan mekanizmalar arasında yarışma, allelopati, habitat değişimi, viral ya da bakteriyel saldırılar olabilir [149].

Tez kapsamında yapılan deneyde düşük fosfor varlığı *Pleurosigma sp.'*nin büyümesi için yeterli olurken diğer türler bu durumdan olumsuz etkilendiği için *Pleurosigma sp.* düşük fosfor varlığında yarışma vb. durumlar olmaksızın daha iyi büyüme göstermektedir ancak fosfor alt limit değeri büyümeyi sınırlayıcı etki de göstermektedir.

Literatürde, fosforun diatom büyümesini pozitif yönde etkilediği ancak optimal değerlerin üstünde diatom büyümesinde azalma meydana geldiğini gösteren çalışmalardan Katiyar vd. [150] diatom topluluğu ile yapılan çalışmada 0.01 - 0.05 mM fosfat konsantrasyonu aralığında hücre büyümesinde artma, 0.05 mM'dan sonra hücre büyümesinde azalma olduğu bildirilmektedir. Katiyar vd.'nin çalışmasında fosforun diatom topluluğu üzerindeki inhibisyon etkisi tez çalışmasında yapılan ilk konsantrasyon denemesi aralığındadır ve üst seviye (0.064 mM PO_4)' den düşüktür. Bu çalışmanın sonuçları, tez çalışmasındaki *Pleurosigma sp.* için ilgili konsantrasyon

aralığında (0.007-0.064Mm PO_4) görülen negatif korelasyon ile uyumludur. Ancak *Pleurosigma sp.*'nin fosfor ihtiyacı diatom topluluğunun genel fosfor ihtiyacından biraz daha düşüktür.

Wim Admiral [151], içinde *Navicula* ve *Gyrosigma*'nın da olduğu 10 diatoma ile 0.009-0.9 mM fosfat konsantrasyonu aralığında besin etkilerinin incelendiği çalışmasında 0.9 mM fosfat konsantrasyonunda hücresel büyüme, *Gyrosigma* gibi bazı türlerde hafifçe inhibe olmuş ve artan konsantrasyon ile büyümede dalgalanma meydana gelmiştir.

Khan vd. [141] *Skeletonema costatum* ile yapılan çalışmada 0.1 - 1.5 mg/L fosfat konsantrasyonu aralığında hücre bölünme hızında artış, 1.5 mg/L 'den sonra azalma meydana gelmekte ancak 1.5, 5 ve 15 mg/L fosfat konsantrasyonları arasında anlamlı bir değişiklik olmamaktadır. 50 mg/L konsantrasyonda hücre hızında belirgin düşüş meydana gelmektedir. Çalışmada 1.5 mg/L PO_4 konsantrasyonundan sonra hücre bölünme hızında anlamlı bir artış olmaması tez kapsamında yapılan çalışmaya benzer şekilde düşük fosfor konsantrasyonunun (L1 ortamından düşük) büyüme için yeterli olduğunu göstermektedir. Bu konsantrasyon değerinden sonra ortamda avantaj elde edebilecek başka türler varsa büyümeyi baskılayabilir. Baskılama yarışmacı türün diğer besin elementlerini kullandığı oranda gerçekleşir.

Venkataraman [152] *Ankistrodesmus falcatus* için 0.005-0.2 mg/L fosfor konsantrasyonu aralığında büyümenin fosfor ile orantılı olduğunu 1 mg/L konsantrasyonun optimum olduğunu ve bu değerin üzerinde büyümenin inhibe olduğunu bildirmektedir. Çalışmada besin ihtiyaçları L1 ortamı koşullarıyla paralel bulunmuştur.

Ketchum [153] *Asterionella formosa* diatomu için doğal göl suyuna 0.002 mg/L fosfor eklenmesiyle maksimum büyüme elde edildiğini, 0.05 mg/L fosfor daha eklenmesinin ise büyümeyi inhibe ettiğini bildirmektedir.

Hemalatha vd. [144] diatom *Chaetoceros simplex* ile yapılan çalışmada 72.4 µM PO4 konsantrasyonunda maksimum hücre yoğunluğu elde edildiği bildirilmektedir.

Yang vd. [143] beş diatom türünde 0 - 3.98 mg/L fosfor konsantrasyonu aralığında fosforun diatom büyümesi üzerine pozitif olarak oldukça anlamlı etki ettiğini *Navicula* türleri için optimum fosfor konsantrasyonunun 2.84 ve 3.41 mg/L olduğunu, *Nitzschia*

türleri için 2.27 ve 3.41 mg/L olduğunu bildirmişlerdir. Hemalatha vd. [144] ile Yang vd. [143] çalışmalarında türlerin fosfor ihtiyaçları tez kapsamında izole edilen *Pleurosigma sp.*'ye göre yüksek çıkmıştır.

Qui-Ha vd. [140] dört diatom türü ile yaptıkları çalışmada *Amphora coffeaeformis* için optimum fosfor konsantrasyonunu 1.13 mg/L *Cocconeis scutellum* için 0.283 mg/L ve *Navicula* türleri için *0*.565 mg/L ve 0.141 mg/L olarak bulmuşlardır.

Çalışmalarda fosfor ihtiyaçlarının cins bazında ve tür bazında değişiklik gösterdiği, *Chaetoceros simplex ile bazı Nitzschia* ve *Navicula* türlerinin fosfor ihtiyacının *Pleurosigma sp.*'den farklı olarak standart L1 ortamından yüksek olduğu görülmektedir. *Ankistrodesmus falcatus* gibi bazı türlerin ise ihtiyacının L1 ortamına benzer olduğu, *Cocconeis scutellum* ve bazı *Navicula* türlerinin de fosfor ihtiyacının *Pleurosigma sp.* ile benzer şekilde L1 ortamından oldukça düşük olduğu görülmektedir.

Diatomların büyürken azot, silisyum ve fosfor gibi besinlere duydukları gereksinimleri, bu besin maddelerinin çevre şartlarına ve hücrenin spesifik ihtiyaçlarına göre düzenlenen metabolizma faaliyetlerinde ne kadar kullanıldığıyla doğrudan ve hücrenin boyutlarıyla da dolaylı olarak ilişkili olabilir.

Tez çalışması kapsamında izole edilen *Pleurosigma sp.*'nin optimal azot ve silisyum konsantrasyonunun standart L1 ortamı konsantrasyon değerlerinden fazla olduğu, ancak optimal fosfor konsantrasyonunun L1 ortamının değerinden oldukça düşük olduğu görülmektedir. Bu anlamda izole edilen türün fosfor açısından konsantrasyon değişiminden kolayca etkilenebildiği, bu nedenle fosfora karşı hassas bir tür olabileceği ve bu özelliğiyle de çevresel kirlilik izleme gibi spesifik amaçlar için değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

BÖLÜM 7

SONUÇ ve ÖNERİLER

Ülkemizin yerel alg kaynaklarının değerlendirilmesi kapsamında, Marmara Denizi Mudanya kıyılarından diatom izolasyonu mikropipet ile izolasyon, seri dilüsyon ve yerçekimi ile izolasyon gibi yöntemler kombine edilerek yapılmış, ileri temizleme yöntemleri uygulanmayarak aksenik olmayan kültür ile deneyler gerçekleştirilmiştir.

Büyük kültüre alınan diatom türü dışında mikroskop altında morfolojik değerlendirmeye göre *Cylindrotheca sp.* ve *Thalassiosira sp.* olduğu tahmin edilen türler de izole edilmiş ancak bu türleri büyük kültürde devam ettirmek mümkün olmamıştır.

Büyük hacimde kültüre alınabilen diatomun spesifik büyüme hızı 0,173 gün^{-1} olarak bulunmuştur.

İzolasyonu gerçekleştirilen diatom dizi analizi yapılarak moleküler olarak tanımlanmış ve *Pleurosigma sp.* olduğu tespit edilmiştir. Ancak tür bazında tanımlama yapabilmek için farklı primerlerle ileri moleküler analizlerin yapılması ve analizin detaylı morfolojik bulgularla da desteklenmesi gerekmektedir.

Besin maddelerinin diatom büyümesi üzerine etkilerinin incelenmesi 2^3 faktöriyel tasarım metodu kullanılarak, katı kültürde, seçilen 9 koşul altında iki tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve "çoklu lineer regresyon" yöntemi uygulandığında; "$X_4 = 155 + 35{,}2X_1 - 21{,}9X_2 + 38{,}1_{X3}$" normalize edilmiş denklemi bulunmuştur.

Denkleme göre nitrat ve silikat hücre büyümesi üzerinde pozitif etki yaparken, seçilen değer aralıkları için fosfatın negatif etkisi olduğu görülmüştür.

Tez çalışmasında seçilen sınır değer aralıklarında faktöriyel tasarım sonucunda elde edilen model denklemindeki nitrat ve silikat etkisinin literatürle uyumlu olduğu ancak fosfor için görülen negatif etkiye literatürde çok rastlanmadığı görülmüştür. Literatürde fosforun hücresel büyümede önemli olduğu ancak yüksek fosfor değerlerinin büyümeyi inhibe edici etki gösterdiği gözlenmiştir. Bu nedenle, fosfat açısından sınırlayıcı değerin net olarak görülebilmesi için daha farklı fosfor konsantrasyonlarında detaylı olarak incelemenin uygun olacağı sonucuna varılmıştır. Yalnızca fosfor konsantrasyonu değiştirilerek yapılan deneyde oldukça düşük konsantrasyondaki fosforun büyümeyi pozitif yönde etkilediği görülmüştür. Optimal fosfat konsantrasyonu 0.0096 mM olarak bulunmuştur. Fosfat konsantrasyonunun 0.076 mM 'ın üzerinde olduğunda büyümenin inhibe olduğu görülmüştür. *Pleurosigma sp.*'nin fosfat konsantrasyonu değişimine karşı hassas olduğu görülmüştür.

Pleurosigma sp.'nin yağ asidi profili genel olarak literatürde diatomlarda sıklıkla karşılaşılan yağ asidi profiliyle örtüşmekte ve palmitik asit (16:0), oleik asit (18:1), linoleik asit (18:2, ω-6), ekosatrionik asit (20:3, ω-6), ekosapentanoik asit (20:5, ω-3), erüsik asit (22:1) içermektedir.

Yapılan deneysel çalışmalar ve literatür araştırmaları göstermektedir ki Marmara Denizi Mudanya kıyılarında izole edilen ve *Pleurosigma sp.* olarak tanımlanan diatom türü silisyumu yüksek miktarda absorbe etmesi ve silisyumlu früstül yapısıyla filtrasyon prosesleri, biyosensör uygulamaları, biyomedikal implantlar vb. alanlarda genel olarak malzeme biliminde; fosfor hassasiyeti ile çevresel kirlilik izleme alanında kullanılabilir.

Ticari açıdan potansiyel olabilecek diatom türlerinin yerel bölgelerden izole edilmesi, hücresel içeriklerinin ortaya çıkarılması, gerçekçi ve uygulanabilir şartlarda yetiştirilerek besin vb. ihtiyaçlarının tespit edilmesi türlerin değerlendirilebilmesinin birincil adımıdır. Bu anlamda Türkiye coğrafyası geniş bir biyoçeşitlilik potansiyeli ile bilim insanlarının önünde durmaktadır. Bu süreçte tür izolasyonunda mikromanipülasyon gibi ileri tekniklerin kullanılarak zaman ve paradan tasarruf edilmesi, aksenik türler elde edilerek ekonomik fizibilitenin arttırılması, besin, ışık, sıcaklık gibi etmenlerin yerel

olarak değerlendirilmesi ve ilgili türe hızlı bir şekilde adapte edilmesi, dahası yerel kültür koleksiyonları kurularak bilgi birikiminin ve potansiyelinin diğer araştırmacılarla/girişimcilerle paylaşılması hem bu alanda çalışan bilim insanlarının hem de karar merciindeki yöneticilerin göz önünde bulundurması gereken konulardandır.

KAYNAKLAR

[1] Kim, S., (2015). Handbook of Marine Microalgae, First Edition, Elseiver Inc., San Diego.

[2] Brennan, L. ve Owende, P., (2010). "Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products.", Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14(2): 557-577.

[3] Baicha, Z., Salar-García M.J. ve Ortiz-Martínez V. M., Hernández-Fernández F.J., Ríos, A.P., Labjar N., Lotfi E., Elmahi M., (2016). "A critical review on microalgae as an alternative source for bioenergy production: A promising low cost substrate for microbial fuel cells." Fuel Processing Technology 154: 104-116.

[4] Rezanka, T., Nedbalova L., Lukavsky j., Strizek A. ve Sigler K., (2017). "Pilot cultivation of the green alga Monoraphidium sp. producing a high content of polyunsaturated fatty acids in a low-temperature environment.", Algal Research, 22: 160-165.

[5] Hannon, M., Gimpel, J., Tran, M., Rasala B. ve Mayfield, S., (2010).” Biofuels from algae: challenges and potential”, Biofuels, 1(5): 763–784.

[6] Vaz, B. d. S., Moreira, J.B., Morais, M.G. ve Costa J.A.V., (2016). "Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements.", Current Opinion in Food Science, 7: 73-77.

[7] Fuhrmann, T. , Lanwehr, S. ve El Rharbi – Kucki, M. ve Sumper, M., (1997). “ Diatoms as living photonic crystals”, Applied Physics, 82:909–965.

[8] Raven J.A. ve Waite, A. M., (2004). “The evolution of silicification in diatoms: inescapable sinking and sinking as escape?”, New Phytologist 162 : 45–61.

[9] Lebeau, T. ve Robert, J. M., (2003). “Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part II: Current and putative products”, Applied Microbiology and Biotechnology, 60:624–632.

[10] Parkinson, J. ve Gordon, R., (1999). “Beyond micromachining: the potential of diatoms”, Tibtech, 17:190-196.

[11] Rawat, I., Kumar, R.R., Mutanda, T. ve Bux F., (2013). "Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production.", Applied Energy, 103: 444-467.

[12] Spolaore, P., Cassan, C. J., C., Duran, E. ve Isambert, A., (2006). ”Commercial applications of microalgae”, Journal of Bioscience and Bioenginering, 101:87 96.

[13] Scholz B. ve Liebezeit G., (2012). “Growth responses of 25 benthic marineWadden Sea diatoms isolated from the Solthörn tidal flat (southern North Sea) in relation to varying culture conditions”, Diatom Research, 27(1):65–73.

[14] Andersen, R. A., (2005). Algal Culturing Techniques, Elseiver Academic Press, Hong Kong.

[15] Fröhlich, J. ve Kornig, H., (2000). ” New techniques for isolation of single prokaryotic cells”, Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews, 24:567-572.

[16] Jacobsen, C., Nielsen N.S., Horn, A. F. ve Sorensen A., M., (2013). Food Enrichment with omega-3 Fatty Acids, First Edition, Woodhead Publishing Limited, Cambridge.

[17] Droop M.R., (2007). “A procedure for routine purification of algal cultures with antibiotics”, British Phycological Bulletin, 3(2): 295-297.

[18] Ejike, E. C. C., Collins, S. A., Balasuriya, N., Swanson, A. K., Mason, B. ve Udenigwe, C. C., (2016). “Prospects of microalgae proteins in producing peptide-based functional foods for promoting cardiovascular health”, Trends in Food Science & Technology (baskıda).

[19] Tandon, P. ve Jin, Q., (2017). ”Microalgae culture enhancement through key microbial approaches”, Renewable and Sustainable Energy Reviews, 80:1089-1099.

[20] Pina-Pérez, M. C., Rivas, A., Martínez, A. ve Rodrigo, D., (2017). ”Antimicrobial potential of macro and microalgae against pathogenic and spoilage microorganisms in food, Food Chemistry (baskıda).

[21] Chew, K. W., Yap, J. Y., Show, P. L., Suan, N. H., Juan, J. C., Ling, T. C., Lee, D. ve Chang, J., (2017). “Microalgae biorefinery: high value products perspectives, Bioresource Technology (baskıda).

[22] Chisti, Y., (2007). ”Biodiesel from microalgae”, Biotechnology Advances, 25:294-306.

[23] Oncel, S. S., (2013). “Microalgae for a macroenergy world”, Renewable and Sustainable Energy Reviews, 26:241-264.

[24] Crawford, M. A., Costeloe, K., Ghebremeskel, K., Phylactos, A., Skirvin, L. ve Stacey, F., (1997). ”Are deficits of arachidonic and docosahexaenoic acids responsible for the neural and vascular complications of preterm babies?”, The American Journal of Clinical Nutrition, 66:1032-44.

[25] Gupta, A., Barrow, C. J. ve Puri, M., (2012). ”Omega-3 biotechnology: Thraustochytrids as a novel source of omega-3 oils”, Biotechnology Advances, 30:1733-1745.

[26] Rubio-Rodriguez, N., Beltran, S., Jaime, I., Diego, S. M., Sanz, M. T. ve Carballido, J. R., (2010). “Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review”, Innovative Food Science and Emerging Technologies,11:1-12.

[27] Gong, M. ve Bassi, A., (2016). “Carotenoids from microalgae: A review of recent developments”, Biotechnology Advances (baskıda).

[28] Moreno-Garcia, L., Adjalléb, K., Barnabéb, S. ve Raghavana, G. S. V., (2017). "Microalgae biomass production for a biorefinery system: Recent advances and the way towards sustainability", Renewable and Sustainable Energy Reviews, 76: 493-506.

[29] Mata, T. M., Martins, A. A. ve Caetano, N. S., (2010). "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review", Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14(1): 217-232.

[30] Wen, Z.-Y. ve Chen, F., (2003). "Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae.", Biotechnology Advances, 21(4): 273-294.

[31] Patel, A., Gamia, B., Patela, P. ve Patela, B., (2016). "Microalgae: Antiquity to era of integrated technology.", Renewable and Sustainable Energy Reviews, 71: 535-547.

[32] Su, Y., Songb, K., Zhangb, P., Suc, Y., Chenga, J. ve Chena, X., (2017). "Progress of microalgae biofuel’s commercialization.", Renewable and Sustainable Energy Reviews, 74: 402-411.

[33] Milano, J., Ong, H. C., Masjuki, H. H., Chong, W. T., Lam, M. K.,Loh, P. G. ve Vellayan, V., 2016. “Microalgae biofuels as an alternative to fosil fuel for power generation”, Renewable and Sustainable Energy Reviews, 58:180–197.

[34] Turon, V., Trably, E., Fouilland, E. ve Steyer, J-P., 2016. ”Potentialities of dark fermentation effluent as substrates for microalgae growth: A review”, Process Biochemistry (baskıda).

[35] Huang, G., Chen, F., Wei, D., Zhang, X. ve Chen, G., (2010). "Biodiesel production by microalgal biotechnology.", Applied Energy, 87(1): 38-46.

[36] Perez-Garcia O., Escalante, F. M. E., de-Bashan L.E. ve Bashan Y., (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. Water Research, 45:11-36.

[37] Razzak, S. A., , Alia, S.A.M., Hossaina, M.M. ve Lasa, H., (2017). "Biological CO 2 fixation with production of microalgae in wastewater – A review.", Renewable and Sustainable Energy Reviews, 76: 379-390.

[38] Farooq, W., Lee, Y., Ryu, B., Kim, B., Kim, H., Choi, Y. ve Yang, J., (2013). “Bioresource Technology 132:230–238.

[39] Sabatar, S., (2009). Diatoms, Encyclopedia of Inland Waters (Ed. Gene E. Likens), 149-156.

[40] Round, F. R.,Crawford R. M. ve Mann D.G., (1990). The Diatoms: Biology and Morphology of the Genera, Cambridge University Press,Cambridge.

[41] Dolatabadi J. E. N. ve Guardia, M., (2011). "Applications of diatoms and silica nanotechnology in biosensing, drug and gene delivery, and formation of complex metal nanostructures",Trends in Analytical Chemistry,30(9):1539-1548.

[42] Lopez, P. J., Descles, J., Allen, A. E. ve Bowler, C., (2005). "Prospects in diatom research", Current opinion in Biotechnology,16:180-186.

[43] Fu, W., Wichuk, K. ve Brynjolfsson, S., (2015). "Develoing diatoms for value-added products: challanges and opportunities", New Biotechnology, (baskıda).

[44] Levitan, O., Dinamarca, J., Hochman, G. ve Falkowski, P. G., (2014). "Diatoms: a fosil fuel of the future", Trends in Biotechnology (baskıda).

[45] Mutanda, T., Ramesh, D., Karthikeyan, S., Kumari, S., Anandraj, A. ve Bux F., (2011). "Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production", Bioresource Technology, 102: 57–70.

[46] Heaney, S. I., ve Jaworski, G. H. M., (1977). "A simple separation technique for purifying micro-algae", British Phycological Journal, 12:2, 171-174.

[47] Ghosh, A., Khanra, S., Mondal, M., Halder, G., Tiwari, O. N., Saini, S., Bhowmick, T. K. ve Gayen, K., (2016). "Progress toward isolation of strains and genetically engineered strains of microalgae for production of biofuel and other value added chemicals:A review", Energy Conversion and Management, 113:104–118.

[48] Paasche, E., (1971). "A simple method for establishing bacteriafree cultures of phototactic flagellates.", *Conseil International pour l'Exploration de la Mer.,* 33:509–511.

[49] Davey, M. H. ve Kell, D.B., (1996). "Flow Cytometry and Cell Sorting of Heterogeneous Microbial Populations: the Importance of Single-Cell Analyses", Microbiological Reviews, 60: 641-696.

[50] Hyka, P., Lickova, S., Pribyl, P., Melzoch, K. ve Kovar, K., (2013). "Flow cytometry fo the development of biotechnological processes with microalgae", Biotechnology Advances, 31: 2–16.

[51] Jones , A.K., Rhodes M.E. ve Evans S.C., (1973). " The use of antibiotics to obtain axenic cultures of algae", British Phycological Journal, 8:2, 185-196.

[52] Kudo, I., Miyamoto, M., Noiri, Y. ve Maita, Y., (2000). "Combined effects of temperature and iron on the growth and physiology of the marine diatom Phaeodactylum tricornutum (Bacillariophyceae)", Journal of Phycology, 36:1096–1102.

[53] Grobbelaar J. U., (2004). Algal Nutrition, In:Handbook of Microalgal Culture:Biotechnology and Applied Phycology (Ed. By A. Richmond),CRC Press, Inc., Boca Raton, 97-113.

[54] Howarth, R., ve Marino, R., (2006). "Nitrogen as the limiting nutrient for eutrophication in coastal marine ecosystems: evolving views over three decades", Limnology and Oceanography, 51, 364–376.

[55] Juneja A., Ceballos R.M. ve Murthy G.S., (2013). Effects of Enviromental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review. Energies.6:4607-4638.

[56] Fujita, R.M., Wheeler, P. A. ve Edwards, R. L., (1988). Metabolic regulation of ammonia uptake by *Ulva* rigida (*Chlorophyta*): A compartmental analysis of the rate limiting step for uptake. Journal of Phycology, 24: 560–566.

[57] Gordillo, F. J. L., Jiménez, C., Figueroa, F. L. ve Niell, F. X., (1998). Effects of increased atmospheric CO2 and N supply on photosynthesis, growth and cell composition of the cyanobacterium *Spirulina platensis* (*Arthrospira*). , Journal of Applied Phycology, 10: 461–469.

[58] Rogato A., Amato A., Ludicone D.,Chiurazzi M., Ferrante M.I. ve d'Alcala M. R., (2015). "The diatom molecular toolkit to handle nitrogen uptake, Marine Genomics, 24:95-108.

[59] Shangguan Y., Gilbert P. M., Alexander J., Madden C. J. ve Murasko S., (2017). Phytoplankton assemblage response to changing nutrients in Florida Bay: Results of mesocosm studies, Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 494 : 38–53.

[60] Markou, G., Vandamme, D. ve Muylaert, K., (2014). Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients, Water Research, 65:186-202.

[61] Thompson, G. A., Jr., (1996). "Lipids and membrane function in green algae", Biochimica Biophysica Acta, 1302, 17–45.

[62] Wang, H. D., Chen, C., Huynh, P. ve Chang, J., (2014). "Exploring the potential of using algae in cosmetics ", Bioresource Technology, (baskıda).

[63] Stephenson A. L., Dennis J. S., Howe C. J., Scott S. A. ve Smith A. G., (2010). Influence of nitrogen-limitation regime on the production by *Chlorella vulgaris* of lipids for biodiesel feedstocks, Biofuels 1(1):47–58.

[64] Borowitzka, M.A., Huisman, J. M. ve Osborn, A., (1991). Cultures of the astaxanthinproducinggreen alga Haematococcus pluvialis. I. Effect of nutrient on growth and cell type, Journal of applied psychology, 3:295–304.

[65] Ben-Amotz, A., Katz, A. ve Avron, M., (1982). Accumulation of b-carotene in halotolerant algae: purification and characterization of b-carotene-rich globules from Dunaliella bardawil (Chlorophyceae), Journal of Physiology, 18: 529–37.

[66] Borowitzka, M. A. ve Borowitzka, L. J., (1988). Dunaliella. In: Microalgal Biotechnology (Ed. M.A. Borowitzka & L.J. Borowitzka), Cambridge University Press, Cambridge, UK, 27-58.

[67] Kilham S. S., Kreeger D. A., Goulden C. E. ve Lynn S. G., (1997). "Effects of nutrient limitation on biochemical constituents of *Ankistrodesmus falcatus"*,Freshwater Biology, 38:591-596.

[68] Hu Q., (2004). "Enviromental effects of on cell composition. In:Handbook of Microalgal Culture:Biotechnology and Applied Phycology (Ed. By A. Richmond)",CRC Press, Inc., Boca Raton, 83-90.

[69] Schindler, D. W., (1977). "Evolution of phosphorus limitation in lakes", Science, 195, 260–262.

[70] Bhaya D., Schwarz R. ve Grossman A. R., (2002). "Molecular Responses Environmental Stress In:The ecology of cyanobacteria-Their diversity in time and space,(Ed. Whitton B.A and Potts M.)", 397-442, Kluwer Academic Publishers, USA.

[71] Geider, R.J. ve La Roche, J., (2002). "Redfield revisited: variability of C: N:P in marine microalgae and its biochemical basis", European Journal of Phycology, 37 (01): 1-17.

[72] Powell N., Shilton A., Chisti Y. ve Pratt S., (2009). "Towards a luxury uptake process via microalgae – Defining the polyphosphate Dynamics", Water Research, 43:4207–4213.

[73] Ellwood, N. T. W., Di Pippo, F. ve Albertano, P., (2012). "Phosphatase activities of cultured phototrophic biofilms", Water Reearch. 46 (2): 378-386.

[74] Whitton, B. A., Al-Shehri, A. M., Ellwood, N. T. ve Turner, B. L., (2005). "Ecological Aspects of Phosphatase Activity in Cyanobacteria, Eukaryotic Algae and Bryophytes, In: Organic Phosphorus in the Environment", CAB International, Wallingford, UK, 205-241.

[75] Healey F.P. ve Hendzel L. L., (1979). "Indicators of phosphorus and nitrogen deficiency in five algae in culture", Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 36: 1364–1369.

[76] Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N. ve Lan, C. Q., (2008). "Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*", Applied Microbial Biotechnoogy. 81: 629–636.

[77] Kobayashi, M., Kakizono, T. ve Nagai, S., (1993). "Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis"*, Appied Environmental Microbiology, 59: 867–873.

[78] Hoffmann, L. J., Peeken, I. ve Lochte K., (2007). "Co-limitation by iron, silicate, and light of three Southern Ocean diatom species", Biogeosciences Discuss., 4: 209–247.

[79] Turpin V., Robert J. ve Goulletquer P., (1999). “Limiting nutrients of oyster pond seawaters in the Marennes-Oléron region for *Haslea ostrearia*: applications to the mass production of the diatom in mesocosm experiments”, Aquatic Living Resources 12(5):335−342.

[80] Bowler C., Martino A. ve Falciatore A., (2010). “Diatom cell division in an environmental context”, Current Opinion in Plant Biology, 13:623–630.

[81] Burnett, J. H., Baker, H. G., Beevers, H. ve Whatley, F. R., (1977). “The Biology of Diatoms (Ed. Werner, D.”, University of California Press, California, 111,142.

[82] Hildebrand M., Davis, A. K., Smith, S. R. Traller J. C. ve Abbriano R., (2012). “The place of diatoms in the biofuels industry”, Biofuels 3(2):221–240.

[83] Thamatrakoln K. ve Hildebrand M., (2008). “Silicon uptake in diatoms revisited, a model forsaturable and nonsaturable uptake kinetics and the role of silicon transporters”, Plant Physiopgy. 146:1397–1407.

[84] Javaheri N., Dries R., Burson A., Stal L. J., Sloot P. M. A. ve Kaandorp J. A., (2015). “Temperature affects the silicate morphology in a diatom”, Nature, 5:11652-11661.

[85] Taguchi, S., Hirata J. A. ve Laws, E. A., (1987). “Silicate deficiency and lipid synthesis of marine diatoms”, Journal of Phycology, 23:260–267.

[86] Wen, Z. Y. ve Chen, F., (2000). “Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by the diatom Nitzschia laevis: effects of silicate and glucose”, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 25:218–224.

[87] Coombs, J., Halicki, P. J., Holm-Hansen, O. ve Volcani B. E., (1967). “Studies on the biochemistry and fine structure of silicate shell formation in diatoms: II. Changes in concentration of nucleoside triphosphates in silicon-starvation synchrony of Navicula pelliculosa (Breb.) Hilse”, Experimental Cell Research, 47:315– 28.

[88] Vasumathi, K. K., Premalatha, M. ve Subramanian, P., (2012). “Parameters influencing the design of photobioreactor for the growth of microalgae”, Renewable and Sustainable Energy Reviews 16:5443–5450.

[89] Lavens, P. ve Sorgeloos P., (1996). “Manual on the production and use of live food for aquaculture”, FAO Fisheries Technical Paper No. 361, Rome. FAO, 10–14.

[90] Ramanna, L., Rawat, I. ve Bux F., (2017). “Light enhancement strategies improve microalgal biomass productivity”, Renewable and Sustainable Energy Reviews 80 :765–773.

[91] Ras, M., Steyer, J. ve Bernard, O., 2013. “Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, Springer, 12 (2), pp.153-164.

[92] Morris, I., Glover, H. ve Yentsch, C., (1974). “Products of photosynthesis by marine phytoplankton: The effect of environmental factors on the relative rates of protein synthesis”, Marine Biology, 27: 1–9.

[93] Razzak, S., Hossain, M. M., Lucky, R. A., Bassi, A. S. ve Lasa, H., (2013). "Integrated CO2 capture, waste water treatment and biofuel production by microalgae culturing—A review", Renewable and Sustainable Energy Reviews, 27:622–653.

[94] Hinga, K. R., (1992). "Co-occurrence of dinoflagellate blooms and high pH in marine enclosures", Marine Ecology Progress Series, 86: 181–187.

[95] Chen, C. Y. ve Durbin, E. G., (1994). "Effects of pH on the growth and carbon uptake of marine phytoplankton", Marine Ecology Progress Series, 109:83-94.

[96] Weckström, J., Korhola, A. ve Blom, T., (1997). "Diatoms as quantitative indicators of pH and water temperature in subarctic Fennoscandian lakes", Hydrobiologia, 347: 171-184.

[97] Taraldsvık M. ve Myklestad S. M., (2000). "The effect of pH on growth rate, biochemical composition and extracellular carbohydrate production of the marine diatom Skeletonema costatum", Europe's Journal of Psychology, 35: 189–194.

[98] Zhu, M., Zhang, X. ve Mao Y., (2003). "Effects of Temperature, Salinity and Illumination on the Growth of Thalassiosira sp. ", Marine Sciences, 27(12) 58-61.

[99] Kumar, K., Mishra, S. K., Shrivastav, A., Park, M. S. ve Yang, J., (2015). " Recent trends in the mass cultivation of algae in raceway ponds", Renewable and Sustainable Energy Reviews, 51:875–885.

[100] Kunjapur, A. M. ve Eldridge, R. B., (2010). "Photobioreactor design for commercial biofuel production from microalgae" Industrial & Engineering Chemistry Research 8(49): 3516-3526.

[101] Ugwu C. U., Aoyagi, H. ve Uchiyama H., (2008). "Photobioreactors for mass cultivation of algae", Bioresource Technology 99: 4021–4028.

[102] Janvanmardian, M. ve Palsson, B.O., (1991). "High density photoautotrophic algal cultures: design, construction and operation of a novel photobioreactor system", Biotechnology and Bioengeneering, 38, 1182–1189.

[103] Richmond, A., (2004). Biological Principles of Mass Cultivation, In:Handbook of Microalgal Culture:Biotechnology and Applied Phycology(Ed. By A. Richmond), CRC Press, Inc., Boca Raton, 125-178.

[104] Boussiba, S., Sandbank, E., Shelef, G., Cohen, Z., Vonshak, A., Ben- Amotz, A., Arad, S. ve Richmond, A., (1988). "Outdoor cultivation of the marine microalga Isochrysis galbana in open reactors", Aquaculture, 72, 247–253.

[105] Ogbonna, J.C., Soejima, T. ve Tanaka, H., (1999). "An integrated solar and artificial light system for internal illumination of photobioreactors", Journal Biotechnology, 70: 289–297.

[106] Ogbonna, J.C. ve Tanaka, H., (2001). "Photobioreactor design for photobiological production of hydrogen. In: Miyake, J., Matsunaga, T., San

Pietro, A. (Eds.), Biohygrogen II – An Approach to Environmentally Acceptable Technology", Pergamon Press, London, 245–261.

[107] Degen, J., Uebele, A., Retze, A., Schmidt-Staigar, U. ve Trosch, W.A., (2001). "A novel airlift photobioreactor with baffles fro improved light utilization through flashing light effect", Journal Biotechnology, 92: 89–94.

[108] DiatomBase (2015). http://www.diatombase.org/aphia.php?p=taxdetails&id=231884, Erişim tarihi: 03.9.2017.

[109] Borowitzka, M. A. ve Moheimani, N. R., (2013). "Algae for Biofuels and Energy", Springer Publication, New York London.

[110] Zimmerman, J., Jahn, R. ve Gemeinholzer, B., (2011). "Barcoding diatoms: evaluation of the V4 subregion on the 18S rRNA gene, including new primers and protocols", Organisms Diversity&Evolution, 11:173-192.

[111] Luddington, A., Kaczmarska, I. ve Lovejoy, C., (2012). "Distance and Character-Based Evaluation of the V4Region of the 18S rRNA Gene for the Identification of Diatoms (Bacillariophyceae)", Public Library of Science ONE, 7(9):1-11 .

[112] Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. ve Miller, W., (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", Journal of Computational Biology 7(1-2):203-14.

[113] Morgulis, A., Coulouris, G., Raytselis, Y., Madden, T. L., Agarwala, R. ve Schäffer A. A., (2008). "Database Indexing for Production MegaBLAST Searches", Bioinformatics 24:1757-1764.

[114] García, R., Pizarro, C., Lavín, A. G. ve Bueno, J. L., (2013). "Biomass Proximate Analysis using Thermogravimetry", Bioresource Technology, 139:1-4.

[115] Nielsen, S. S., (2003). "Food analysis laboratory manual, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

[116] Gilstad, M. ve Sakshaug, E., (1990). "Growth rates of ten diatom species from the Barents Sea at different irradiances and day lengths", Marine Ecology Progress Series, 64:169-173.

[117] Martin-Jézéquel, V., Calu, G., Candela, L., Amzil, Z., Jauffrais, T., Séchet, V. ve Weigel, P., (2015). "Effects of organic and inorganic nitrogen on the growth and production of domoic acid by Pseudo-nitzschia multiseries and P. Australis (Bacillariophyceae) in culture", Marine Drugs, 13:7067–7086.

[118] Zhang, Q.,Gradinger, R. ve Spindler, M., (1999). "Experimental study on the effect of salinity on growth rates of Arctic-sea-ice algae from the Greenland Sea", Boreal Environmental Research, 4:1-8.

[119] Werner, D., (1977). "Silicate metabolism. In: Werner D (ed.) The biology of diatoms", Blackwell, Oxford, 110–149.

[120] Pahl, S. L., Lewis, D. M., Chen, F. ve King, K. D., (2010). "Growth dynamics and the proximate biochemical composition and fatty acid profile of the heterotrophically grown diatom Cyclotella cryptica", Journal of Applied Phycology, 22:165–171.

[121] Parsons, T. R., Stephens, K. ve Strickland, J. D. H., (1961). "On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankton", Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 18:1001-16.

[122] Simental-Trinidad, J. A., Sanchez-Saavedra, M. P. ve Correa- Reyes, J. G., (2001). "Biochemical composition of benthic marine diatoms using as culture medium agricultural fertilizer", Journal of Shellfish Research, 2:611-617.

[123] De Angelis, R., Melino, S., Prosposito, P., Casalboni, M., Lamastra, F. R., Nanni, F., Bruno, L. ve Congestri, R., (2016). "The diatom Staurosirella pinnata for photoactive material production", Public Library of Science ONE, 1-17.

[124] De Stefano, L., Rendina, I., De Stefano, M., Bismuto, A., ve Maddalena, P., (2005). "Marine diatoms as optical chemical sensors", Applied Physics Letters, 87: 233902-3.

[125] Xia, S., Gao, B., Li, A., Xiong, J., Ao, Z., ve Zhang, C., (2014). "Preliminary characterization, antioxidant properties and production of chrysolaminarin from marine diatom Odontella aurita", Marine Drugs, 12:4883-4897.

[126] Zhang, J., Ding, T., Zhang, Z., Xu, L. ve Zhang, C., (2015). "Enhanced adsorption of trivalent arsenic from water by functionalized diatom silica shells", Public Library of Science ONE, 1-18.

[127] Lambert, J. B., Shurvell, H. F. ve Cooks, G., (1987). "Introduction to organic spectrroscopy", Macmillian,New York, 174-177.

[128] Myklestad, S. ve Haug, A., (1972). "Production of Carbohydrates by marine diatom Chaetoceros affinis var. willei (Gran) Hustedt. I.Effect of the concentration of nutrients in the culture medium", Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 9:125-136.

[129] Brown, M. R., Dunstan, G. A.,Norwood, S. J. ve Miller, K. A., (1996). "Effects of harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana"*, Journal of Phycology,32:64-73.

[130] Ansell, A. D., Coughlan, J., Lander, K. F. ve Coosmore, F. A., (1964). "Studies on the mass culture of Phaeodactylum . IV. Production and nutrient utilization in outdoor mass culture", Limnology and Oceanography, 9:334-342.

[131] Marella, T. K., Parine, B. R. ve Tiwari, A., (2017)." Potential of diatom consortium developed by nutrient enrichment for biodiesel production and simultaneous nutrient removal from waste water", (baskıda).

[132] Karpenyuk, T. A. ve Orazova, S. B., Dzhokebaeva, S. A., Goncharova, A. V., Tzurkan, Y. S., (2013). "Analysis of Microalgae Lipids Isolated from Basin of Kazakhstan, to Assess the Prospects of Practical Use", International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering, 7(7):746-748).

[133] Chen, Y., (2006). "Immobilization of twelve benthic diatom species for long-term storage and as feed for post-larval abalone Haliotis diversicolor", Aquaculture, 263:97-106

[134] Volkman, J. K. Jeffrey, S. W., Nichols, P. D., Rogers, G. I. ve Garland, C. D., (1989). ”Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture”, 128:219-240.

[135] Dunstan, G., Volkman, J. K., Barret, S. M., Leroi, J. ve Jeffrey, S. W., (1994). “Essential Polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae)”, 35(1):155-161.

[136] Nichols, D. S., Nichols, P. D. ve Sullivan, C., (1993). ”Fatty acid, sterol and hydrocarbon composition of Antarctic sea ice diatom communities during the spring bloom in McMurdo Sound”, Antarctic Science, 5(3):271-278.

[137] Tsurkan, Y., ,Karpenyuk, T., Guschina, I., Orazova, S., Goncharova, A. ve Beisembaeva, R., (2015). “Identification of newly-isolated microorganisms containing valuable polyunsaturated fatty acids”, Journal of Biotech Research, 6:14-20.

[138] Ohse, S., Derner, R. B. Ozorio R. A., Corrêa, R. G., Furlong, E.B. ve Cunha, P. C., (2015). “Lipid content and fatty acid profiles in ten species of microalgae”, 33(1):93-101.

[139] Yi, Z., Xu, M., Di, X., Brynjolfsson, S. ve Fu, W., (2017). “ Exploring valuable lipids in diatoms”, Frontiers in Marine Science, 4(17):1-10.

[140] Qi-hua, W., Mei, L., Shu-hong, W., Ming-jin, D., Ya-juan, L. ve Ai-hua, C., (1998). “Studies on culture conditions of benthic diatoms for feding abalone II. Effects of salinity, Ph, nitrogenous and phosphate nutrients on growth rate”, Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 16(1):78-83

[141] Khan, S., Haque, M. M.,, Arakawa, O. ve Onoue, Y., (1998). “The influence of nitrogen and phosphorus on the growth of a diatom *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve”, Journal Profile: Bangladesh Journal of Fisheries Research, 2(1): 23-29.

[142] Yodsuwan, N., Sawayama, S. ve Sirisansaneeyakul, S., (2017). “Effect of nitrogen concentration on growth, lipid production and fatty acid profiles of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*, Agriculture and Natural Resources,(baskıda).

[143] Yang, M., Zhao, W. ve Xie, X., (2014). “Effects of nitrogen, phosphorus, iron and silicon on growth of five species of marine benthic diatoms”, Acta Ecologica Sinica, 34:311–319.

[144] Hemalatha, A., Karthikeyan, Kalyanasundram, P., Girija, K., Saranya, C., Anantharaman, P. ve Sampathkumar, P., (2014). “Effect of nutrients on the growth and biochemical composition of the marine diatom, *Chaetoceros Simplex* (Ostenfeld,1901)”, 5(1):30-35.

[145] Hillebrand, H. ve Sommer, U., (2000). “Effect of continuous nutrient enrichment on microalgae colonizing hard substrates”, Hydrobiologia, 426: 185–192.

[146] Ke, Z., Tan, Y., Ma, Y., Huang, L. ve Wang, S., (2014). “Effects of surface current patterns on spatial variations of phytoplankton community and environmental factors in Sunda shelf”, Continental Shelf Research, 82:119-127.

[147] Qi-hua, W., Ya-juan, L. ve Mei, L., (1999). “Studies on culture conditions of benthic diatoms for feding abalone III. Effects of iron and silicon nutrients and of orthogonal combinations of nitrogen, phosphorus, iron and silicon on growth rate”, Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 17(2):105-111.

[148] Jorgensen, E., (1952). “Effects of different silicon concentrations on the growth of diatoms”, Physiologia Plantahum, 5:161-170.

[149] Stevenson, R. J., Hill, B. H. ve Herlihy, A. T., (2008). “Algae–P relationships, thresholds, and frequency distributions guide nutrient criterion development”, Journal of the North American Benthological Society, 27(3):783–799.

[150] Katiyar, D., Lall A. M. ve Singh, B., (2010). “Effect of phosphate on growth of diatoms”, Indian Journal of Scientific Research, 1(2):103-106.

[151] Admiral W., (1977). “Tolerance of estuarine benthic diatoms ti high concentrations of ammonia, nitrite ion, nitrate ion and orthophosphate”, 43:307-315.

[152] Venkataraman G. S., (1969). “The cultivation of algae”, Indian Council of Agricultural Research, New Delhi.

[153] Ketchum, B. H., (1954). “Mineral nutrition of phytoplankton”, Annual Review Phytoplankton Physiology, 5:55-74.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Sait ÇİNAR

Doğum Tarihi ve Yeri : 08.05.1992 / Yusufeli

Yabancı Dili :İngilizce

E-posta :saitcinar16@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	**Alan**	**Okul/Üniversite**	**Mezuniyet Yılı**
Lisans	Biyomühendislik	Gaziosmanpaşa Üniversitesi	2014
Lise	Fen Bilimleri	Ahmet Hamdi Gökbayrak Anadolu Öğretmen Lisesi	2010

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	**Firma/Kurum**	**Görevi**
2016	Kromogen Biyoteknoloji	Ürün Sorumlusu

YAYINLARI

1. Çinar, S., Özçimen, D., Yılmaz, M., (2017). "Türkiye'de İzole Edilen Mikroalglerin Yağ Asidi Karakterizasyonu", VIII. Ulusal Kimya Öğrenci Kongresi, 16-18 Mayıs 2017, İstanbul.