

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

Leyla USLU

**BESLEYİCİ ELEMENT KOMPOZİSYONUNDAKİ DEĞİŞİKLİKLERİN
MİKROALGLERDE YAĞ İÇERİĞİNE ETKİSİ**

SU ÜRÜNLERİ TEMEL BİLİMLER ANABİLİM DALI

ADANA, 2011

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BESLEYİCİ ELEMENT KOMPOZİSYONUNDAKİ DEĞİŞİKLİKLERİN
MİKROALGLERDE YAĞ İÇERİĞİNE ETKİSİ**

Leyla USLU

DOKTORA TEZİ

SU ÜRÜNLERİ TEMEL BİLİMLER ANABİLİM DALI

Bu tez / /2011 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Oya IŞIK
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. Dursun AVŞAR
ÜYE

.....
Prof.Dr. Şevket GÖKPINAR
ÜYE

.....
Doç. Dr. Yaşar DURMAZ
ÜYE

.....
Yrd. Doç. Dr. Hilal KARGIN YILMAZ
ÜYE

Bu tez Enstitümüz Su Ürünleri Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. İlhami YEĞİNGİL
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: SÜF2006.D2

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

DOKTORA TEZİ

**BESLEYİCİ ELEMENT KOMPOZİSYONUNDAKİ DEĞİŞİKLİKLERİN
MİKROALGLERDE YAĞ İÇERİĞİNE ETKİSİ**

Leyla USLU

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ TEMEL BİLİMLER ANABİLİM DALI**

Danışman :Prof. Dr. Oya IŞIK
Yıl: 2011, Sayfa: 77
Jüri :Prof. Dr. Oya IŞIK
:Prof. Dr. Dursun AVŞAR
:Prof. Dr. Şevket GÖKPINAR
:Doç. Dr. Yaşar DURMAZ
:Yrd. Doç. Dr. Hilal KARGIN YILMAZ

Bu çalışmada *Isochrysis affinis galbana* (Prymnesiophyceae), *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) ve *Porphyridium cruentum* (Rhodellophyceae) türlerinde azot sınırlamasının büyüme, lipid ve klorofil *a* içerikleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmada azot sınırlamasının *I. affinis galbana* ve *P. tricornutum*'da lipid içeriğinin yükselmesine sebep olduğu saptanmış, %50 azot eksiltmesi yapılan çalışmada *I. affinis galbana*'da %30.91 lipid ve $0.755 \pm 0.03 \text{ g l}^{-1}$ biyomas, *P. tricornutum*'da %30.18 lipid ve $0.978 \pm 0.02 \text{ g l}^{-1}$ biyomas belirlenmiştir. Azotun tamamen çekildiği (%100 N(-)) çalışmada, *P. cruentum*'da lipid oranı (%11.23), diğer iki türe göre daha düşük bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Isochrysis affinis galbana*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Porphyridium cruentum*, lipid, N sınırlaması

ABSTRACT

PhD THESIS

THE EFFECTS OF THE CHANGES IN THE COMPOSITION OF NUTRIENT ON LIPID CONTENT OF MICROALGAE

Leyla USLU

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
BASIC SCIENCE DEPARTMENT OF FISHERIES

Supervisor :Prof. Dr. Oya IŞIK

Year: 2011, Pages: 77

Jury :Prof. Dr. Oya IŞIK

:Prof.Dr. Dursun AVŞAR

:Prof. Dr. Şevket GÖKPINAR

:Assoc. Prof. Dr. Yaşar DURMAZ

:Assist. Prof. Dr. Hilal KARGIN YILMAZ

In this study, the effects of nitrogen limitation on the growth rates, lipid and chlorophyll *a* contents of the species of *Isochrysis affinis galbana* (Prymnesiophyceae), *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) and *Porphyridium cruentum* (Rhodellophyceae) were examined. It was observed that nitrogen limitation increased the lipid content of *I. affinis galbana* and *P. tricornutum*. In the study subjected to 50% of nitrogen reduction, 30.91% lipid and $0.755 \pm 0.03 \text{ g l}^{-1}$ dry matter were detected in *I. affinis galbana*, and 30.18% lipid and $0.978 \pm 0.02 \text{ g l}^{-1}$ dry matter in the *P. tricornutum*. The study in which the nitrogen starvation (100% of nitrogen reduction) applied to *P. cruentum*, the lipid content(11.23%) was lower than the other two species.

Key Words: *Isochrysis affinis galbana*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Porphyridium cruentum*, lipid, N starvation

TEŞEKKÜR

Öncelikle doktora öğrenimim süresince bana ilgisini ve desteğini hiç esirgemeyen, büyük bir sabır ve titizlikle bilgi ve tecrübelerini aktararak gelişmemi sağlayan, inandığım ve güvendiğim değerli danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Oya IŞIK'a, çalışmalarımızda bize her türlü destek olan ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof.Dr. Şevket GÖKPINAR ve Doç. Dr. Yaşar DURMAZ'a, tez çalışmam esnasında ilgisini ve yardımlarını gördüğüm değerli Su Ürünleri Yüksek Mühendisi Yasemin MUTLU, Su Ürünleri Mühendisleri Burcu AK, Cansev AZGIN ve Ahmet Mahmut AKSOY'a, yaratıcı düşüncelerini paylaştıran ve manevi desteğini ilgisini gördüğüm değerli meslektaşım Ar. Gör. Barış DERİCİ'ye, analizlerim sırasında laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan Bahçe Bitkileri Bölümü hocalarımızdan Prof.Dr.Yıldız AKAKAÇAR'a, Doç.Dr.Yeşim YALÇIN MENDİ, tez çalışmamı maddi yönden destekleyen Araştırma Projeleri Birimine, tez çalışmamın başından itibaren bize her zaman yürekten inanan ve çalışmalarımızda gerek maddi gerekse manevi desteğini esirgemeyen SERPORT Firması yöneticisi rahmetli Serdar GİRİŞKEN ve değerli ekibine teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, tez çalışmam esnasında benimle birlikte olup cesaret veren, bana inanıp maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, asla beni yalnız bırakmayan hayatımdaki en değerli varlığım aileme ve biricik kızım TUNA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	7
3. MATERYAL VE METOD.....	19
3.1. Materyal.....	19
3.1.1. Kültüre Alınan Fitoplankton Türleri.....	19
3.1.2. Kültür Ortamı.....	24
3.1.3. Deneme Koşulları.....	25
3.2. Metod.....	25
3.2.1. Modifiye F/2 Kültür Ortamının Hazırlanması.....	25
3.2.2. Denemenin Kurulması ve Yürütülmesi.....	26
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	31
4.1. Bulgular.....	31
4.1.1. <i>Isochrysis affinis galbana</i>	31
4.1.1.1. <i>I. affinis galbana</i> Kontrol Grubu Büyüme Değerleri ve Lipid İçeriği.....	31
4.1.1.2. <i>I. affinis galbana</i> 'nın %50 N Eksiltelen Kültüründe Büyüme Değerleri ve Lipid İçeriği.....	34
4.1.1.3. <i>I. affinis galbana</i> 'nın %100 N Eksiltelen Kültüründe Büyüme Değerleri ve Lipid İçeriği.....	37
4.1.2. <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	40
4.1.2.1. <i>P. tricornutum</i> Kontrol Grubu Büyüme Değerleri ve Lipid İçeriği.....	40

4.1.2.2. <i>P. tricornutum</i> 'un %50 N Eksiltelen	
Kültüründe Büyüme Değerleri ve Lipid İçeri	43
4.1.2.3. <i>P. tricornutum</i> 'un %100 N Eksiltelen	
Kültüründe Büyüme Değerleri ve Lipid İçeriği	46
4.1.3. <i>Porphyridium cruentum</i>	49
4.1.3.1. <i>P. cruentum</i> Kontrol Grubu Büyüme	
Değerleri ve Lipid İçeriği	49
4.1.3.2. <i>P. cruentum</i> 'un %50 N Eksiltelen	
Kültüründe Büyüme Değerleri ve Lipid İçeri	52
4.1.3.3. <i>P. cruentum</i> 'un %100 N Eksiltelen	
Kültüründe Büyüme Değerleri ve Lipid İçeriği	54
4.1.4. <i>I. affinis galbana</i> , <i>P. tricornutum</i> ve <i>P. cruentum</i>	
Türlerinde Biyomas ve Lipid içeriklerinin Karşılaştırılması	57
4.2. Tartışma	60
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	65
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	77

ÇİZELGELER DİZİNİ	SAYFA
Çizelge 3.1. F/2 Kültür Ortamı	24
Çizelge 3.2. F/2 Metal Solüsyonu	24
Çizelge 3.3. F/2 Vitamin Solüsyonu.....	25
Çizelge 4.1. <i>I. affinis galbana</i> Kültürlerinde Büyüme Değerleri ve Lipid İçeriklerinin Karşılaştırılması... ..	40
Çizelge 4.2. <i>P. tricornutum</i> Kültürlerinde Büyüme Değerleri ve Lipid İçeriklerinin Karşılaştırılması... ..	49
Çizelge 4.3. <i>P. cruentum</i> Kültürlerinde Büyüme Değerleri ve Lipid İçeriklerinin Karşılaştırılması... ..	57
Çizelge 4.4. Uygulanan Muamelelerde Türlere Ait Biyomas Miktarlarının Duncan Test Sonuçları.....	60
Çizelge 4.5. Uygulanan Muamelelerde Türlere Ait Lipid Miktarlarının Duncan Test Sonuçları.....	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 3.1. Denemede Kullanılan <i>Isochrysis affinis galbana</i>	20
Şekil 3.2. Denemede Kullanılan <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	22
Şekil 3.3. Denemede Kullanılan <i>Porphyridium cruentum</i>	23
Şekil 3.4. Türlerle Ait Deneme Düzenegi.....	27
Şekil 3.5. Türlerle Ait Lipid Analizi.....	30
Şekil 4.1. Kontrol Grubu <i>I. affinis galbana</i> Optik Yoğunluk Değişimi.	32
Şekil 4.2. Kontrol Grubu <i>I. affinis galbana</i> Biyomas Miktarı Değişimi.	32
Şekil 4.3. Kontrol Grubu <i>I. affinis galbana</i> Klorofil <i>a</i> Değerleri Değişimi.....	33
Şekil 4.4. Kontrol Grubu <i>I. affinis galbana</i> Hacimsel Biyomas Çıkış Oranları Değişimi.	34
Şekil 4.5. %50 N Eksik Ortamda <i>I. affinis galbana</i> Optik Yoğunluk Değişimi.	35
Şekil 4.6. %50 N Eksik Ortamda <i>I. affinis galbana</i> Biyomas Miktarı Değişimi	35
Şekil 4.7. %50 N Eksik Ortamda <i>I. affinis galbana</i> Klorofil <i>a</i> Değerleri Değişimi.....	36
Şekil 4.8. %50 N Eksik Ortamda <i>I. affinis galbana</i> Hacimsel Biyomas Çıkış Oranları Değişimi.....	36
Şekil 4.9. %100 N Eksik Ortamda <i>I. affinis galbana</i> Optik Yoğunluk Değişimi.	37
Şekil 4.10. %100 N Eksik Ortamda <i>I. affinis galbana</i> Biyomas Miktarı Değişimi.	38
Şekil 4.11. %100 N Eksik Ortamda <i>I. affinis galbana</i> Klorofil <i>a</i> Değerleri Değişimi.	38
Şekil 4.12. %100 N Eksik Ortamda <i>I. affinis galbana</i> Hacimsel Biyomas Çıkış Oranları Değişimi.....	39

Şekil 4.13. Kontrol Grubu <i>P. tricornutum</i> Optik Yoğunluk	
Değişimi.....	41
Şekil 4.14. Kontrol Grubu <i>P. tricornutum</i> Biyomas	
Miktarı Değişimi.	41
Şekil 4.15. Kontrol Grubu <i>P. tricornutum</i> Klorofil <i>a</i>	
Değerleri Değişimi.	42
Şekil 4.16. Kontrol Grubu <i>P. tricornutum</i> Hacimsel Biyomas	
Çıkış Oranları Değişimi.....	43
Şekil 4.17. %50 N Eksik Ortamda <i>P. tricornutum</i> Optik Yoğunluk	
Değişimi.....	44
Şekil 4.18. %50 N Eksik Ortamda <i>P. tricornutum</i> Biyomas	
Miktarı Değişimi.	44
Şekil 4.19. %50 N Eksik Ortamda <i>P. tricornutum</i> Klorofil <i>a</i>	
Değerleri Değişimi.	45
Şekil 4.20. %50 N Eksik Ortamda <i>P. tricornutum</i> Hacimsel	
Biyomas Çıkış Oranları Değişimi.	46
Şekil 4.21. %100 N Eksik Ortamda <i>P. tricornutum</i> Optik Yoğunluk	
Değişimi.....	47
Şekil 4.22. %100 N Eksik Ortamda <i>P. tricornutum</i>	
Biyomas Miktarı Değişimi.....	47
Şekil 4.23. %100 N Eksik Ortamda <i>P. tricornutum</i> Klorofil <i>a</i>	
Değerleri Değişimi.	48
Şekil 4.24. %100 N Eksik Ortamda <i>P. tricornutum</i> Hacimsel	
Biyomas Çıkış Oranları Değişimi.	48
Şekil 4.25. Kontrol Grubu <i>P. cruentum</i> Optik Yoğunluk	
Değişimi.....	50
Şekil 4.26. Kontrol Grubu <i>P. cruentum</i> Biyomas Miktarı Değişimi.....	50
Şekil 4.27. Kontrol Grubu <i>P. cruentum</i> Klorofil <i>a</i> Değerleri Değişimi.	51
Şekil 4.28. Kontrol Grubu <i>P. cruentum</i> Hacimsel Biyomas	
Çıkış Oranları Değişimi.....	51
Şekil 4.29. %50 N Eksik Ortamda <i>P. cruentum</i> Optik Yoğunluk	
Değişimi.....	52

Şekil 4.30. %50 N Eksik Ortamda <i>P. cruentum</i> Biyomas Miktarı Değişimi.	53
Şekil 4.31. %50 N Eksik Ortamda <i>P. cruentum</i> Klorofil <i>a</i> Değerleri Değişimi.	53
Şekil 4.32. %50 N Eksik Ortamda <i>P. cruentum</i> Hacimsel Biyomas Çıkış Oranları Değişimi.	54
Şekil 4.33. %100 N Eksik Ortamda <i>P. cruentum</i> Optik Yoğunluk Değişimi.	55
Şekil 4.34. %100 N Eksik Ortamda <i>P. cruentum</i> Biyomas Miktarı Değişimi.	55
Şekil 4.35. %100 N Eksik Ortamda <i>P. cruentum</i> Klorofil <i>a</i> Değerleri Değişimi.	56
Şekil 4.36. %100 N Eksik Ortamda <i>P. cruentum</i> Hacimsel Biyomas Çıkış Oranları Değişimi.	56
Şekil 4.37. <i>I. affinis galbana</i> 'ya Ait Lipid ve Biyomas Miktarları.	58
Şekil 4.38. <i>P. tricornutum</i> 'a Ait Lipid ve Biyomas Miktarları.	58
Şekil 4.39. <i>P. cruentum</i> 'a Ait Lipid ve Biyomas Miktarları.	59

SİMGELER VE KISALTMALAR

ARA	: Arachidonic asit
C	: Karbon
DHA	: Docosaheenoic asit
EPA	: Eicosapentaenoic asit
MUFA	: Tekli doymamış yağ asitleri
N	: Azot
NH ₃	: Nitrat
NH ₄	: Amonyum
NO ₂	: Nitrit
(NH ₂) ₂ CO	: Üre
PUFA	: Uzun zincirli doymamış yağ asitleri
SCP	: Tek hücre proteini
SFA	: Doymuş yağ asitleri
Si	: Silisyum
TAG	: Triaçilgliserol

1.GİRİŞ

Son yıllarda mikroalgal biyoteknolojiye giderek artan ilgi, bazı mikroalg türlerinin hücre içinde yüksek miktarda biriktirmiş olduğu metabolitlerden kaynaklanmaktadır.

Algler çok uzun yıllardan beri farklı alanlarda kullanılmakta olup; hücrelerinde biriktirdikleri protein, vitamin, yağ asitleri, karbohidrat, mineral ve pigment, hidrokarbon, polisakkarit, antibiyotik ve daha birçok metabolitleri nedeniyle insanlar tarafından başlıca besin desteği olmak üzere değişik amaçlarla kullanılmaktadırlar. Bu nedenle II. Dünya savaşından buyana Amerika Birleşik Devletleri, Japonya, İngiltere, Almanya ve Norveç gibi gelişmiş ülkelerde mikroalglerin besinsel zenginliklerinden yararlanılmaktadır (Becker, 1994).

1970'li yıllarda değişik enerji kaynakları arayışı ile birlikte güneş enerjisi dünyanın ilgisini üzerinde toplamıştır. Algler, güneş enerjisini en etkin kullanan canlılardır ve bu nedenle de farklı mikroalg türlerinde yeni bileşenlerin keşfedilmesi amacıyla mikroalg üretim teknolojisine ilgi giderek artmaktadır.

Temel fitoplankton gruplarından alınan örnek türlerin kültürleri yapılarak, büyümeleri üzerine farklı fiziksel ve kimyasal faktörlerin etkilerinin saptanması, bu grupların doğal popülasyonlarının büyümeleri için gerekli olan sıcaklık, CO₂ düzeyi, besin kaynağının kalitesi ve düzeyi, ışığın yoğunluk ve süresi gibi kritik faktörlerin saptanması açısından da önemlidir (Cirik ve Gökpinar, 1999).

Mikroalgler deniz balıkları yetiştiriciliği ve kabukluların üretiminde larva beslemede canlı yem olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar ile mikroalglerin protein, lipid, polisakkarit, pigment, karotenoid, vitamin, sterol, enzim, antibiyotik ve daha pek çok kimyasal maddeler açısından zengin oldukları belirlenmiş ve biyokimyasal içeriklerinden yararlanma amacıyla son 20 yıldır büyük miktarlarda alg kültürleri yapılmaya başlanmıştır (Becker, 1994).

Mikroalglerin büyük ölçekli yığın kültürlerinden elde edilen biyomas ile bundan elde edilen protein, lipid, nişasta, gliserol, doğal pigment ve biyopolimer gibi metabolitlere olan ticari ilgi giderek artmaktadır. Birçok bilim adamı, mikroalgleri, uzun zincirli doymamış yağ asitleri kaynağı (PUFA), vitamin E, pigmentler ve

steroller, protein ve aminoasit gibi diğer metabolitlerin kaynağı olduğunu kabul etmişlerdir (Bandara ve ark., 2003).

Gerek doğal ortamda yaşamlarını sürdüren, gerekse laboratuvar koşullarında kültürleri yapılan denizel ve tatlı su alglerinin ekonomideki önemi büyüktür. Bu önem alglerin çeşitli alanlarda kullanılmasından ileri gelmektedir. Besin kaynağı olarak değerlendirilmelerinin yanı sıra, atık su arıtımı ve tarım alanında da kullanılmaktadır. Diğer taraftan canlı kütleden metan gazı, antibiyotik, karragen, agar gibi bazı kimyasal maddelerin üretiminde de yararlanılabilmektedir (Goldman, 1979).

Akuakültür çalışmalarında ve tek hücre proteini (SCP) elde etme amacına yönelik tüm alg kültür çalışmalarında temel amaç, fotosentez işleminde inorganik maddenin organik maddeye dönüşümündeki verimliliği en yüksek seviyeye ulaştırmak ve organik maddeyi yani canlı kütleyi en verimli şekilde üretmektir.

Algal biyoteknolojideki gelişmelere rağmen mikroalg türlerinin kültürlerinde çeşitli güçlüklerle karşılaşmaktadır. Mikroalg kültürlerinde canlı kütlenin biyokimyasal kompozisyonu, çevresel faktörler, besi ortamı, sıcaklık, tuzluluk, pH ve ışık gibi büyüme koşullarına bağlıdır (Sukenic, 1991).

Mikroalgler organik madde sentezini gerçekleştirmek için Karbon (C), Azot (N) ve Fosfor (P) gibi temel elementlere gereksinim duyarlar (Davis, 1977). Azot C'dan sonra canlı kütle üretimi için en önemli besin maddesidir. Azot alg türlerine bağlı olarak kuru ağırlığın %1 ile %10'unu oluşturur. Azotun bazı formları mikroalg kültürleri için uygundur. Kültürlerde hücreler tarafından kullanılabilen en önemli inorganik N kaynakları NO_3^- azotu (NO_3^- -N), NH_4^+ azotu (NH_4^+ -N) ve üre azotu ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ -N)'dur (Gökpınar, 1991). Fitoplankton büyümesini sınırlayan en önemli besleyici elementlerin özellikle doğada baskın halde bulunan NH_4^+ ve NO_3^- gibi inorganik N kaynakları olduğu saptanmıştır (Gökpınar, 1991; Gökpınar, 1994). Tüm N kaynakları hücrenin yapıtaşları olan aminoasitlerin ve dolayısıyla proteinlerin yapısına girmesinden dolayı yaşamsal değere sahiptir. Ayrıca N'un yağ asitleri üzerinde çok büyük etkisi olduğu bilinmektedir. Azot, enzim ve proteinlerin yapıtaşı olduğu için, yağ asitleri sentezi, algal hücrelerin protein fonksiyonları ve yapılaşmasında gereklidir. Azot kaynakları ve konsantrasyonları, alg kültürlerinde

büyüme ve biyokimyasal kompozisyonu etkilemekte ve özellikle yağ asitleri değerlerinde ve karotenoyit miktarında değişikliklere neden olmaktadır. Azot atomu karbohidratlar ve yağlar üzerinde etkilidir. Bunun yanı sıra N sınırlaması hücrel yağ asitleri ve hücrel büyüme ile ilişkili olduğundan, yağ asitleri bakımından zenginleştirmede N sınırlaması etkilidir. Mikroalg kültürlerinde N sınırlaması, biyomas ve klorofil *a* miktarlarında azalmaya neden olurken, mikroalglerin biyokimyasal yapısındaki yağlar gibi organik karbon bileşiklerinde artışa neden olmaktadır. Bu durumda mikroalglerin klorofil *a* oranı azalırken, karotenoyitlerde artış olmaktadır (Shifrin ve Chisholm, 1981; Sukenik ve ark., 1989).

Son yıllarda, tek hücreli alglerden elde edilen yağ ve yağ asidi ürünleri oldukça dikkat çekmiştir. İlk olarak Solar Enerji Araştırma Enstitüsü biyoyakıt olarak algal yağların kullanımını üzerinde durmuştur (Neenan ve ark., 1986).

Enerji kaynağı olarak yenilenebilir, toksik olmayan, biyodizel yakıt kaynağı mikroalglerden yararlanma olanakları konusunda çalışmalar sürdürülmektedir. Bu amaçla yağ içeriği ve büyüme hızı yüksek mikroalg türlerinin belirlenmesi çalışmalarının yanında, hücre içinde mevcut yağ içeriğinin arttırılmasını uyaran stres koşullarının belirlenmesi araştırmaları pek çok ülkede sürdürülmektedir.

Mikroalgler kara bitkileri ile güneş ışığı ve karbondioksiti kullanarak organik madde üretmeleri bakımından benzerlik gösterirken, saatler içerisinde bölünerek çoğalmaları ve yıl boyunca üretilbilmeleri sebebiyle kara bitkilerinden daha fazla ürün verimliliğine sahip organizmalardır (Siaut ve ark., 2007). Bu fotosentetik canlılar fotosentez sonucu ortama oksijen vermektedirler ve olumsuz çevre koşullarına (yüksek ışık, yüksek sıcaklık gibi) karşı tepki olarak metabolizmalarında değişiklikler yapabilmektedirler. Chlorophyceae sınıfına ait *Chlorella* ve *Neochloris* türlerinin N eksikliği olan ortamda kültüre alınmaları durumunda kuru hücre ağırlıklarında yağ oranlarını %60'a çıkardıkları belirlenmiştir (Siaut ve ark., 2007).

Mikroalgal kütleden yağ eldesi konusunda dünyanın pek çok ülkesinde çalışmalar gizlilik içerisinde sürdürülmektedir. Yağ içeriği yüksek tür arayışının yanında mevcut türler içerisinde yağ içeriğini yükseltme olanakları da araştırılmaktadır. Mikroalg üretiminin ve hasadının nispeten maliyetli olmasına rağmen, kara bitkilerine göre avantajlarının olması ve suyu en verimli kullanan

sistemler olmaları, araştırıcıların konuya ilgisini artırmaktadır. Büyük hacimlerde mikroalgal üretim, verimsiz arazilerde gerçekleştirilebilmektedir. Enerji kaynağı depo ürünleri, hücre çeperi bileşenleri gibi fonksiyonel lipidler ve yağ asitleri tüm bitki hücrelerinin bileşenleridir. Alglerde lipid sentezi yüksek bitkilerdeki lipid sentezi ile benzerdir (Sawayama ve ark., 1995).

Lipidler (Yağlar) hayvansal ve bitkisel dokularda yer alan, yapılarında hidrojen, karbon, oksijen, azot, fosfor ve kükürt elementleri ile primer ve sekonder alkol grupları, serbest ya da esterleşmiş karboksil grupları, amid, fosfat esterleri ve amin grupları bulunan organik maddelerdir. Lipidler, hücre yapısında ve dokularda bulunabildikleri gibi, bunların enerji gereksiniminin karşılanmasında da rol oynarlar. Yağların oksidasyonunda protein ve karbohidrat gibi diğer organik maddelere göre daha fazla oksijen harcanması gerekmekte ve böylece daha yüksek bir enerji açığa çıkmaktadır. Bu nedenle yağlar hayvansal organizmalar için önemli bir enerji kaynağı, bitkisel organizmalar için ise depo maddesi olarak görev yapmaktadır. Ayrıca yağda eriyebilen A, D, E ve K vitaminleri ve doğal ya da sentetik pigmentleri kapsayan diğer besin maddelerinin emilimi için taşıyıcı olarak görev yapmaktadırlar (Bilgüven, 2002).

Besinsel ve çevresel faktörler, lipid içeriği kadar yağ asitlerinin birbirlerine göre oranlarını da etkileyebilmektedir. Azot sınırlaması ile büyüyen birçok mikroalg türünde artan lipid içeriği gözlenmiştir. 1940'lı yılların sonlarında N açlığının yağ deposu üzerinde etkili olduğu saptanmış ve kuru ağrılıkta %70-85 yağ düzeyi rapor edilmiştir. *Dunaliella* sp. ve *Tetraselmis suecica* gibi bazı alg türleri ise düşük lipid içermekte ve genellikle lipidden çok karbohidratları üretmektedirler. Azotun dışında diğer bazı besin eksiklikleri de lipid içeriğinde artışa neden olabilmektedir. Örneğin diyatomlarda lipid miktarı silikon açlığı sırasında artabilir. Farklı N rejimlerinin *Scenedesmus obligus*, *Chlorella vulgaris*, *Anacystis nidulans*, *Microcystis aeruginosa*, *Oscillatoria rubescens* ve *Spirulina platensis* gibi bazı alg türlerinin lipid içeriği ve büyümesi üzerine etkileri çalışılmıştır. Bu çalışmalarda, düşük N seviyelerinde Chlorophyceae'nin yüksek düzeyde lipid (biyomasnin %45'i) içerdiği ve bunun %70'inin triaçilgliseroller (TAG) gibi (başlıca 16:0 ve 18:1 yağ asitlerini içeren) nötral yağlardan oluştuğu belirlenmiştir. Yüksek N seviyelerinde lipid

yüzdesinin %20 civarına düştüğü ve bunun da doymamış C16 ve C18 yağ asitlerini içeren polar yağlardan oluştuğu belirlenmiştir. Büyümenin ilk aşamalarında algler, polar yağları ve doymamış yağ asitlerini fazla miktarlarda üretmektedirler (Piorreck ve Pohl, 1984).

Azot açlığında *Porphyridium cruentum*'un lipid içeriğini 2 katına çıkardığı rapor edilmiştir. Azot sınırlamasından başka alglerde lipid üretimine etki eden diğer faktörler de tanımlanmıştır. Örneğin artan ışık şiddetinin *Chlorella*'da tek ve digalaktosidigliseridler kadar doymamış C16 ve C18 yağ asitlerinin oluşumunu arttırdığı bilinmektedir. Yağ asidi kompozisyonu üzerine değişen CO₂ miktarının etkisi *Chlorella fusca* için tanımlanmıştır. Havadaki %1 CO₂ ile muamele edilen ve ototrofik olarak büyüyen hücrelerde 16:0, 16:3, 16:4, 18:2 ve 18:3 karbonlu yağ asitleri gözlenmiştir. Glukoz eklenen kültürlerde 16:4 karbonlu yağ asidi kaybolurken; 18:3 karbonlu yağ asidi azalmış ve diğerleri artmıştır (Piorreck ve Pohl, 1984).

Azot kaynağı ve düzeylerinin, algal kültürlerde büyüme ve biyokimyasal kompozisyonu etkileyen en önemli faktörlerden biri olduğu bilinmektedir (Xu ve ark., 2001). Bu çalışma, Prymnesiophyceae sınıfına ait *Isochrysis affinis galbana*, Bacillariophyceae sınıfına ait *Phaeodactylum tricornutum* ve Rhodellophyceae sınıfına ait *Porphyridium cruentum* türlerinde N sınırlamasının büyüme, lipid ve klorofil *a* üzerine etkisini belirlemek ve mikroalglerden yenilenebilir, toksik olmayan biyoyakıt eldesine kaynak oluşturmak amacıyla yürütülmüştür.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Mikroalgler denizel ve tatlı su ortamında bulunan ve besin piramidinin temelini oluşturan canlı organizmalardır. Gerek doğal ortamda yaşamlarını sürdüren, gerekse laboratuvar koşullarında kültürleri yapılan denizel ve tatlı su alglerinin ekonomideki önemi büyüktür. Bu önem alglerin çeşitli alanlarda kullanılmasından ileri gelmektedir. Mikroalglerin protein, lipid, polisakkarit, pigment, karotenoid, vitamin, sterol, enzim, antibiyotik ve daha pek çok kimyasal maddeler açısından zengin oldukları belirlenmiş ve biyokimyasal içeriklerinden yararlanma amacıyla, son yıllarda büyük miktarlarda alg kültürleri yapılmaya başlanmıştır. Kültür ortamında bazı fiziksel ve kimyasal faktörlerin değiştirilmesiyle, mikroalglerde varolan önemli metabolitlerin hücre içinde artışı ya da azalması sözkonusudur.

Yapılan bu çalışmada da *Isochrysis affinis galbana*, *Phaeodactylum tricornutum* ve *Porphyridium cruentum* türlerinde N sınırlamasının büyüme, lipid ve klorofil *a* üzerine etkisini belirlemek amacıyla yürütülmüştür. Mikroalg türlerinin yağ içeriğini artırmaya yönelik yürütülmüş çalışmaların bazıları özetlenmeye çalışılmıştır.

Richardson ve ark. (1969), yaptıkları çalışmada, N eksiltmesinin algin yapısı ve büyümesi üzerindeki etkisini ortaya çıkarmışlardır. Azot eksikliği sonucunda hücre içeriği kalori değerleri, klorofil yapısı ve lipid içeriği incelenmiş, *Chlorella* sp'de %3 oranında N eksiltmesiyle 6'ncı günde maksimum yağ asidi eldesinin mümkün olduğu belirlenmiştir.

Tornabene ve ark. (1983), yaptıkları bir çalışmada, tatlı su algi *Neochloris oleoabundans* türünü farklı oranlarda N eksikliği bulunan ortamlarda kültüre almış ve lipid oranının değişimine bakmışlardır. Azot eksikliği uygulanan gruplarda lipid oranının kuru ağırlıkta %35-54 arasında arttığını belirlemişlerdir.

Ben-Amotz ve ark. (1984), yaptıkları bir çalışmada, kontrollü koşullar altında büyütülen tek hücreli ökaryotik yedi mikroalg türünün lipid profili, yağ üretimi, hidrokarbonlar ve yağ asitlerini araştırmışlardır. Yeşil hücreli yavaş büyüme gösteren *Botryococcus braunii*, N eksikliğinde en yüksek miktarda lipid içermiştir (%45). *Ankistrodesmus* sp., *Dunaliella* spp. *Isochrysis* sp. *Nannochloris*

sp. ve *Nitzschia* sp. yeterli N koşulları altında ortalama %25 lipid içermiştir. Azot eksikliği, bütün türlerde lipid içeriğinde önemli artışa neden olmuştur.

Thomas ve ark. (1984), *P. tricornutum* türünü yeterli düzeyde N bulunan bir ortamda ve N eksikliğinin yapıldığı bir ortamda kültüre almış ve protein, karbohidrat, lipid, kül ve biyomas miktarlarını saptamışlardır. Protein oranı %55'den %25'e, karbohidrat %10'dan %15'e, lipid %20'den %30'a, kül %12'den %16'ya değişim göstermiştir. Lipid oranının %30'a çıkmasının biyomas miktarının azalmasından dolayı önemli bulunmadığını bildirmişlerdir.

Siron ve ark. (1989), *P. tricornutum* ve *D. tertiolecta* türlerini P sınırlamasının yapıldığı ortamda kültüre almış ve büyüme fazlarındaki yağ asidi değişimlerini incelemişlerdir. *P. tricornutum*'da kültürün yaşlanmasıyla yani büyüme periyodunun sonunda palmitik ve palmitoleik asitlerin arttığını ancak EPA (Eicosapentaenoic asit)'in ise zarar gördüğünü belirlemişlerdir. Aynı zamanda fosfor sınırlamasının *P. tricornutum* ve *D. tertiolecta* hücrelerinde yağ asitleri düzeylerini önemli miktarda artırdığı gözlenmiştir.

Harrison ve ark. (1990), gerçekleştirdikleri çalışmalarında, 3 deniz türünü (*I. galbana*, *Chaetoceros calcitrans* ve *Thalassiosira pseudonana*) 4 farklı ortam koşullarında (N, P, Si eksikliği ve ışık sınırlaması) kültüre almışlar ve biyokimyasal kompozisyonunu incelemişlerdir. Azot eksiltmesi yapılan 3 kültürde 2'inci günde lipid oranında bir değişim olmazken, karbohidrat oranında artış, protein oranında azalışlar gözlenmiştir. Silisyum eksiltmesi yapılan kültürlerde de 6'ncı saatin sonunda lipid, protein ve karbohidrat oranında bir değişim olmamıştır. Ancak P sınırlamasının yapıldığı kültürlerden *T. pseudonana*'da 20:5ω3 ve 22:6ω3 yağ asitlerinde önemli düzeyde azalmalar tespit edilmiştir. 20:5ω3 yağ asidi *I. galbana* türünde diğer 2 türe göre önemli düzeyde az bulunmuştur. Işık sınırlamasının yapıldığı 3 türde ise lipid oranında bir tutarlık gözlenmediği belirlenmiştir.

Tsuzuki ve ark. (1990), yaptıkları çalışmalarında, *C. vulgaris*'e uygulanan farklı CO₂ düzeylerinin yağ asitleri içeriğine olan etkilerini araştırmışlardır. Buna göre; CO₂ miktarı artışının yağ asitleri oranını arttırdığı ve linoleik asit ile α-linoleik oranının önemli derecede değiştiği saptanmıştır.

Sukenik ve Wahnon (1991), *I. affinis galbana*'da farklı çevresel koşulların lipid miktarına etkisini belirlemek amacıyla yüksek ışık ve N sınırlaması uygulamaları yapmışlardır. Yüksek ışık şiddeti altında karbohidrat birikiminin olduğu ve lipid miktarında düşük bir oranda azalma meydana geldiği; N sınırlamasında ise hem karbohidrat hem de lipid oranında artış olduğu belirlenmiştir.

Yongmanitchai ve Ward (1991), farklı N kaynaklarının ($\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$ ve Üre-N) *P. tricornutum*'un yağ asitleri kompozisyonu üzerine etkisini araştırmışlardır. EPA bakımından zengin bir tür olan *P. tricornutum* için $\text{NO}_3\text{-N}$ ve Üre-N ile hazırlanan besin ortamlarında en yüksek değerleri sırasıyla %24.6 ve %37.8 olarak elde edildiğini rapor etmişlerdir.

Thompson ve ark. (1992), sıcaklığın 8 farklı deniz türünün yağ asitleri üzerine etkisini çalışmışlar ve türleri 10°C , 15°C ve 25°C 'de kültüre almışlardır. Sıcaklık düzeylerinin yağ asitleri miktarları üzerine etkisinin çok büyük farklılıklar gösterdiğini belirtmişlerdir. Yağ asitlerinin yaklaşık %4'lük kısmını oluşturan 14:0 (Miristik asit) yağ asiti 25°C 'ye göre 10°C 'de %20 oranı ile *C. simplex* ve *I. galbana*'da en yüksek bulunurken, *P. tricornutum*'da azalış göstermiştir. *T. pseudonana* hariç bütün türlerde PUFA düzeyi 10°C 'de daha yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak bu araştırmacılar sıcaklık ile PUFA arasında ters bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir.

Brown ve ark. (1993a), *Isochrysis* sp., *P. lutheri* ve *N. oculata*'yı kesikli ve yarı sürekli kültür sistemiyle kültüre almışlar ve büyümenin farklı fazlarında hasat ederek lipid, protein ve karbohidrat seviyelerini belirlemişlerdir. Kesikli sistemde logaritmik evrede tüm türlerin protein oranı yüksek (%25.2-41.1), karbohidrat (%7.1-10.3) ve lipid (%8.8-14.9) oranı düşük bulunurken; dinlenme fazında *Isochrysis* sp. ve *N. oculata*'da protein (sırasıyla %21.8 ve %20.3) önemli miktarda düşmüş, *P. lutheri*'de lipid (%16.6) oranı artmış ve tüm türlerde karbohidrat miktarında artış olmuştur. Yarı sürekli kültürde ise logaritmik artış fazına göre logaritmik fazın sonunda tüm kültürlerde karbohidrat oranı artış gösterirken, *Isochrysis*'de protein oranı düşmüş ve *P.lutheri*'de ise lipid oranı artış göstermiştir.

Brown ve ark. (1993b), denizel mikroalg *Isochrysis* sp. türüne 12:12 aydınlık periyodu uygulayarak $50\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 'dan $1000\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 'ya kadar 5 farklı ışık yoğunluğunda kültüre almışlar ve logaritmik fazın sonunda hasat ederek biyokimyasal kompozisyonunu incelemişlerdir. *Isochrysis* sp. biyokimyasal yapısı ışık şiddetlerine bağlı olarak değişim göstermiş ve en yüksek protein oranı 100 ve $250\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde, en düşük karbohidrat ve lipid oranı $50\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde kaydedilmiştir.

Flynn ve ark. (1993), yaptıkları çalışmada, *I. galbana*'yı iki farklı N kaynağı kullanarak (NO_3 ve NH_4 azotları) kültüre almışlar ve sonra ortamdan N kaynağını çekerek yağ asitlerine bakmışlardır. $\text{NO}_3\text{-N}$ 'u ile büyüyen kültür ile $\text{NH}_4\text{-N}$ 'u ile büyüyen kültürler arasında yağ asitleri düzeyleri bakımından farklılıklar belirlenmiştir. $\text{NH}_4\text{-N}$ 'u ile büyüyen kültürde yağ asitleri hızlı bir şekilde artış göstermiş ve $\text{NO}_3\text{-N}$ 'u ile kültüre alınanlara göre iki kat daha fazla bulunmuştur.

Reitan ve ark. (1994), *P. tricornutum*, *Chaetoceros* sp., *I. galbana*, *P. lutheri*, *N. atomus*, *Tetraselmis* sp. ve *Gymnodinium* sp. türlerini farklı besin sınırlamasının olduğu ortamlarda kültüre alıp; lipid ve yağ asitleri içeriklerine bakmışlardır. Lipid oranı kuru ağırlıkta %8.3-29.5 arasında değişim göstermiş ve en fazla lipid miktarı *I. galbana* ve *P. lutheri*'de belirlenmiştir. Fosfor sınırlaması artırıldığında *I. galbana*, *P. lutheri*, *P. tricornutum* ve *Chaetoceros* sp.'de lipid oranı artarken; *N. atomus*, *Tetraselmis* sp.'de lipid oranı düşmüştür. Besin sınırlamasının yapıldığı kültürlerde PUFA sentezinin azaldığı tespit edilmiştir.

Kilham ve ark. (1997), yeşil alg *Ankistrodesmus falcatus* türünü nütrient sınırlaması yapılan ortamda kültüre alarak, biyokimyasal içeriğindeki değişime bakmışlardır. Azot sınırlaması yapılan kültürdeki hücrelerin büyüklüğü ve hücre yoğunluğu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında daha küçük ve yoğunluğunu az, P sınırlaması yapılan kültürdeki hücrelerin ise daha büyük ve daha yoğun olduğunu bildirmişlerdir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında N sınırlaması yapılan kültürlerde protein oranı düşük, P sınırlaması yapılan kültürlerde ise karbohidrat ve lipid oranı yüksek bulunmuştur. Fosfor sınırlaması yapılan kültürlerde lipid oranı N sınırlaması yapılan kültürlerden daha yüksek bulunmuştur. Protein:lipid

oranı N sınırlaması yapılan kültürde 0.38 olarak en düşük, P sınırlaması yapılan kültürde 0.44 ve kontrol grubunda ise 1.14 olarak bildirilmiştir.

Zhu ve ark. (1997), *I. galbana*'yı kapalı tubuler fotobioreaktör sistemde kültüre alıp; lipid, karbohidrat, protein ve yağ asidi profilini çıkarmışlardır. Kültürde canlı kütle hızlı bir şekilde artış gösterirken; ışık yoğunluğu ve sıcaklığa bağlı olarak protein oranı, karbohidrat ve lipid miktarlarının değişim gösterdiği belirtilmiştir. Yağ asitlerinden C18:0 ile C18:1'in gün içinde, PUFA'lar (C18:2, C18:3, C18:4, C20:5 ve C22:6) ve doymuş yağ asidi C16:0'nın ise karanlıkta artış gösterdiği bildirilmiştir.

Fidalgo ve ark. (1998), *I. galbana*'yı N kaynağı olarak NO₃, NO₂ ve üre kullanarak kültüre alıp; biyokimyasal kompozisyonunu incelemişlerdir. Büyüme oranı açısından NO₃, NO₂ ve üre ile kültüre alınan türler arasında bir fark bulunmazken; en yüksek lipid oranı duraklama fazının başında üre ile (%42.05) ve duraklama fazının sonunda NO₂ ile (%41.61) bulunmuştur. PUFA (%62.27), EPA (%27.66) ve DHA (Docosahexaenoic asit; 22:6w3) (%14.13) duraklama fazının başında üre ile yapılan kültürde en yüksek bulunmuştur. En yüksek protein oranı ise %44.96 ile üre ile yapılan kültürlerde logaritmik fazda bulunmuştur.

Illman ve ark. (2000), düşük N uygulaması sonucunda farklı *Chlorella* türlerindeki klorofil değerlerin değişimini incelemişlerdir. Buna göre; hem normal koşullarda hem de düşük N uygulamasında *C. vulgaris*'in diğer dört türe göre en iyi gelişme gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmada N eksilmesi, 5 türün yetiştirildiği biyoreaktör sistemde uygulanmış ve kontrol guruplarıyla karşılaştırılmıştır. *C. emersonii*'nin bu uygulamadan diğer türlere göre daha fazla etkilendiği ve hücre sayısındaki artışın diğer türlere göre en fazla olduğu ortaya çıkartılmıştır. Ayrıca 5 farklı *Chlorella* türünde ölçülen yüzde lipid değerlerinin *C. sorokiniana* dışındaki diğer dört türde (*C. vulgaris*; *C. minutissima*; *C. emersonii*, *C. protothecoides*) yaklaşık olarak 2'şer kat arttığı belirlenmiştir. *C. sorokiniana*'da ise bu değer hemen hemen kontrol gurubu ile aynı düzeyde kalmıştır.

Xu ve ark. (2001), *Ellipsoidon* sp.'de 3 farklı N kaynağının (NO₃-N, NH₄-N ve Üre-N) etkisini araştırmışlardır. N kaynakları NO₃-N'u ile NH₄-N arasında büyüme açısından farklılık tespit edilmezken; üre-N ile hazırlanan besin ortamında daha düşük oranda bir büyüme kaydetmişlerdir. Yağ asitleri açısından

PUFA, EPA ve ARA (Arachidonic asit; 20:4w6) değerlerinin N konsantrasyonu ile doğru orantılı bir şekilde arttığını, en yüksek değerlerin ise NO₃-N'u ve NH₄-N'u ile hazırlanan besi ortamlarında elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Khozin-Goldberg ve ark. (2002), PUFA ve ARA bakımından çok zengin olduğu bilinen Chlorophyta filumuna ait *Parietochloris incisa*'yı N eksikliğinin yapıldığı ortamda kültüre alarak yağ asitleri değişimine bakmışlardır. Azot açlığının olduğu ortamda yağ asitleri miktarı kuru ağırlıkta %35'in üstüne çıkmış, ARA miktarı ise yağ asitleri içinde %60'a ulaşmıştır. Biyomas miktarının artmasıyla birlikte hem yağ asitleri hem de ARA miktarının arttığı belirlenmiştir.

Cylindrotheca sp.'nin dört farklı suşu (B156, B164, B196, B200) Liang ve ark. (2002) tarafından kültüre alınmış ve büyüme evrelerinin farklı fazlarında hasat edilerek yağ ve yağ asitleri kompozisyonuna bakılmıştır. Lipid oranı en fazla duraklama fazının sonunda B156'da %24, B164'de %26.6 ve B200'de %17.3 olarak saptanırken, logaritmik artış fazında B196'da %15.5 ile en yüksek bulunmuştur.

Renaud ve ark. (2002), *Isochrysis* sp., *Chaetoceros* sp., *Rhodomonas* sp. ve *Cryptomonas* sp. türlerini 5 farklı sıcaklık derecesinde (25°C, 27°C, 30°C, 33°C ve 35°C), %25 tuzluluk, pH 8.3 ve 80µmolphotonm⁻²s⁻¹ ışık yoğunluğunda, 12:12 aydınlık-karanlık periyodu uygulayarak kültüre alıp; kimyasal kompozisyon ile yağ asitleri kompozisyonunu incelemişlerdir. 25°C'de *Chaetoceros* sp. %16.8 ile en yüksek lipid oranına sahipken, 27-30°C'lerde en yüksek lipid oranı %21.7 ile *Isochrysis* sp.'de saptanmıştır.

Bandarra ve ark. (2003), *I. galbana*'yı 2 farklı aydınlanma periyodunda (24 saat devamlı ışık ve 16:8 aydınlık-karanlık periyodu) kültüre alıp; yağ asitleri ve sterol oranlarına bakmışlardır. En yüksek PUFA oranı 8 saat aydınlatma yapılan kültürde belirlenirken, sürekli aydınlatma yapılan kültürlerde sterol oranı artış göstermiştir.

Rousch ve ark. (2003) tarafından, *P. tricorutum* ve *C. muelleri* türleri 2 saat boyunca 24°C, 30°C, 35°C, 40°C'lik; 24 saat boyunca 24°C, 30°C ve 35°C'lik ısıya maruz bırakılmış ve yağ asitleri değişimine bakılmıştır. 2 saatlik uygulama sonucunda *P. tricorutum*'da sıcaklık arttıkça PUFA oranında azalma (%55'den %49'a), doymuş yağ asitlerinde (SFA) artma (%27'den %32'ye)

gözlenmiştir. Aynı durum *C. muelleri* içinde geçerli olup; PUFA oranı %56'dan %38'e düşerken, SFA ise %19'dan %34'e yükselmiştir. 24 saatlik uygulama sonucunda *P.tricornutum*'da PUFA oranının %57'den %54'e ve *C.muelleri*'de ise %40'dan %35'e düştüğü belirlenmiş ve her iki uygulama sonucunda da yağ asitlerinin sıcaklık değişimlerinden etkilendiği saptanmıştır.

Fábregas ve ark. (2004), *Nannochloropsis* sp. türünü farklı ışık yoğunluklarında (40, 60, 80, 220 ve 480 $\mu\text{molquantam}^{-2}\text{s}^{-1}$) kültüre alıp; biyokimyasal yapısını incelenmiştir. En yüksek protein oranı, 220 $\mu\text{molquantam}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde %42.76 olarak belirlenirken, en yüksek lipid (%60.71) ve karbohidrat (%29.02), 40 $\mu\text{molquantam}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde saptanmıştır. Düşük ışık şiddetinde (40 $\mu\text{molquantam}^{-2}\text{s}^{-1}$) %28.9 olan EPA değerinin ışık şiddetinin 480 $\mu\text{molquantam}^{-2}\text{s}^{-1}$ 'e çıkarıldığı zaman %8.02'ye düştüğü belirlenmiştir.

Xu ve ark. (2004), *Nannochloropsis* sp.'yi mikсотроfik olarak beslemişler ve denemelerinde N kaynağı olarak NO_3^- 'i, karbon kaynağı olarak da glukozu kullanmışlardır. *Nannochloropsis* sp.'nin yığın kültürü yapıldığında EPA oranı %23.6 iken, NO_3^- uygulamasında %30.9, glukoz eklemesi sonucunda ise EPA oranı %20.1 olarak saptanmıştır.

Zhila ve ark. (2005), *B. braunii* türünü %75 N sınırlamasında, 10:14 aydınlık-karanlık periyodu uygulayarak ve %1 CO_2 vererek kültüre alıp; büyüme ve lipid kompozisyonunu gözlemişlerdir. Yirmi günlük çalışmanın sonunda kontrol ortamıyla karşılaştırıldığında, günlük biyomas %6.8'den %2.9'a düşerken, lipid oranı ise %21'e yükselmiştir.

Hu ve Gao (2006) tarafından, *Nannochloropsis* sp. farklı N, P, sıcaklık ve tuzluluk seviyelerinde kültüre alınmış ve CO_2 oranı ise 2.800 μl^{-1} olacak şekilde ayarlamıştı. Bu çalışmada, N ve P miktarlarını artırdıkça protein ve PUFA'ların artış gösterdiği ancak karbohidrat, lipid ve yağ asitlerinin azaldığı sonucuna varmışlardır. Tuzluluğun azaltılmasıyla yağ asitlerinin ve PUFA'ların arttığı, sıcaklığın artışıyla da yağ asitlerinin arttığı; PUFA'ların ise azalış gösterdiği belirtilmiştir.

Khozin-Goldberg ve Cohen (2006), tatlı sularda bulunan *Monodus subterraneus*'a P sınırlaması uygulamışlar ve P düzeyi 175 μmol 'den 52.5 μmol 'e ve 175 μmol 'den 0 μmol 'e azalttıkları 2 farklı ortamda kültüre almışlardır. Lipid ve

yağ asitleri değişimi gözlemlendiğinde PUFA ve EPA oranlarında sırasıyla %28.2'den %20.8'e ve %19.4'den %15.5'e azalmalar olduğu ancak lipid oranında artış ve buna bağlı olarak da triaçilgliserol oranında artış saptanmıştır.

Liang ve ark. (2006), *P. tricornutum* ve *C. muelleri*'yi NO_3 , NH_4 ve üre gibi üç farklı azot kaynağı içeren ortamda ve 4 farklı UV ışık yoğunluğunda 2 gün süreyle kültüre almışlardır. Her iki türde büyüme üzerine farklı N kaynaklarının etkisi olmazken, yağ asitlerinin tümü farklı N kaynaklarından etkilenmiştir. Her iki türde de maksimum doymuş yağ asitleri NH_4 içeren ortamda, tekli doymamış yağ asitleri (MUFA) NO_3 içeren ortamda ve PUFA ise üre eklenen kültürde saptanmıştır. Tüm N kaynaklarında ve her iki türde de UV PUFA'nın artışına; SFA'nın azalmasına neden olmuştur.

Xu ve ark. (2006), *C. protothecoides*'in heterotrofik ve ototrofik yetiştirme şartlarında biyodizel olarak kullanım olanaklarını karşılaştırmışlardır. Buna göre *C. protothecoides*'in ototrofik olarak kültüre alındığında, hücre içerisindeki protein oranının heterotrofik beslemeye göre 5 kat arttığı (54.64 (Ot.)/10.28 (Het.)), ancak lipid oranının 4 kat (14.57 (Ot.)/55.20(Het)) ve karbohidrat oranının 1.5 kat (10.62 (Ot.)/15.43 (Het)) daha düşük olduğu ortaya konmuştur.

Weldy ve Huesemann (2007), *D. salina*'yı iki farklı ışık yoğunluğunda (200 ve 800 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ve N sınırlaması yaparak fotobiyoreaktör sistemde kültüre alıp; lipid oranının değişimine bakmışlardır. Yüksek ışık ve N eksiltmesinin olduğu kültürde büyüme fazının başında %16 olan lipid oranının durgunluk fazının başında %44'e yükseldiğini ve sadece yüksek ışık altında bu oranın %38'lerde kaldığını bildirmişlerdir.

Raghavan ve ark. (2008), *C. calcitrans*'ı laboratuvar koşullarında farklı sıcaklık (20-25°C), farklı tuzluluk (%25-30) ve CO_2 ile havalandırma koşullarında kültüre alıp; büyüme, karbohidrat, lipid ve protein değerlerini belirlemişlerdir. Bu araştırmada biyomas değerleri karbondioksit ilavesinden etkilenirken, tuzluluk ve sıcaklık değişiminden çok az etkilenmiştir. Karbondioksit eklemesi protein değerini artırırken, karbohidratı düşürmüş, lipid oranını değiştirmemiştir. Yüksek tuzlulukta karbohidrat artış göstermiş, protein ve lipid oranlarında düşüşler olmuştur. Düşük sıcaklıkta da lipid ve karbohidrat değerleri artarken, protein etkilenmemiştir.

Li ve ark. (2008), *N. oleoabundans*'ı farklı N kaynakları (NO₃, üre ve NH₄) kullanarak kültüre alarak hücre büyümesi ve lipid birikimi üzerine etkisini çalışmışlardır. En fazla biyomas NO₃ ile 2.5gl⁻¹ olarak bulunurken, en düşük biyomas ise 1.1gl⁻¹ ile NH₄'da bulunmuştur. En yüksek lipid oranının da %38 ile NO₃ uygulamasında elde edilmiştir.

Converti ve ark. (2009), biyodizel üretimi için *N. oculata* ve *C. vulgaris*'i farklı N konsantrasyonları ve farklı sıcaklıklarda kültüre alarak yaptıkları çalışmada, *N. oculata*'da sıcaklığı 20°C'den 25°C'ye yükselttiklerinde lipid oranının %7.9'dan %14.92'ye arttığını ve *C. vulgaris*'de sıcaklığı 25°C'den 30°C'ye yükselttiklerinde ise lipid oranının %14.71'den %5.9'a düştüğünü belirtmişlerdir. Aynı zamanda N oranını %75 oranında azalttıklarında lipid oranının *N. oculata*'da %7.9'dan %15.31'e ve *C. vulgaris*'de %5.9'dan %16.41'e yükseldiğini bildirmişlerdir.

Gouveia ve ark. (2009), *N. oleoabundans* türünü biyoyakıt elde etmek amacıyla farklı kültür koşullarında kültüre alarak, biyomas ve lipid miktarını incelemişlerdir. Ortalama biyomas üretimi 30°C'de, yeterli N bulunan ve CO₂ ilavesi yapılan ortamda ve ikilenme zamanı 1.4 gün olan ortamda saptanmıştır. En yüksek biyomas miktarı 30°C'de ve yeterli N bulunan ortamda saptanmıştır. Maksimum lipid oranı %56 ile 6 gün N sınırlaması yapılan ve 30°C'deki kültürde saptanmış, bunu %52 lipid oranı ile N eksiltmesi yapılan 30°C deki ve CO₂ ilavesi yapılan kültür izlemiştir.

Oh ve ark. (2009), *P. cruentum*'u farklı büyüme koşullarında (12:12 aydınlık-karanlık periyodu ve CO₂ karbon kaynağı, 6:18 aydınlık-karanlık periyodu ve CO₂ karbon kaynağı, 18:6 aydınlık-karanlık ve CO₂ karbon kaynağı, 24 saat karanlık ve glukoz karbon kaynağı, 24 saat karanlık ve gliserol karbon kaynağı olarak kullanarak) kültüre alıp; lipid miktarının değişimine bakmışlardır. En fazla lipid oranı %19.3 ile 12:12 aydınlık-karanlık periyodu uygulanan grupta bulunurken; en düşük lipid %2.2 ile karanlık ortamda gliserol eklenen grupta elde edilmiştir. Maksimum biyomas ise 2.1gl⁻¹ ile 12:12 ve 18:6 aydınlık-karanlık uygulanan gruplarda bulunmuştur.

Tatlı su algi *N. oleoabundans* fotobiyoreaktör sistemde N eksiltmesi yapılarak ve normal besi yerinde Pruvost ve ark. (2009) tarafından kültüre

alınmış; biyomas ve lipid değişimine bakılmıştır. Normal besi ortamında biyomas $16.5 \text{ gm}^{-2}\text{gün}^{-1}$ ve lipid %23 iken, N eksikliği uygulanan grupta biyomas düşmüş ancak lipid oranı %37'ye ulaşmıştır.

Rodolfi ve ark. (2009), 30 farklı türü laboratuvar ortamında lipid ve biyomas miktarını belirlemek amacıyla kültüre almışlar; bunlardan biyomas ve lipid oranı yüksek olan 4 türü (2 denizel ve 2 tatlı su türü) dış ortamda 20 L'lik düz alveolar panel reaktörde N eksikliğinde kültüre alarak biyomas ve lipid oranını incelemişlerdir. Denizel türlerden *Nannochloropsis* sp.'nin N eksiltmesi yapılan ortamda lipid içeriğini %60'a çıkardığını belirlemişlerdir.

Widjaja (2009), *C. vulgaris* türünü farklı büyüme koşullarında kültüre alarak biyomas ve lipid miktarını belirlemeye çalışmıştır. Çalışmada ilk olarak normal besi ortamında türü kültüre almış ve logaritmik artış evresinin sona ermesiyle N'u tamamen çekilmiş ortamda 7 ve 17 gün süreyle kültüre alarak biyomas ve lipid miktarını belirlemiştir. Biyomas ve lipid oranı 17 gün boyunca N eksiltmesi uygulan ortamda daha fazla bulunmuştur. İkinci grup çalışmada farklı oranlarda CO₂ (0, 20, 50 ve 200 mldakika⁻¹) ilavesi yaparak biyomas ve lipid miktarı belirlenmiştir. 0 ve 20 mldakika⁻¹ CO₂'in büyüme hızını arttırdığı, 50 ve 200 mldakika⁻¹ CO₂'in ise büyüme hızını yavaşlattığı belirlenmiştir. Aynı şekilde normal besi ortamı ve 17 gün N eksiltmesi yapılan kültürler verilen 20 mldakika⁻¹ CO₂'in lipid oranını artırdığı bildirilmiştir.

Zhao ve ark. (2009), *Skeletonema costatum* ve *Prorocentrum donghaiense* türlerini farklı miktarda N ve P içeren ortamlarda 12:12 aydınlık-karanlık periyodu uygulayarak kültüre almış ve lipid, karbohidrat ve protein değişimine bakmışlardır. Çalışmanın sonunda *S. costatum* P sınırlaması yapılan besi ortamında lipid miktarını artırırken; hem N hem de P sınırlaması yapılan ortamda karbohidrat miktarını artırmıştır. Toplam protein ise N-P içeren ortamda biyomasda yüksek oranda saptanmıştır. *P. donghaiense* hücrelerinde N ve P sınırlamasının yapıldığı ortamda lipid ve karbohidrat miktarı artış gösterirken; besin sınırlamasının yapıldığı ortamlarda toplam proteinde değişim gözlenmemiştir. Ayrıca *S. costatum*'un bu üç biyokimyasal yapıyı biriktirme yeteneğinin *P. donghaiense*'ye göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Damiani ve ark. (2010), yaptıkları çalışmada *Haematococcus pluvialis*'i farklı stres koşulları altında (yüksek ışık, yüksek ışık-N eksikliği) kültüre aldıklarında, lipid oranının N eksikliği ve yüksek ışık yoğunluğunda %15'den %32.99'a yükseldiğini belirtmişlerdir.

Satoh ve ark. (2010), yeni bir mikroalg türü olan *Pseudochoricystis ellipsoidea* (Trebouxiophyceae)'yı 5-10 gün boyunca normal besi yerinde kültüre alarak maksimum hücre yoğunluğunu elde etmiş ve sonra N sınırlamasının olduğu ortamda 8 gün boyunca kültüre alarak lipid ve yağ asitleri değişimine bakmışlardır. Normal besi yerinde kültüre alınan türün lipid oranı %32, N sınırlaması yapılan ortamda ise %26 olduğunu ve aynı zamanda N sınırlaması yapılan ortamda hidrokarbon ve trigliserid miktarında artışlar olduğunu bildirmişlerdir.

Bulut Mutlu ve ark. (2011), *C. vulgaris*'i laboratuvar koşullarında 5 farklı besi ortamında (%50 N eksiltmesi, %100 N eksiltmesi, %50N-P eksiltmesi, %50 P eksiltmesi ve besin farklılığı (N kaynağı NO₂)) kültüre alıp; lipid, biyomas ve protein miktarlarındaki değişimi incelemişlerdir. En yüksek lipid %35.6 ile %100 N eksiltmesi uygulanan grupta bulunurken, en düşük protein de %13.01 ile bu grupta ve en düşük biyomas ise 0.12gI⁻¹ ile NO₂ grubunda saptanmıştır.

Uslu ve ark. (2011), *S. platensis*'i laboratuvar koşullarında %50 ve %100 N eksiltmesi yapılan ortamlarda kültüre alarak lipid, biyomas ve protein değişimine bakmışlardır. %100 N eksiltmesi yapılan grupta en yüksek lipid %17.05 ile bulunurken; protein %5.6 ve biyomas 1.00gI⁻¹ olarak belirlenmiştir.

3.MATERYAL VE METOD

3.1.Materyal

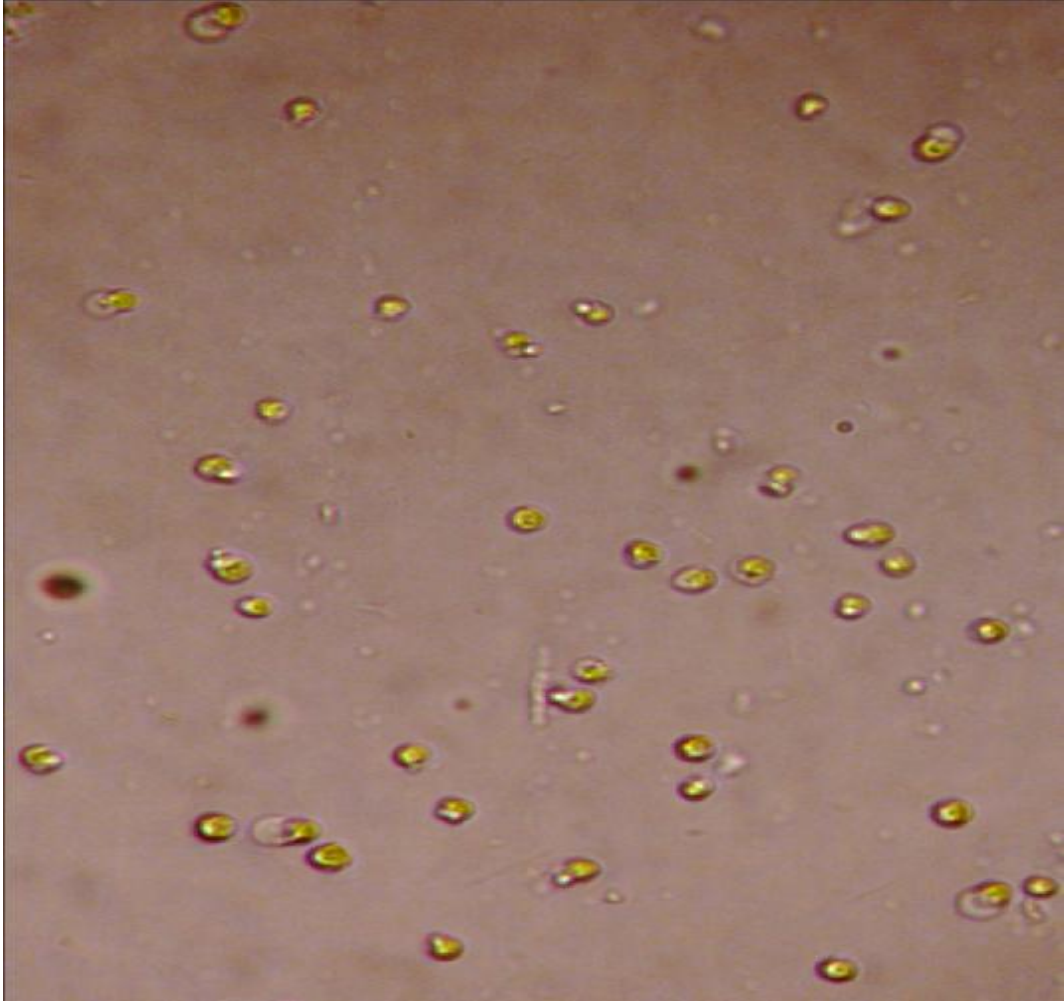
3.1.1. Kültüre Alınan Fitoplankton Türleri

Isochrysis affinis galbana ve *Phaeodactylum tricornutum* UTEX kültür koleksiyon laboratuvarından, *Porphyridium cruentum* Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesinden temin edilmiştir.

Isochrysis affinis galbana'ya ait sistematik sınıflandırma aşağıdaki gibidir (<http://sn2000.taxonomy.nl/Taxonomicon/TaxonTree.aspx?id=122600>).

Üst Alem	: <i>Eukaryota</i> - eukaryotes
Alem	: Chromista T. Cavalier-Smith, 1981 – chromists
Alt Alem	: Chromobiota Cavalier-Smith, 1991
Aşağı Alem	: Haptista
Şube	: Haptophyta TM Hibberd ex Cavalier-Smith, 1986
Sınıf	: Prymnesiophyceae D.J. Hibberd, 1976
Takım	: Isochrysidales Pascher, 1910
Aile	: Isochrysidaceae TM
Cins	: <i>Isochrysis</i> TM M. Parke, 1949
Tür	: <i>Isochrysis affinis galbana</i>

Denemede kullanılan türlerden biri olan *I. affinis galbana* iki kamçısı bulunan, haptoneması bulunmayan, sarı-kahverenkli tek bir kloroplastı olan tek hücreli denizel bir türdür. Hücre büyüklüğü 4-8 µm'dir (Hoff ve Snell, 1987). Yüksek miktarda PUFA içermesinden dolayı akuakültürde özellikle bivalvia larvalarının beslenmesinde canlı yem kaynağı olarak kullanılmaktadır (Sánchez ve ark., 2000).



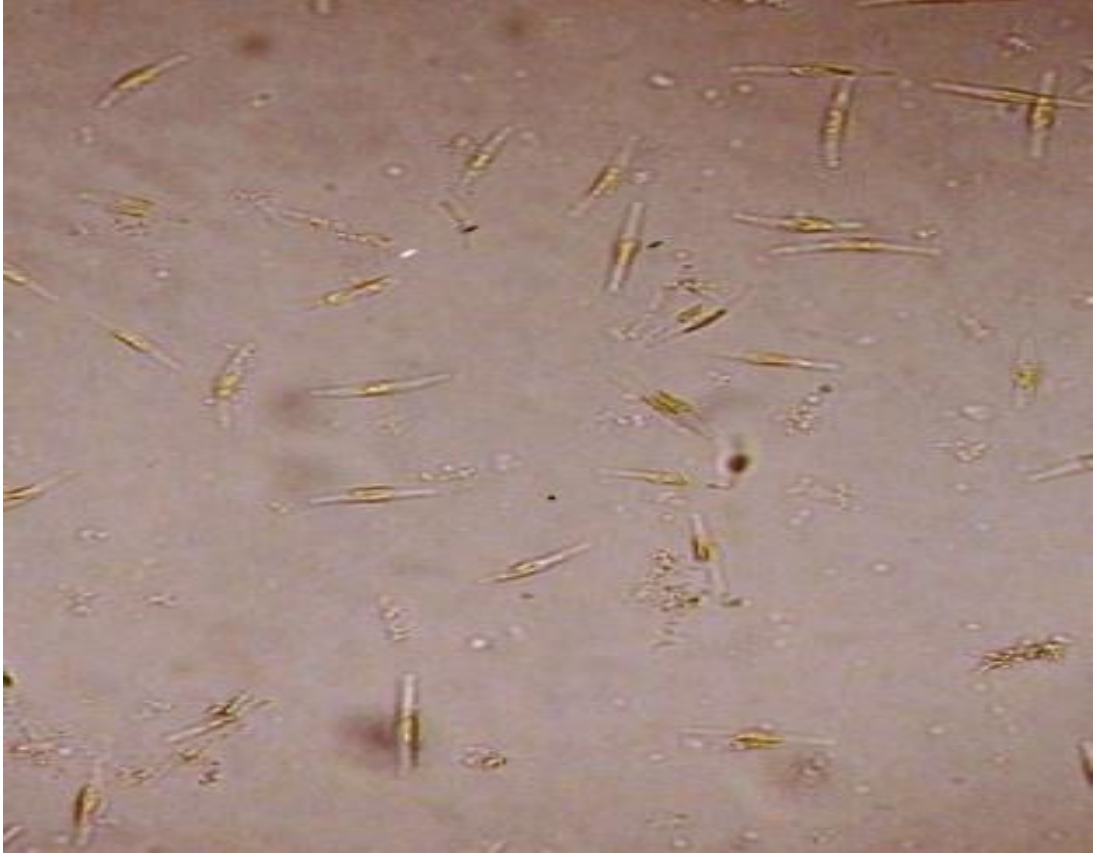
Şekil 3.1. Denemede Kullanılan *Isochrysis affinis galbana* (Foto: Leyla Uslu; 2011).

Phaeodactylum tricornutum'a ait sistematik sınıflandırma aşağıdaki gibidir
(<http://sn2000.taxonomy.nl/Taxonomicon/TaxonTree.aspx?id=127554&tree=0.1>)

- Üst Alem** : *Eukaryota* – eukaryotes
Alem : Chromista T. Cavalier-Smith, 1981 – chromists
Alt Alem : Chromobiota Cavalier-Smith, 1991
Aşağı Alem : Heterokonta (Cavalier-Smith, 1986) Cavalier-Smith, 1995– heterokonts
Şube : Ochrophyta (Cavalier-Smith, 1986) T. Cavalier-Smith, 1995
Alt Şube : Diatomeae (Dumortier, 1821) Cavalier-Smith, 1995 - diatoms

Sınıf	: Bacillariophyceae Haeckel, 1878 - raphid. pennate diatoms
Alt Sınıf	: Bacillariophycidae™ (Haeckel, 1878) Mann, 1990
Takım	: Naviculales Bessey, 1907
Alt Takım	: Phaeodactylinae J. Lewin, 1958
Aile	: Phaeodactylaceae™ Silva, 1962
Cins	: <i>Phaeodactylum</i> ™ Bohlin, 1897
Tür	: <i>Phaeodactylum tricornutum</i> Bohlin

Tek hücreli olan *Phaeodactylum tricornutum*, tatlı su türü olmasına rağmen, denizel ortamda da yaşayan bir diatom türüdür. Hücre merkezinde çoğunlukla kahverengi kromotoforu ve çok büyük bir golgi cisimciği bulunmaktadır. Genişliği 3µm olan türün uzunluğu 8-20µm'ye kadar değişim göstermektedir. Oval ve fusiform hücre şekilleri olan pennat bir diatom türüdür (Lewin, 1958). *P. tricornutum* %30-45 arasında PUFA içermekte ve bunun da %20-40'ını EPA oluşturmaktadır (Fajardo ve ark., 2007). EPA'nın kalp hastalıklarında, yüksek kolesterol tedavisinde, kandaki kolesterolü düşürmede ve romatizma riskinin azaltılmasında kullanıldığını ileri sürmüşlerdir (Dyerberg, 1986; Simopoulus, 1991; Durmaz, 2002'den).



Şekil 3.2. Denemede Kullanılan *Phaeodactylum tricorutum* (Foto: Leyla Uslu; 2011).

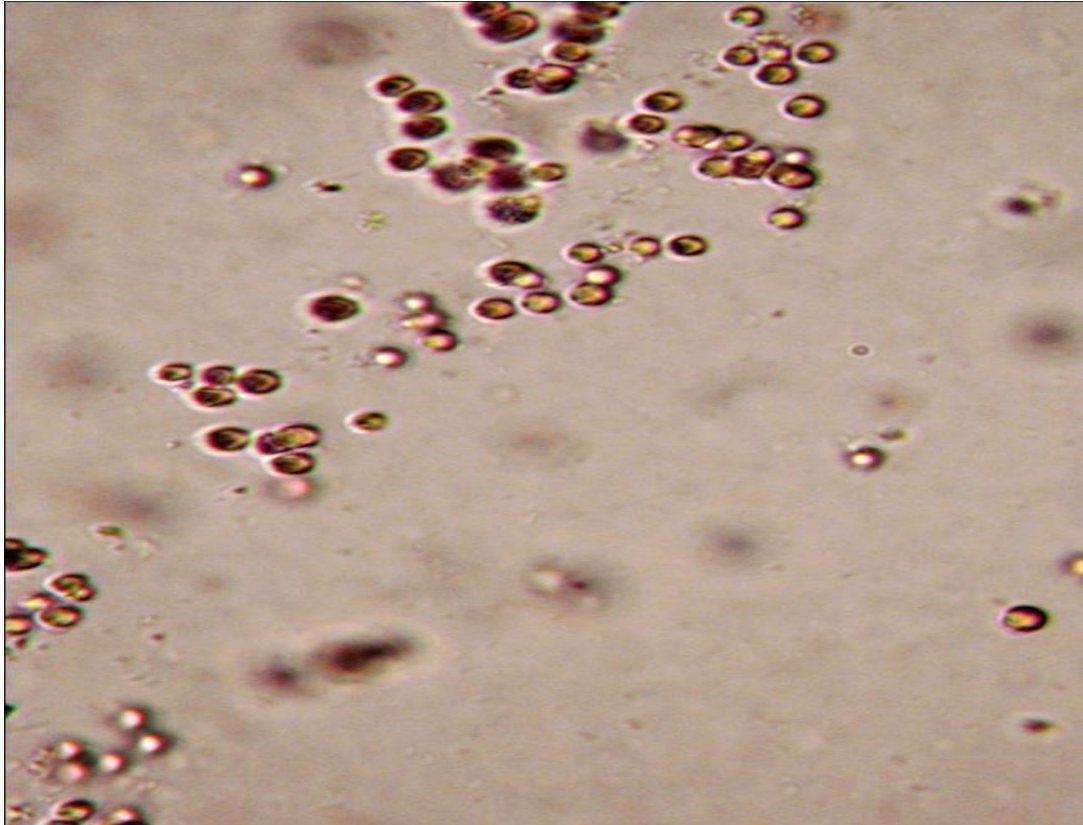
Porphyridium cruentum'a ait sistematik sınıflandırma aşağıdaki gibidir.

(<http://sn2000.taxonomy.nl/Taxonomicon/TaxonTree.aspx?id=127579&tree=0.1>).

Üst Alem	: <i>Eukaryota</i> - eukaryotes
Alem	: Plantae Haeckel, 1866 – plants
Alt Alem	: Biliphyta Cavalier-Smith, 1981
Şube	: Rhodophyta Wettstein, 1922 - red algae
Alt Şube	: Rhodellophytina Cavalier-Smith, 1998
Sınıf	: Rhodellophyceae™ Cavalier-Smith, 1998
Takım	: Porphyridiales
Aile	: Porphyridiaceae™
Cins	: <i>Porphyridium</i> ™ Nägeli, 1849, nom. cons.

Tür : *Porphyridium cruentum* (S.F. Gray) Nægeli

Rhodellophyceae sınıfına ait *Porphyridium cruentum*, denizlerde bulunan tek hücreli kırmızı alglerdendir. 4-9µm çapında küresel hücrelere sahip olan *P. cruentum*'da hücre duvarı yoktur. Hücreler tek başına ya da yığın bir şekilde düzensiz koloniler oluşturarak musilaj bir kılıfın içinde bulunurlar (Vonshak, 1988). Mikroalgal hücre metabolitleri daha çok dinlenme fazında üretilmektedir (Schlegel, 1985). Bu metabolitler organik asitler, karbohidrat, aminoasit, pestisit, vitamin, organik madde, antibiotik, enzim ve toksik bileşenlerdir. *P. cruentum*'un kuru ağırlığının yaklaşık %28-39'unu protein, %40-57'sini karbohidrat ve %9-14'ünü de lipid oluşturur. Ayrıca tocopherol, K vitamini ve büyük miktarda da karotenoid içermektedir (Becker, 1994). Hücrelerin karakteristik kırmızı rengi, içermiş oldukları fikoeritrinden kaynaklanmaktadır (Gantt, 1981). Sınırlayıcı koşullar altında kültür viskoz bir yapı alır ve polisakkarit üretmeye başlar (Ramus ve ark., 1989).



Şekil 3.3. Denemede Kullanılan *Porphyridium cruentum* (Foto: Leyla Uslu; 2011).

3.1.2.Kültür Ortamı

Denemede, denizel türler için F/2 ve diatom türü için Si-F/2 kültür ortamı (Guillard, 1973) modifiye edilerek kullanılmıştır. Kültür ortamının içeriği (Çizelge 3.1; Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3)'te verilmiştir. Denemede kullanılan deniz suyunun tuzluluğu salinometre (Orion 3 Star) ile ölçüldükten sonra %30 olacak şekilde saf su ile ayarlanmıştır. F/2 kültür ortamının hazırlanmasında kullanılan deniz suyu 0.45 µm göz açıklığında GFC (Whatman 0.47) filtre kağıdından süzölmüş, Si-F/2 ortamının hazırlanma aşamasında da aynı işlemler tekrarlanmış; Si eklemesi pH metre (Hanna, pH211) ile besi ortamının pH'ının 3-4'e düşürölmösmönden sonra yapılmıştır. Denemede kullanılacak tüm besi ortamlarının pH'ı 8 olarak ayarlanmıştır. Deneme kurulmadan önce besi ortamları 121°C'de 30 dakika süre ile otoklavda (Hirayama-HV-50L) steril edilmiştir.

Çizelge 3.1. F/2 Kültür Ortamı (Guillard, (1973)'ten)

Miktar	Eklene Madde	Stok Solüsyon	Molar Konsantrasyon
1ml ⁻¹	NaNO ₃	75g ⁻¹	882µmolL ⁻¹
1ml ⁻¹	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	5g ⁻¹	363µmolL ⁻¹
1ml ⁻¹	f/2 metal solüsyonu	Çizelge 3.2	
0.5ml ⁻¹	f/2 vitamin solüsyonu	Çizelge 3.3	

Çizelge 3. 2. F/2 Metal Solüsyonu

FeCl ₃ ·6H ₂ O	3.15g
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	4.36g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0098g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0063g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.022g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.01g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.18g

Çizelge 3.3. F/2 Vitamin Solüsyonu

Vitamin B ₁₂ (1.0gl ⁻¹ dH ₂ O)	0.001g
Biotin (0.1gl ⁻¹ dH ₂ O)	0.001g
Thiamine HCl	200mg

3.1.3. Deneme Koşulları

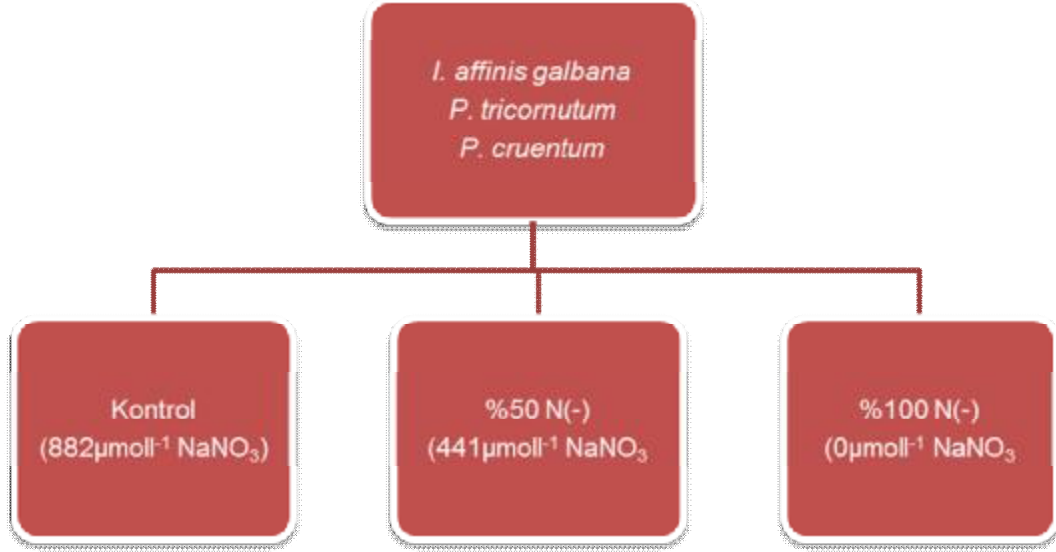
Denemenin yürütüldüğü laboratuarda sıcaklık, iklimlendirme cihazı kullanılarak 22±2°C'de tutulmuştur. Deneme süresince kültürlerde 80µmolphotonm⁻²s⁻¹ ışık şiddeti kullanılmış, 16:8 saat aydınlık-karanlık periyodu uygulanmıştır. Uygulanan ışık şiddeti ışık metre (Licor, LI-250) ile ölçülmüştür. Işık kaynağı olarak floresan (Tekfen, TLD36 watt) lambalar kullanılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Modifiye F/2 Kültür Ortamının Hazırlanması

Araştırmada kullanılan denizel türlerde lipid miktarları arasındaki farklılığı görmek amacıyla uygulanan muamelelerde besin eksikliği çalışılmış, bu amaçla F/2 ve Si-F/2 kültür ortamında bazı değişiklikler yapılmıştır. Besin eksikliği uygulamasında N elementi kültür ortamından birinci deney grubunda tamamen (%100) ve ikinci deney grubunda %50 oranında azaltılmıştır. F/2 besi ortamında 0.075gl⁻¹ NaNO₃ bileşiğinde 882µmol⁻¹ N elementi bulunmaktadır. Kurulan muamele gruplarında 882µmol⁻¹ (kontrol), 441µmol⁻¹ (%50 N(-)) ve 0µmol⁻¹ (%100 N(-)) konsantrasyonunda N elementi olacak şekilde besi ortamı hazırlanmıştır.

Deneme Grupları: *Isochrysis affinis. galbana*, *Phaeodactylum tricornutum* ve *Porphyridium cruentum* için aşağıda verilen şablondaki gibi deneme grupları oluşturulmuştur.



3.2.2. Denemenin Kurulması ve Yürütülmesi

Denemeler 8l'lik cam kavanozlarda 7l'lik kültür hacminde %20 aşılama yapılarak 3 tekrarlı olacak şekilde kurulmuştur (Şekil 3.4). Denemenin başlangıç optik yoğunluk (OD), biyomas ve klorofil *a* değerini belirlemek amacıyla deneme kaplarından örnekler alınmıştır.



Şekil 3.4. Türlerle Ait Deneme Düzenegi

Optik yoğunluk için 5ml ve klorofil *a* analizi için 5ml örnek alınmıştır. Optik yoğunluk *I. affinis galbana* türü için 680nm (Lin ve ark., 2007), *P. tricornutum* türü için 625nm (Acién Fernández ve ark., 2003) ve *P. cruentum* için 680nm (Kusmiyati, 2007) dalga boyunda visible spektrofotometre (Shimadzu, UV mini 1240) ile değerlendirilmiştir

Klorofil analizi için alınan 5ml'lik örnek, su trombu yardımı ile GFC filtre kağıdından süzülüş ve 15ml'lik deney tüplerine konmuştur. Üzerine 10ml %90'lık aseton ilavesi yapılmıştır. Asiditenin artması ve pigmentin zarar görmesini önlemek amacıyla filtre sırasında 2 damla %1'lik MgCO₃ eklenmiştir. Ağızları mantar tıpa ile kapatılan deney tüpleri çalkalandıktan sonra buzdolabında (+4°C) 24 saat karanlıkta bırakılmış ve ekstraksiyon süresi sonunda üstteki berrak kısım alınarak visible spektrofotometrede 630, 645, 665 ve 750nm'de absorpsiyon değerleri ölçülmüştür. 750nm'de okunan değerler bulanıklık düzeltme faktörü olarak kullanılmıştır. Bu amaçla 750nm'de okunan absorbans değerleri diğer dalga boylarında okunan değerlerden çıkartılmış ve klorofil *a* konsantrasyonları aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır (Formül 3.1 ve Formül 3.2), (Parsons ve Strickland, 1963).

$$\text{Klorofil } \alpha = 11.6 \times D_{665} - 1.31 \times D_{645} - 0.14 \times D_{630} \quad (3.1)$$

$$\mu\text{gl}^{-1} = C \times \frac{v}{l} \times V \quad (3.2)$$

C= Birinci eşitlikte hesaplanan klorofil miktarı

V= filtre edilen su örneği (l)

v= kullanılan asetonun hacmi (ml)

l= küvetten geçen ışık yolu (cm)

Denemenin başladığı günden itibaren tüm türlerde her gün biyomas analizi için 20ml örnek alınmıştır. Biyomas miktarlarının saptanması için, 0.45µm göz açıklığındaki “glass fibre” filtre kağıtları (GFC), süzme düzeneği ve bir su trombu kullanılarak oluşturulan vakum pompa ile süzüldü. Filtre kağıtları etüvde (Medcenter, Venticell 111) 105°C'de 1 saat tutuldu ve desikatörde saklandı. 0.001g

duyarlı terazide (Denver, TP214) dara ağırlıkları alınmıştır. Yoğunlaştırılmış biyomas etüvde 105°C'de 2 saat tutulmuştur. Bu süre filtre kağıtları desikatöre konularak, oda sıcaklığına kadar soğumaları sağlanmış ve daha sonra 0.001g duyarlı terazide tartımları yapılarak biyomas miktarı hesaplanmıştır (Boussiba ve ark., 1992).

Biyomas değişimlerini belirlemek amacıyla, günlük olarak ölçülen biyomas miktarları kullanılarak, ilk güne göre hacimsel biyomas çıkış oranı (PV) hesaplanmıştır (Formül 3.3), (Qiang ve Richmond, 1994).

$$PV(\text{gl}^{-1}\text{gün}^{-1}) = X_2 - \frac{X_1}{t_2} - t_1 \quad (3.3)$$

$X_1 = t_1$ zamanındaki kuru biyomas ağırlığı,

$X_2 = t_2$ zamanındaki kuru biyomas ağırlığı,

$t =$ zamanı ifade etmektedir.

Deneme, kültürlerin duraklama fazının sonunda bitirilmiştir. Uygulanan muamelelere göre, deneme *I. affinis galbana* türü için kontrol grubu 11, %50 N(-) ve %100 N(-) grubu 7 gün devam etmiştir. *P. tricorntutum* türü için kontrol, %50 N(-) ve %100 N(-) grubu 9'ar gün ve *P. cruentum* türü için kontrol grubu 18, %50 N(-) grubu 12 ve %100 N(-) grubu 7 gün sürmüştür.

Deney sonunda biyomas tayini, optik yoğunluk ve klorofil *a* analizi için örnekler alınmıştır. Deneme sonunda geriye kalan kültürlerin tamamı 7500rpm dönme hızındaki soğutmalı santrifüj (Heraeus, Suprafuge 22) ile 10 dakika boyunca çöktürüldü. Elde edilen çöktürülmüş hücreler 55°C de kurutularak lipid analizi için -21°C'de saklanmıştır.

Lipid değerleri yüzde biyomas oranına göre hesaplanmıştır. Lipid analizi Bligh ve Dyer (1959)'un uyguladığı yöntemle yapılmıştır. 0.2g homojenize edilmiş örnek, üzerine 120ml metanol/kloroform (1/2) eklendikten sonra Warring blender ile karıştırılmıştır. Daha sonra bu örnekler üzerine 20ml %0.4'lük CaCl_2 solüsyonundan eklenerek süzme kağıdından (Scliecher&Schuell, 595^{1/2} 185mm) süzülen örnekler, 105°C'de 2 saat etüvde bekletilip darası alınmış olan balon jojelere aktarılmıştır. Bu balonlar ağızları hava almayacak şekilde kapatılıp, 1 gece karanlık

bir ortamda bekletilmiş ve ertesi gün metanol-sudan oluşan üst tabaka bir ayırma hunisi yardımıyla alınmıştır. Balonların içinde kalan kloroform-lipid kısmından kloroform 60°C’de su banyosunda rotary evaparatör kullanılarak uçurulmuştur. Daha sonra balonlar etüvde 1 saat süreyle 60°C’de bekletilerek içerisindeki kloroformun tamamının uçması sağlanmış ve bir desikatör içerisinde oda sıcaklığına kadar soğutulup 0.001g duyarlı hassas terazide tartılmıştır (Şekil 3.5). Lipid oranının hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır (Formül 3.4).

$$\text{Lipid (\%)} = \frac{(\text{balon darası+lipid})-(\text{balon darası})}{\text{örnek miktarı}} \times 100 \quad (3.4)$$



Şekil 3.5. Türlerle Ait Lipid Analizi

Denemede uygulanan muamelelerden elde edilen verilerin kültürde OD, biyomas, klorofil *a* ve lipid değeri üzerine farklılık oluşturup oluşturmadığını belirlemek amacıyla, tek yönlü varyans analizi (ONE-WAY ANOVA) ve bu analizin sonucuna bağlı olarak farklılık oluşması durumunda farklılığı saptamak amacıyla Duncan çoklu karşılaştırma testi SPSSX 14.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır (Zar, 1999).

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

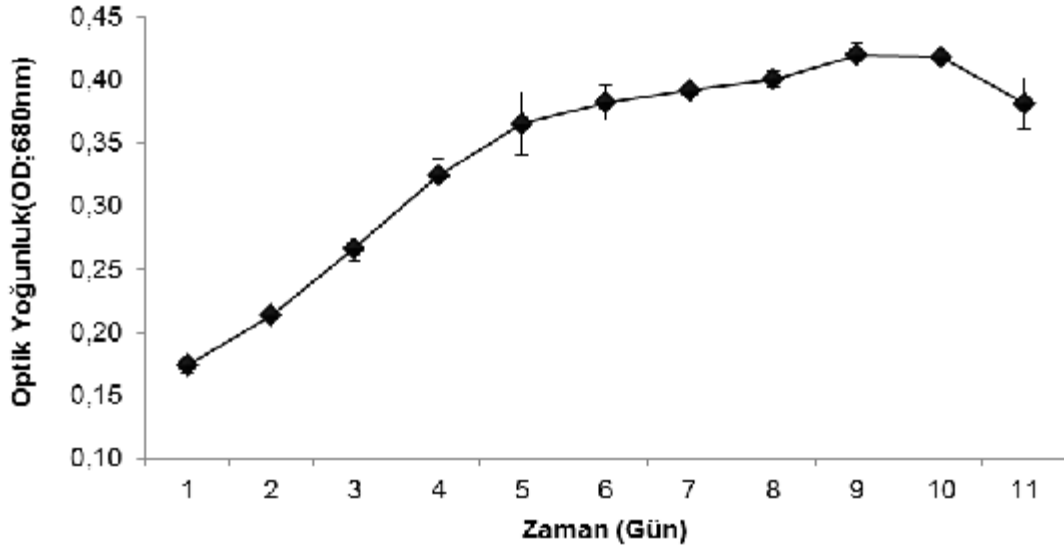
4.1. Bulgular

İki farklı besi ortamının *I. affinis galbana*, *P. tricornutum* ve *P. cruentum* kültürlerinde optik yoğunluk (OD), biyomas miktarı (g l^{-1}), klorofil *a* ($\mu\text{g l}^{-1}$) ve lipid (%) içeriğine etkilerini belirlemek amacıyla kurulan deneme, uygulanan muamele gruplarına göre birbirinden farklı sürelerde tamamlanmıştır. Kültüre alma süreleri *I. affinis galbana* kontrol grubunda 11 gün, %50 N(-) ve %100 N(-) grubunda 7 gün olmuştur. *P. tricornutum* kontrol grubunda, %50 N(-) grubunda ve %100 N(-) grubunda 9'ar gün ve *P. cruentum* için kontrol grubunda 18 gün, %50 N(-) grubunda 12 gün ve %100 N(-) grubunda 7 gün sürmüştür.

4.1.1. *Isochrysis affinis galbana*

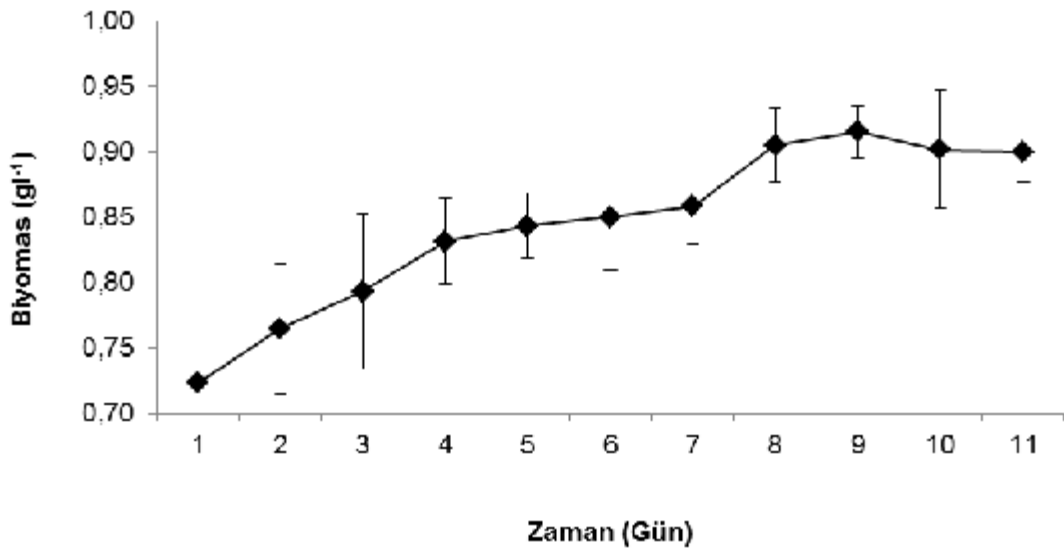
4.1.1.1. *I. affinis galbana* Kontrol Grubu Büyüme Değerleri ve Lipid İçeriği

Denemede F/2 besi ortamı kullanılmış ve *I. affinis galbana* büyüme özellikleri saptanmıştır. 680nm optik yoğunluklarına göre büyüme fazları tespit edilmiştir. Buna göre kontrol grubuna ait deneme 11 gün devam etmiş ve başlangıç optik yoğunluğu $0.173 \pm 0.005 \text{ OD}_{680}$ olarak belirlenmiştir. Optik yoğunlukları değişimine bakıldığında denemenin 9'uncu gününe kadar düzenli bir artış olurken, 9 ve 10'uncu günlerde kültür duraklama evresine girmiş ve 11'inci günde optik yoğunlukta azalma olmuştur. Deneme 11'inci günde bitirilmiş ve kültür hasat edilmiştir. Elde edilen en yüksek optik yoğunluk 9'uncu günde $0.419 \pm 0.009 \text{ OD}_{680}$ iken; son gün $0.381 \pm 0.02 \text{ OD}_{680}$ olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.1).



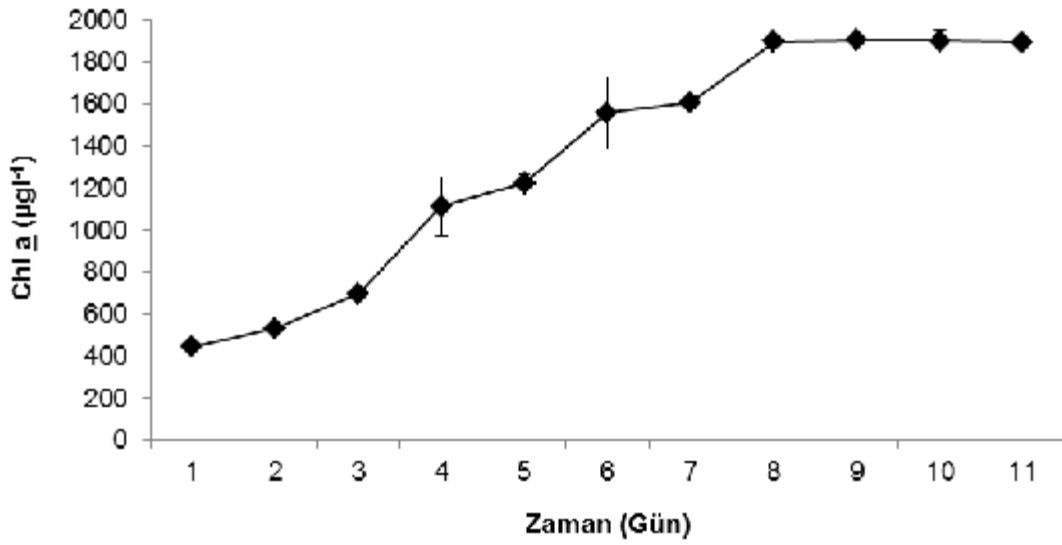
Şekil 4.1. Kontrol Grubu *I. affinis galbana* Optik Yoğunluk Değişimi

Denemenin başlangıcında biyomas miktarı $0.723 \pm 0.02 \text{gl}^{-1}$ iken, en yüksek biyomas miktarı 9'uncu günde $0.915 \pm 0.02 \text{gl}^{-1}$ ile elde edilmiştir. Deneme 8'inci güne kadar artış göstermiş ancak bu günden itibaren artış olmamış; kültür duraklama fazına girmiştir. Son gün biyomas miktarı $0.900 \pm 0.02 \text{gl}^{-1}$ olarak bulunmuştur (Şekil.4.2).



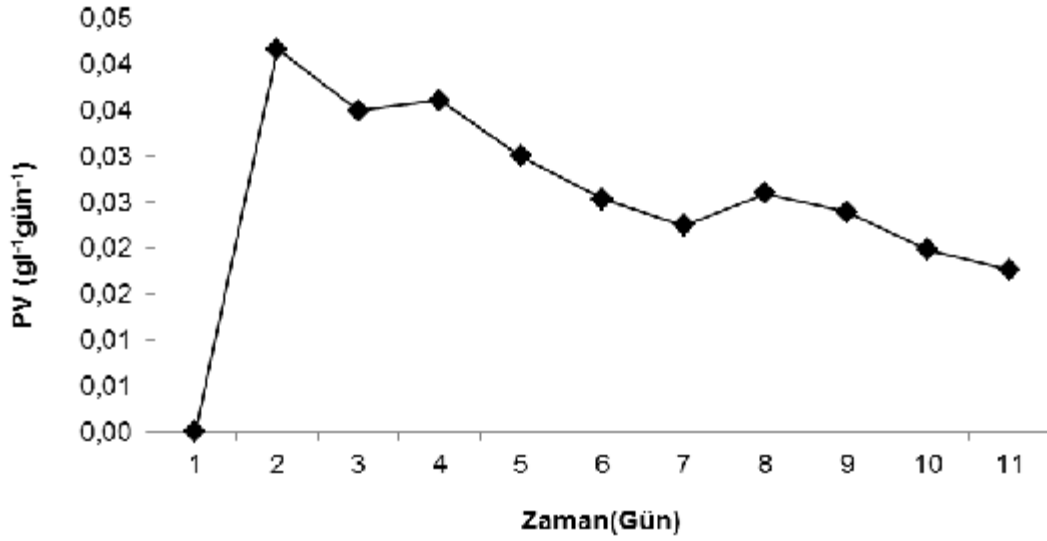
Şekil 4.2. Kontrol Grubu *I. affinis galbana* Biyomas Miktarı Değişimi

Kontrol grubuna ait olan denemede klorofil *a* değerleri deneme boyunca artış göstermiş olup, başlangıç klorofil *a* değeri $444.5 \pm 5 \mu\text{g l}^{-1}$ iken, son gün $1894.9 \pm 1 \mu\text{g l}^{-1}$ tespit edilmiştir. Deneme boyunca elde edilen klorofil *a* değerleri, kültürün 8'inci günden itibaren duraklama fazına girdiğini göstermektedir. En yüksek klorofil *a* değeri $1902 \pm 7 \mu\text{g l}^{-1}$ ile denemenin 9'uncu günü tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Kontrol Grubu *I. affinis galbana* Klorofil *a* Değerleri Değişimi

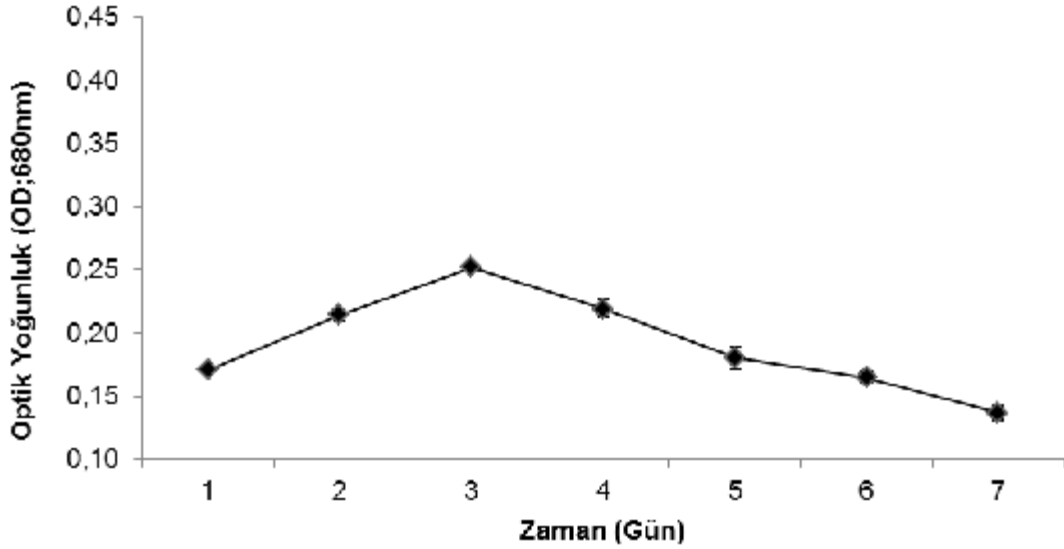
Denemede kontrol grubuna ait biyomas miktarları kullanılarak ilk güne göre PV oranları hesaplanmıştır. Buna göre en yüksek PV çıkış oranı denemenin 2'inci gününde $0.042 \text{g l}^{-1} \text{gün}^{-1}$ olarak tespit edilirken, son gün PV $0.017 \text{g l}^{-1} \text{gün}^{-1}$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Kontrol Grubu *I. affinis galbana* Hacimsel Biyomas Çıkış Oranları Değişimi

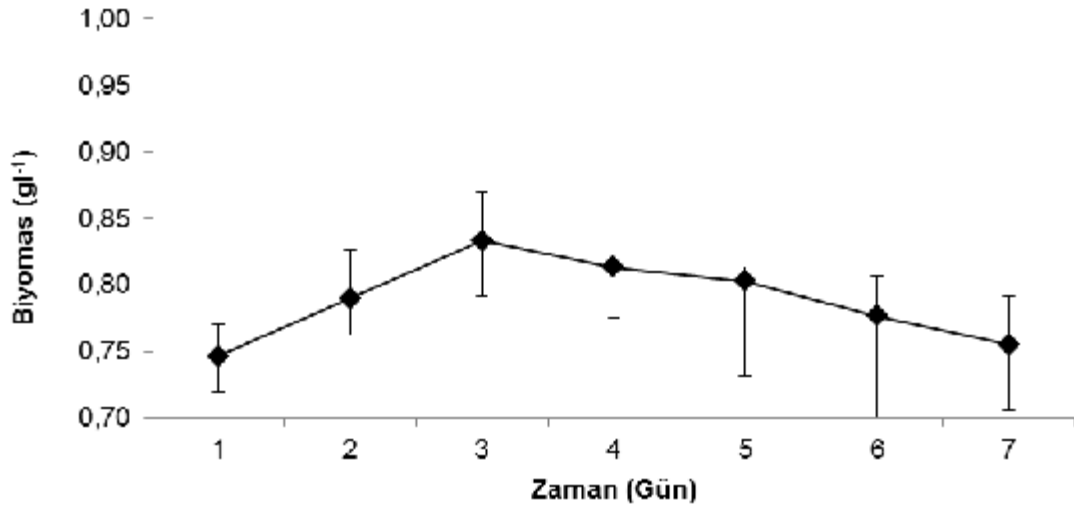
4.1.1.2. *I. affinis galbana*'nın %50 N Eksiltelen Kültüründe Büyüme Değerleri ve Lipid İçeriği

Bu deneme grubunda besi yeri olarak F/2 kültür ortamı kullanılmış ancak, besi yerindeki N kaynağı olan NaNO₃ %50 oranında azaltılarak besi yeri hazırlanmış ve *I. affinis galbana* kültüre alınmıştır. 680nm optik yoğunluklarına göre büyüme fazları tespit edilmiştir. Buna göre %50 N eksiltmesi yapılan grupta deneme 7 gün sürmüştür. Denemenin ilk 3 gününde logaritmik artış gözlenmiş, 3'üncü günden itibaren azalmalar meydana gelmiştir. Denemenin başlangıcında optik yoğunluk 0.171 ± 0.001 OD₆₈₀ iken, 3'üncü gün en yüksek optik yoğunluğa (0.252 ± 0.003 OD₆₈₀) ulaşılmıştır. Son gün optik yoğunluk 0.137 ± 0.005 OD₆₈₀ olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. %50 N Eksik Ortamda *I. affinis galbana* Optik Yoğunluk Değişimi

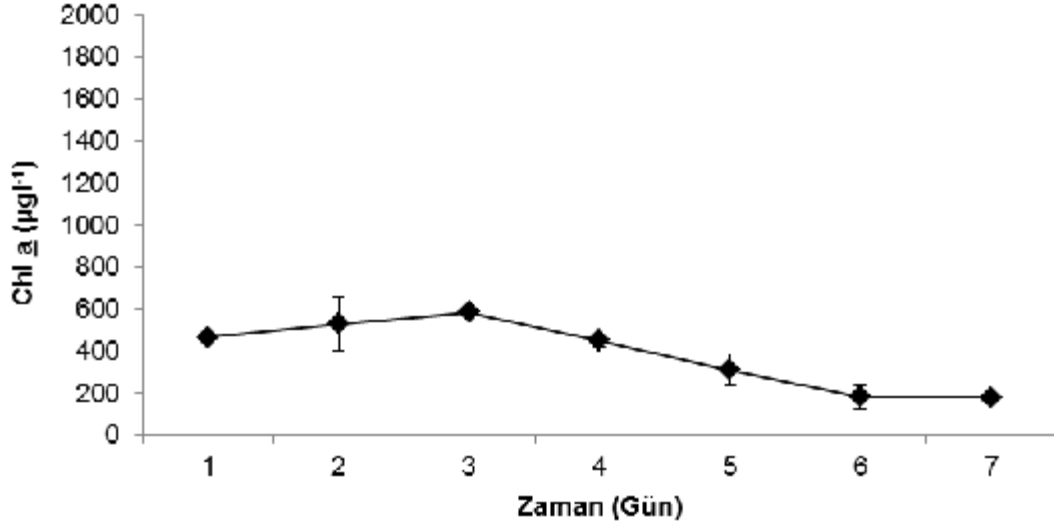
Denemeye $0.747 \pm 0.04 \text{gl}^{-1}$ biyomas miktarı ile başlanmıştır. En yüksek biyomas 3'üncü günde $0.833 \pm 0.05 \text{gl}^{-1}$ ile elde edilmiştir. Denemenin 3'üncü gününden itibaren biyomas miktarında azalmalar meydana gelmiş; son gün elde edilen biyomas miktarı $0.755 \pm 0.03 \text{gl}^{-1}$ olmuştur (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. %50 N Eksik Ortamda *I. affinis galbana* Biyomas Miktarı Değişimi

Başlangıç klorofil *a* değeri $465.87 \pm 2 \mu\text{gl}^{-1}$ iken, denemenin 3'üncü günü $586.06 \pm 4 \mu\text{gl}^{-1}$ ile en yüksek değere ulaşmış ve denemenin sonuna kadar azalış göstermiştir. Denemenin 6'ncı ve 7'inci günlerinde klorofil *a* değerlerinde fazla bir

değişim olmamış ve kültür duraklama fazına girmiştir. Son gün tespit edilen klorofil *a* değeri $180.25 \pm 3 \mu\text{g l}^{-1}$ olarak belirlenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. %50 N Eksik Ortamda *I. affinis galbana* Klorofil *a* Değerleri Değişimi

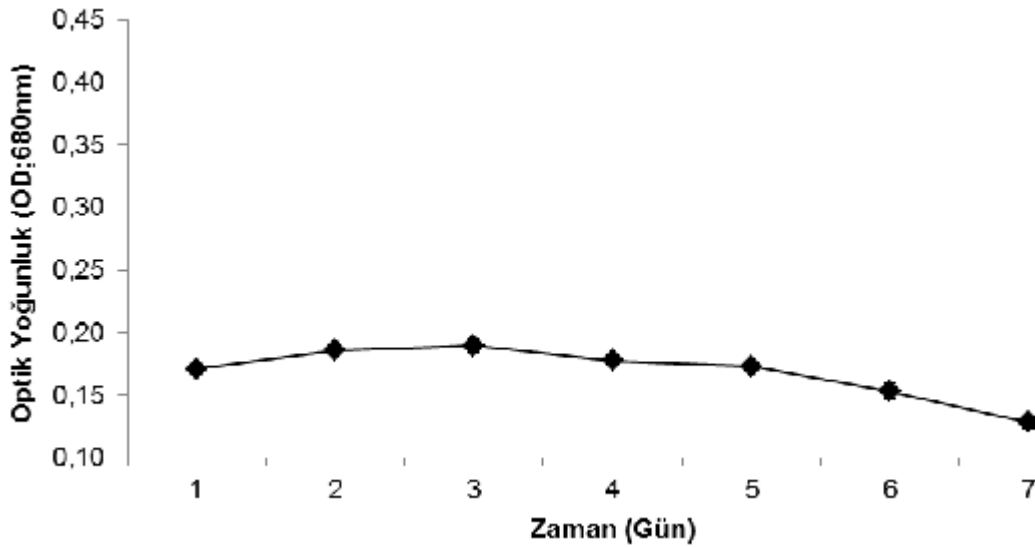
Denemede %50 N eksiltelen gruba ait biyomas miktarları kullanılarak ilk güne göre PV oranları hesaplanmış; buna göre en yüksek PV oranı denemenin 3 ve 4'üncü gününde $0.043 \text{g l}^{-1} \text{g}^{-1} \text{g}^{-1}$ olarak tespit edilirken son gün PV değeri $0.001 \text{g l}^{-1} \text{g}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. %50 N Eksik Ortamda *I. affinis galbana* Hacimsel Biyomas Çıkış Oranları Değişimi

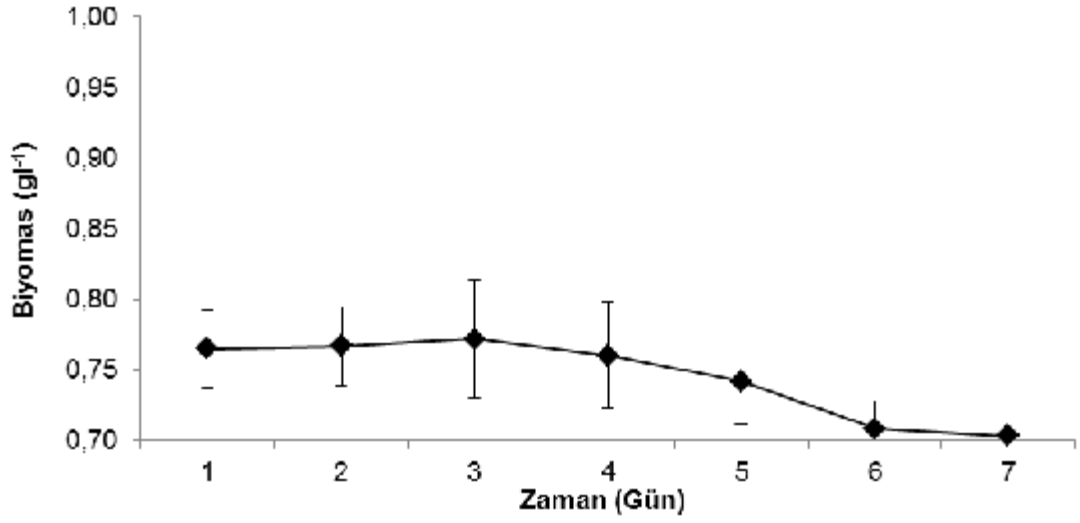
4.1.1.3. *I. affinis galbana*'nın %100 N Eksiltelen Kültüründe Büyüme Değerleri ve Lipid İçeriği

Bu deneme grubunda besi yeri olarak F/2 kültür ortamı kullanılmış ancak besi yerindeki N kaynağı NaNO_3 besi yerinden tamamen uzaklaştırılarak *I. affinis galbana* kültüre alınmıştır. 680nm optik yoğunluklarına göre büyüme fazları belirlenmiştir ve deneme 7 gün sürmüştür. $0.171 \pm 0.002 \text{ OD}_{680}$ optik yoğunluğu ile denemeye başlanmıştır. Bu grup denemede elde edilen değerler, diğer deneme gruplarından elde edilen değerlerden oldukça düşük bulunmuştur. En yüksek optik yoğunluk $0.190 \pm 0.005 \text{ OD}_{680}$ ile denemenin 3'üncü günü tespit edilmiştir. Son gün elde edilen değer $0.129 \pm 0.004 \text{ OD}_{680}$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.9).



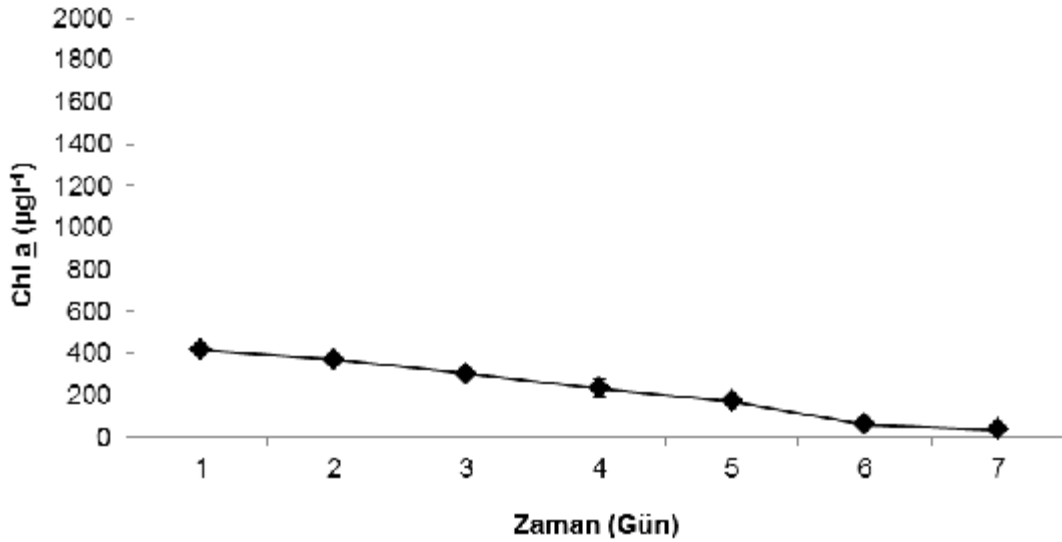
Şekil 4.9. %100 N Eksik Ortamda *I. affinis galbana* Optik Yoğunluk Değişimi

Denemenin başlangıcında biyomas miktarı $0.765 \pm 0.02 \text{ g l}^{-1}$ iken en yüksek biyomas miktarı $0.772 \pm 0.04 \text{ g l}^{-1}$ ile denemenin 3'üncü gününde tespit edilmiştir. Deneme boyunca biyomas miktarında çok fazla bir değişim olmamış, son gün elde edilen biyomas miktarı $0.703 \pm 0.04 \text{ g l}^{-1}$ olarak bulunmuştur. 3'üncü günden itibaren 6'ncı güne kadar azalmalar meydana gelmiş; 6'ncı günde kültür duraklama fazına girmiştir. Denemenin 6'ncı ve 7'inci günlerinde elde edilen biyomas miktarları denemenin, ilk günü elde edilen değerden düşük bulunmuştur (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. %100 N Eksik Ortamda *I. affinis galbana* Biyomas Miktarı Değişimi

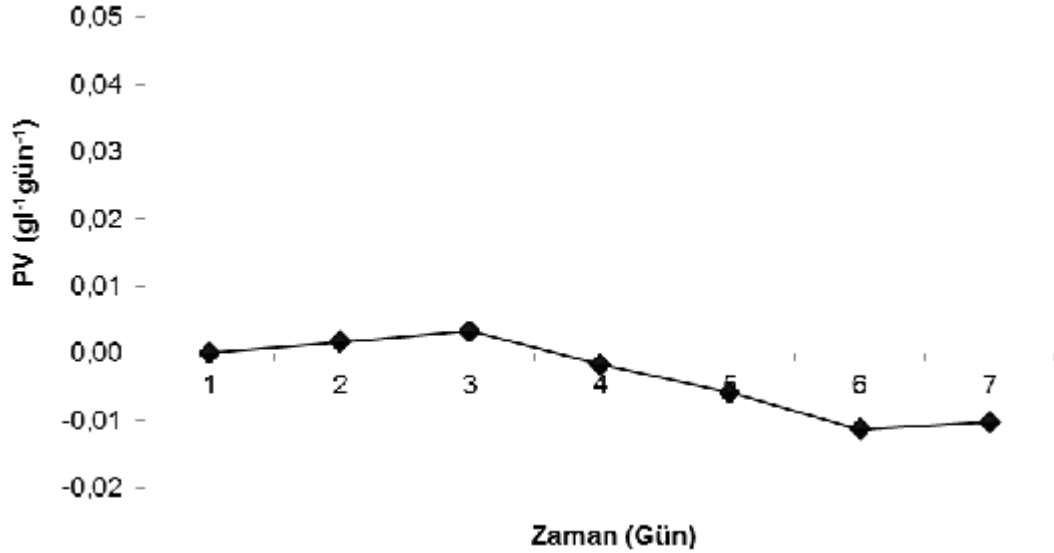
Denemenin başlangıcında $416.86 \pm 2 \mu\text{g l}^{-1}$ olan klorofil *a* denemenin en yüksek değerini göstermekte olup, denemede 6'ncı güne kadar düzenli bir şekilde azalma meydana gelmiş; 6'ncı günde kültür duraklama fazına girmiştir. Denemenin son günü klorofil *a* $36.19 \pm 1 \mu\text{g l}^{-1}$ olmuştur (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. %100 N Eksik Ortamda *I. affinis galbana* Klorofil *a* Değerleri Değişimi

İlk gün elde edilen biyomas miktarları kullanılarak PV oranları hesaplanmış, en yüksek PV değerleri denemenin 3'üncü günü $0.003 \text{g l}^{-1} \text{gün}^{-1}$ olarak tespit

edilmiştir. Denemenin 4'üncü gününden itibaren kültürde bir büyüme gerçekleşmemiş yani üretim meydana gelmemiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. %100 N Eksik Ortamda *I. affinis galbana* Hacimsel Biyomas Çıkış Oranları Değişimi

I. affinis galbana kontrol grubu ve 2 farklı besi ortamında kültüre alınmış ve her gruba ait büyüme parametreleri belirlenmiştir. Uygulanan muamelelerin OD, biyomas, klorofil *a* ve lipid değeri üzerine etkisi istatistiksel olarak belirlenmiş ve farklılık olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$) (Çizelge 4.1). Son gün elde edilen optik yoğunluk ve biyomas miktarlarına göre en yüksek değer kontrol grubunda elde edilmiş ve diğer 2 grup birbiriyle istatistiki olarak benzerlik göstermiştir. Klorofil *a* miktarı ise %100 N eksilmesi yapılan grupta en düşük, en yüksek kontrol grubunda tespit edilmiştir. Denemenin son günü elde edilen lipid değerleri de istatistiki olarak farklı bulunmuş; en yüksek lipid eldesi %50 N eksilmesi yapılan grupta 30.91 ± 1 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1. *I. affinis galbana* Kültürlerinde Büyüme Değerleri ve Lipid İçeriklerinin Karşılaştırılması

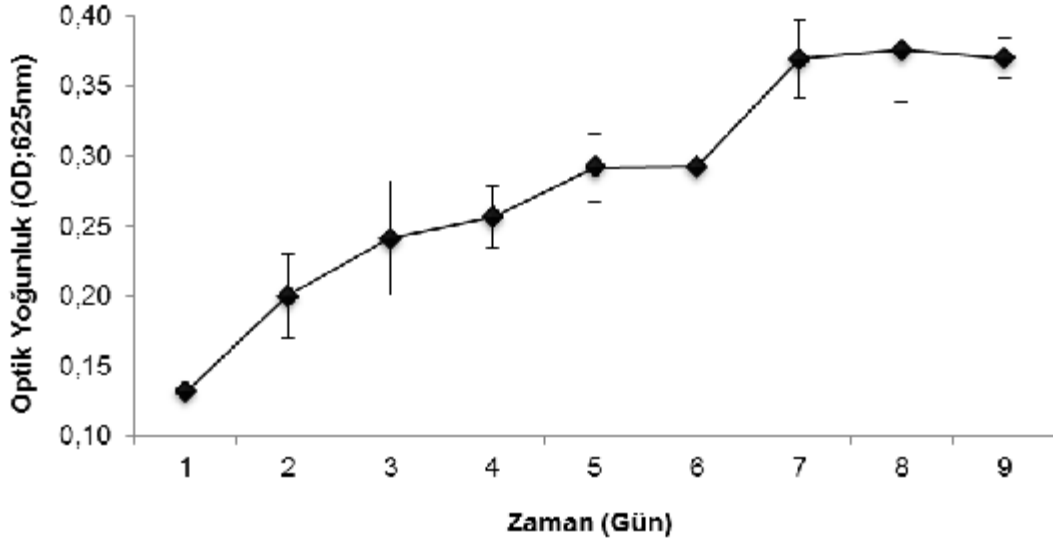
	Kontrol	%50 N(-)	%100 N(-)
Parametre			
(Son gün)			
OD ₆₈₀	0.381±0.02 ^a	0.137±0.005 ^b	0.129±0.004 ^b
Biyomas (gl ⁻¹)	0.900±0.02 ^a	0.755±0.03 ^b	0.703±0.04 ^b
Klorofil a (µgl ⁻¹)	1894.90±1 ^a	180.25±3 ^b	36.19±1 ^c
Lipid (%)	15.05±0.6 ^a	30.91±1 ^b	23.90±1 ^c

^{a, b, c} harfleriyle sembolize edilen sütunlar ortalamaları arasında istatistiksel olarak fark vardır (p<0.05), (n=3).

4.1.2. *Phaeodactylum tricornutum*

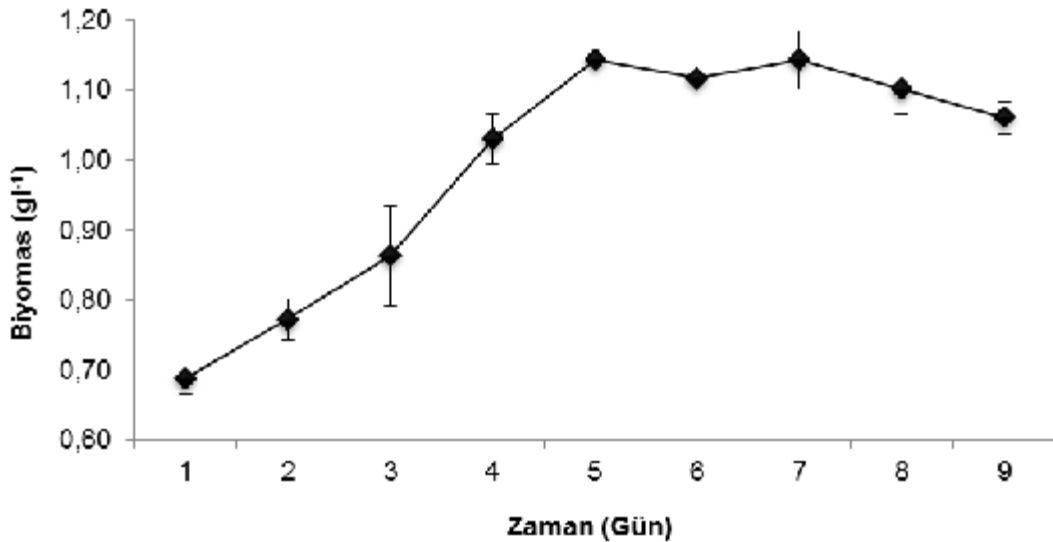
4.1.2.1. *P. tricornutum* Kontrol Grubu Büyüme Değerleri ve Lipid İçeriği

Bu denemede Si-F/2 besi ortamı kullanılmış ve *P. tricornutum* büyüme özellikleri araştırılmıştır. 625nm optik yoğunluk değerlerine göre büyüme fazları belirlenmeye çalışılmış ve kontrol grubuna ait deneme 9 gün sürmüştür. 0.132±0.001 OD₆₂₅ optik yoğunluk ile denemeye başlanmıştır. Optik yoğunlukları değişimine bakıldığında kültür denemenin 5'inci gününe kadar artmış; 5 ve 6'ıncı günlerde duraklamaya girmiş ancak 7'inci günde tekrar bir artış meydana gelmiştir. 7'inci günden 9'uncu güne kadar optik yoğunluk değerlerinde fazla bir değişim olmamış, en yüksek optik yoğunluk denemenin 8'inci günü 0.376±0.03 OD₆₂₅ ile elde edilmiş ve denemenin son günü 0.370±0.01 OD₆₂₅ olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.13).



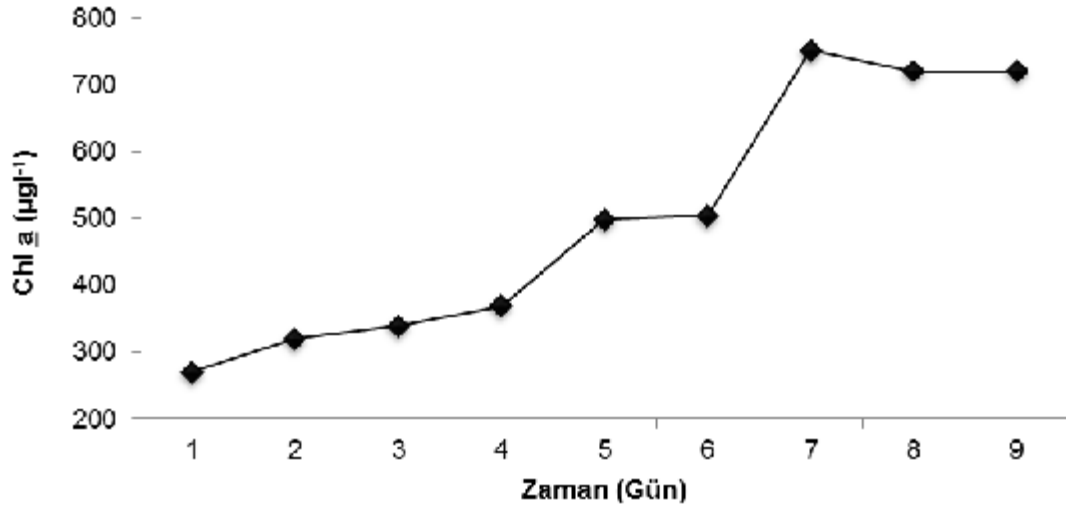
Şekil 4.13. Kontrol Grubu *P. tricornutum* Optik Yoğunluk Değişimi

Denemenin başlangıcında biyomas miktarı $0.688 \pm 0.02 \text{gl}^{-1}$ iken, en yüksek biyomas 5 ve 7'inci günde $1.143 \pm 0.04 \text{gl}^{-1}$ ile elde edilmiştir. Deneme boyunca artış gösteren biyomas miktarı 5'inci günde duraklama fazına girmiştir. Denemenin 8 ve 9'uncu günlerinde azalmalar göstermiş olup, son gün elde edilen biyomas miktarı $1.061 \pm 0.02 \text{gl}^{-1}$ belirlenmiştir (Şekil 4.14).



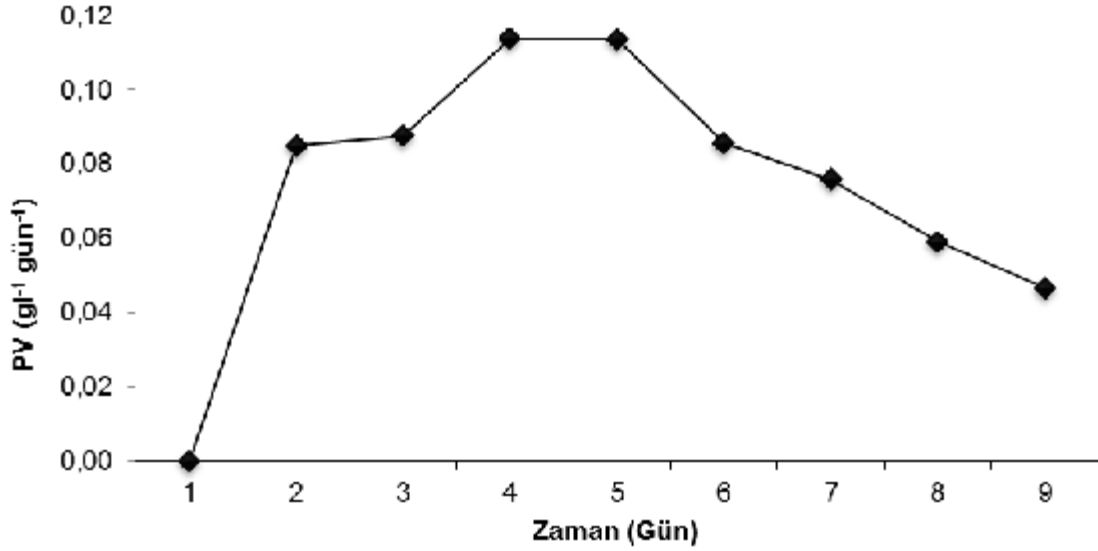
Şekil 4.14. Kontrol Grubu *P. tricornutum* Biyomas Miktarı Değişimi

Kontrol grubuna ait olan denemede klorofil *a* değerleri denemenin 5'inci gününe kadar artış göstermiş olup, başlangıç klorofil *a* değeri $270.13 \pm 3 \mu\text{g l}^{-1}$ iken, en yüksek değer $751.57 \pm 9 \mu\text{g l}^{-1}$ ile 7. günde tespit edilmiştir. Son gün $719.87 \pm 1 \mu\text{g l}^{-1}$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Kontrol Grubu *P. tricornutum* Klorofil *a* Değerleri Değişimi

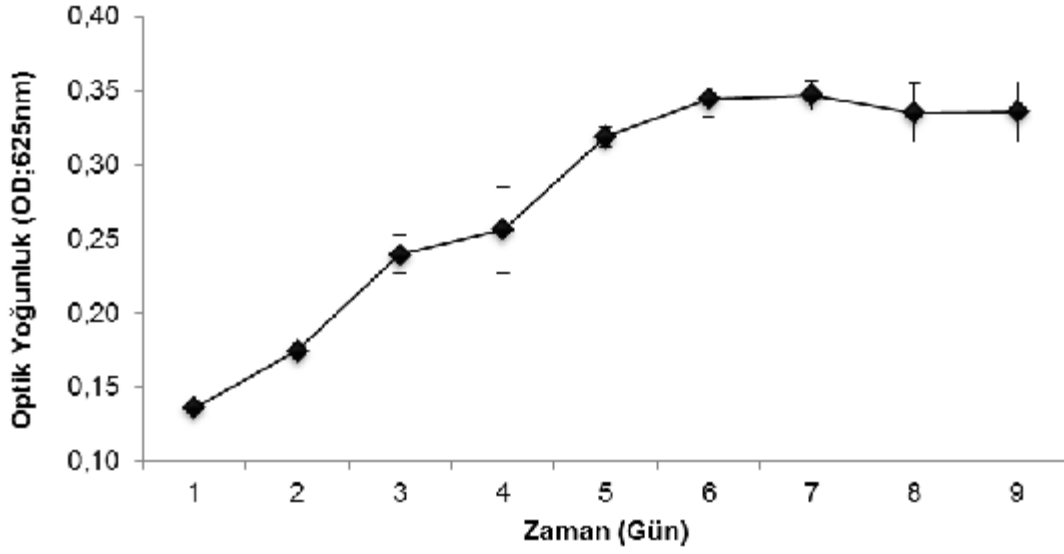
Denemede kontrol grubuna ait ilk gün biyomas miktarları kullanılarak PV oranları hesaplanmıştır. Buna göre en yüksek PV çıkış oranı denemenin 4 ve 5'inci gününde $0.114 \text{g l}^{-1} \text{gün}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir. Son gün elde edilen PV değeri $0.047 \text{g l}^{-1} \text{gün}^{-1}$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Kontrol Grubu *P. tricornutum* Hacimsel Biyomas Çıkış Oranları Değişimi

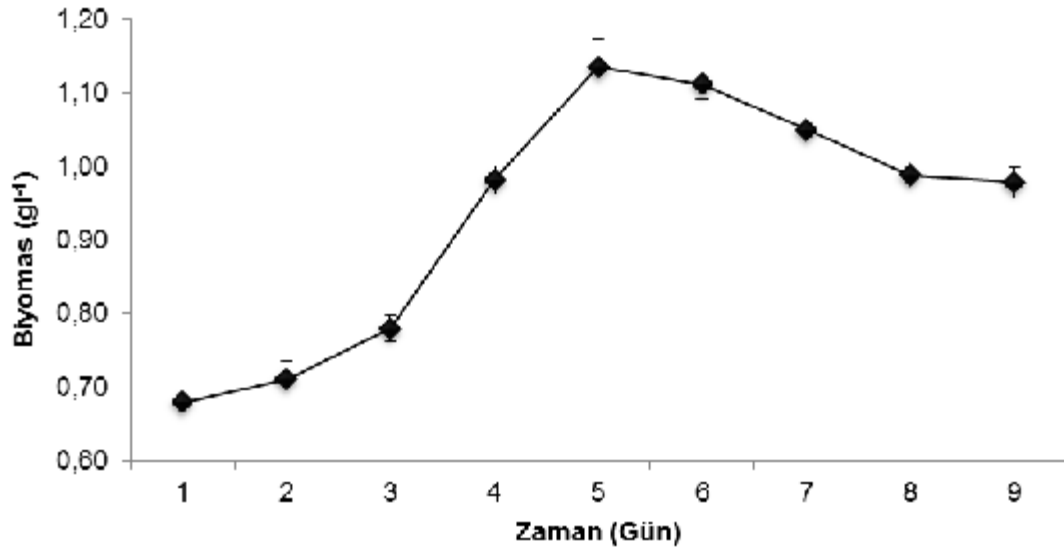
4.1.2.2. *P. tricornutum*'un %50 N Eksiltelen Kültüründe Büyüme Değerleri ve Lipid İçeriği

Bu deneme grubunda besi yeri olarak Si-F/2 kültür ortamı kullanılmış ancak, besi yerindeki N kaynağı olan NaNO₃ %50 oranında azaltılarak besi yeri hazırlanmış ve *P. tricornutum* kültüre alınmıştır. Deneme 9 gün sürmüştür. 625nm optik yoğunluklarına göre büyüme fazları belirlenmiş ve denemeye 0.136±0.003 OD₆₂₅ optik yoğunluk ile başlanmıştır. Optik yoğunlukları bakıldığında denemenin 7'inci gününe kadar artış gözlenerek en yüksek optik yoğunluğa (0.347±0.01 OD₆₂₅) ulaşılmış ve 7'inci günden itibaren azalışlar meydana gelmiştir. Son gün elde edilen optik yoğunluk 0.336±0.02 OD₆₂₅ olarak bulunmuştur (Şekil 4.17).



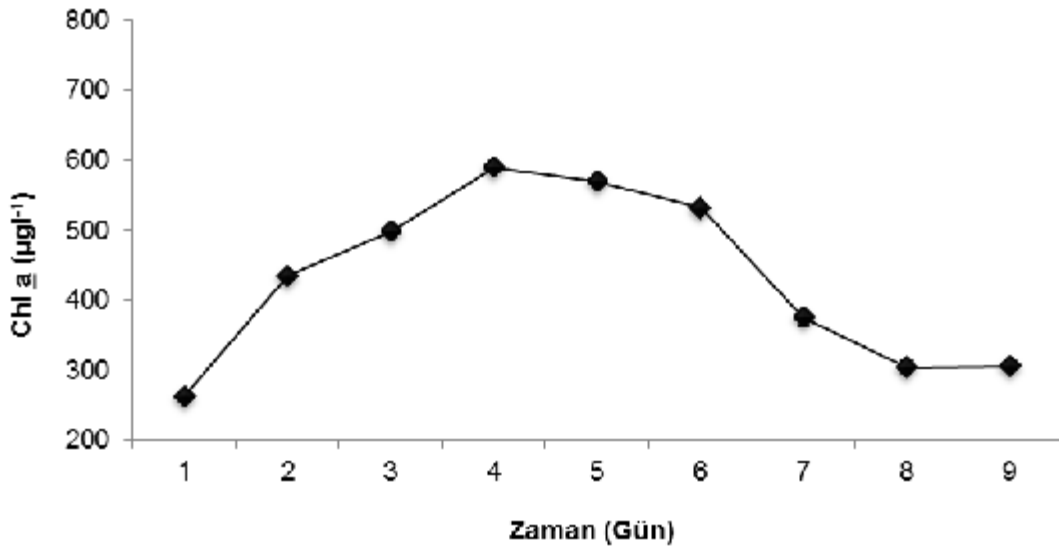
Şekil 4.17. %50 N Eksik Ortamda *P. tricornutum* Optik Yoğunluk Değişimi

Denemenin başlangıcında biyomas miktarı $0.680 \pm 0.02 \text{gl}^{-1}$ iken en yüksek biyomas 5'inci günde $1.135 \pm 0.03 \text{gl}^{-1}$ ile elde edilmiştir. Denemenin 5'inci gününe kadar artışlar olmuş; bu günden itibaren biyomas miktarında azalmalar meydana gelmiş, son gün biyomas miktarı $0.978 \pm 0.02 \text{gl}^{-1}$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.18).



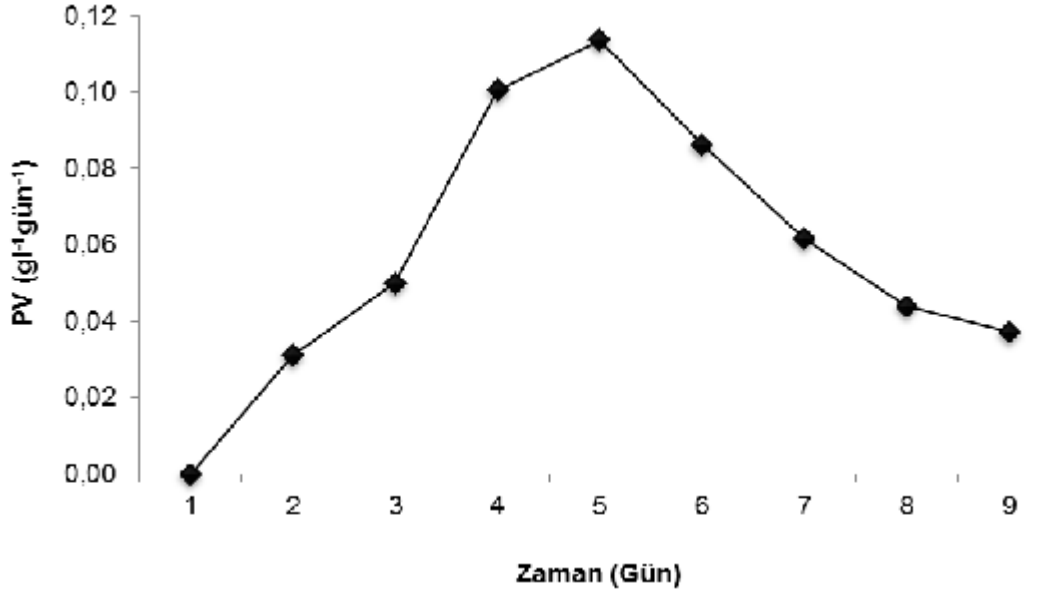
Şekil 4.18. %50 N Eksik Ortamda *P. tricornutum* Biyomas Miktarı Değişimi

Denemenin başlangıcında klorofil *a* miktarı $262.79 \pm 2 \mu\text{g l}^{-1}$ iken denemenin 4'üncü günü en yüksek klorofil *a* değerine ulaşmıştır ($590.02 \pm 3 \mu\text{g l}^{-1}$). 4'üncü günden itibaren klorofil *a* değerlerinde azalmalar meydana gelmiş; 8 ve 9'uncu günde duraklama fazına girmiştir. Son gün klorofil *a* değeri $306.45 \pm 3 \mu\text{g l}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. %50 N Eksik Ortamda *P. tricornutum* Klorofil *a* Değerleri Değişimi

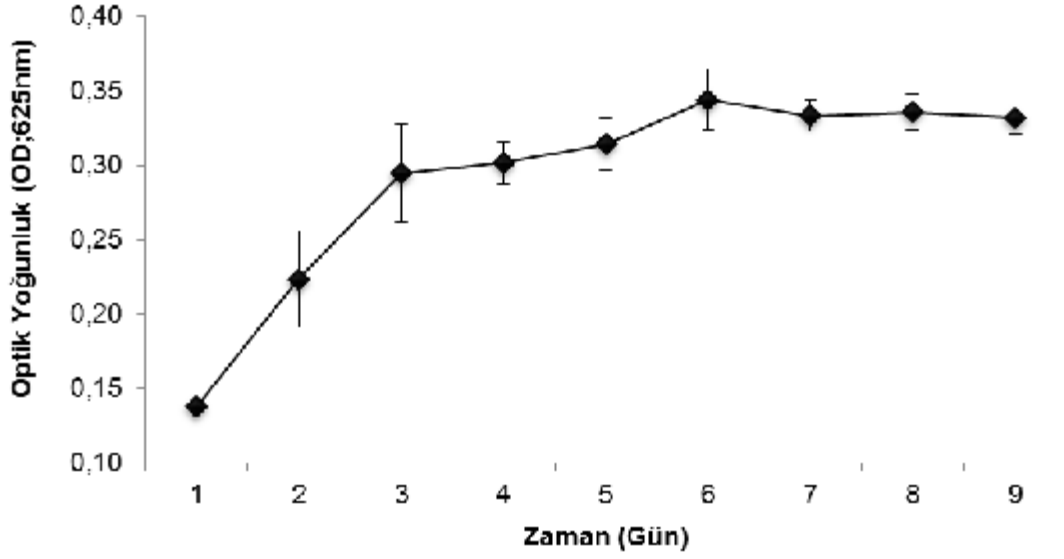
İlk güne ait biyomas miktarları kullanılarak hesaplanan PV çıkış oranları sürekli artış göstererek en yüksek değerine $0.114 \text{ g l}^{-1} \text{ gün}^{-1}$ ile denemenin 5'inci gününde ulaşmıştır. Denemenin 6'ıncı gününden itibaren üretimde düşüşler meydana gelmiş ve son gün PV değeri $0.037 \text{ g l}^{-1} \text{ gün}^{-1}$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. %50 N Eksik Ortamda *P. tricornutum* Hacimsel Biyomas Çıkış Oranları Değişimi

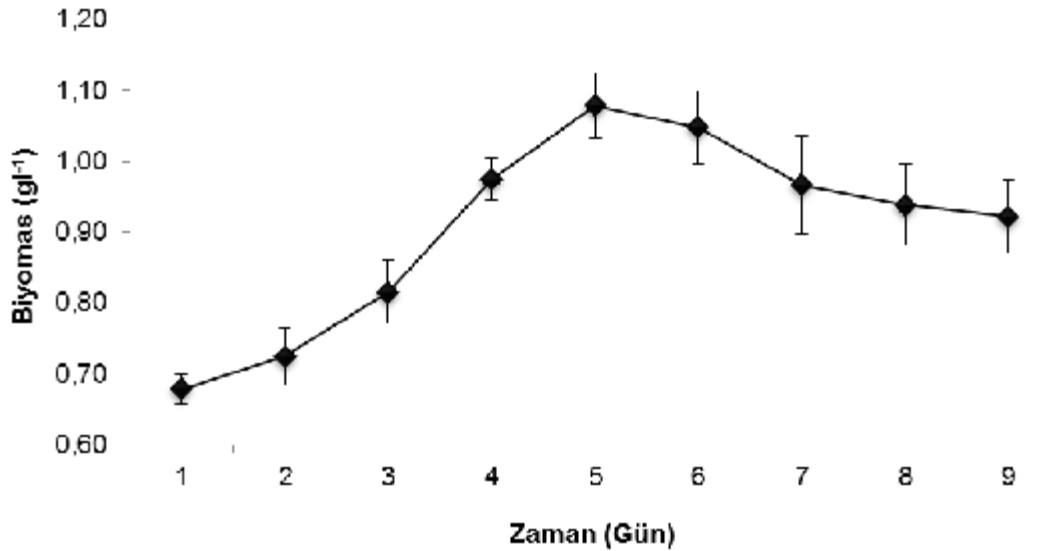
4.1.2.3. *P. tricornutum*'un %100 N Eksiltelen Kültüründe Büyüme Değerleri ve Lipid İçeriği

Bu deneme grubunda besi yeri olarak Si-F/2 kültür ortamı kullanılmış ancak, besi yerindeki N kaynağı olan NaNO₃ %100 oranında azaltılarak besi yeri hazırlanmış ve *P. tricornutum* kültüre alınmıştır. 625nm optik yoğunluk değerleri belirlenerek büyüme fazları belirlenmeye çalışılmış; başlangıç optik yoğunluk 0.138±0.003 OD₆₂₅ olan deneme 9 gün sürmüştür. Optik yoğunluklarına bakıldığında denemenin 6'ncı günü en yüksek değerine (0.344±0.02 OD₆₂₅) ulaşılmış ve 6. günden itibaren azalışlar meydana gelerek kültür duraklama fazına girmiştir. Son gün elde edilen optik yoğunluk 0.332±0.01 OD₆₂₅ olarak bulunmuştur (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. %100 N Eksik Ortamda *P. tricornutum* Optik Yoğunluk Değişimi

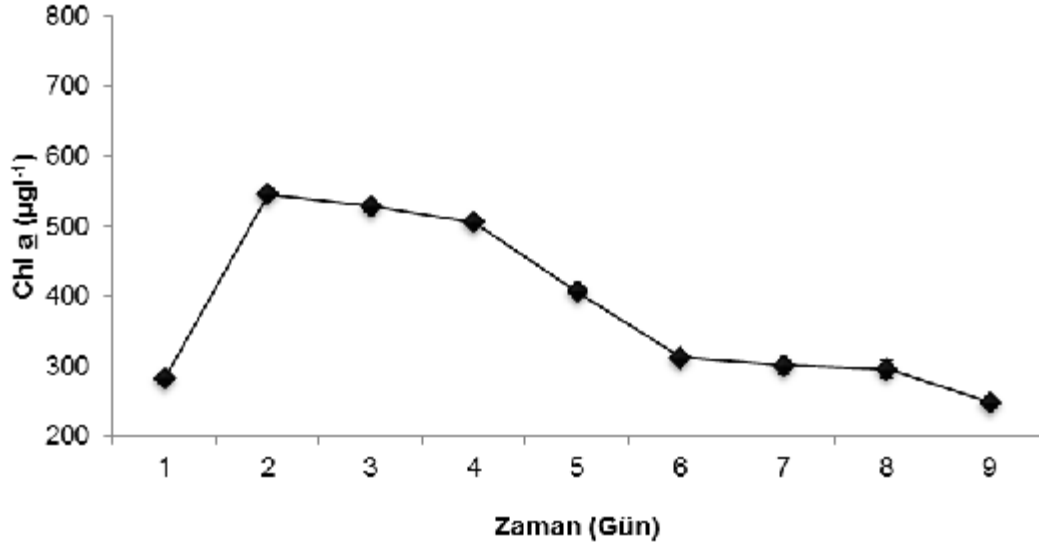
İlk gün biyomas miktarı $0.678 \pm 0.02 \text{ g l}^{-1}$ olan denemede en yüksek biyomas 5'inci günde $1.079 \pm 0.04 \text{ g l}^{-1}$ ile elde edilmiştir. 5'inci günden itibaren azalmalar meydana gelmiş ve son gün biyomas miktarı $0.922 \pm 0.05 \text{ g l}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. %100 N Eksik Ortamda *P. tricornutum* Biyomas Miktarı Değişimi

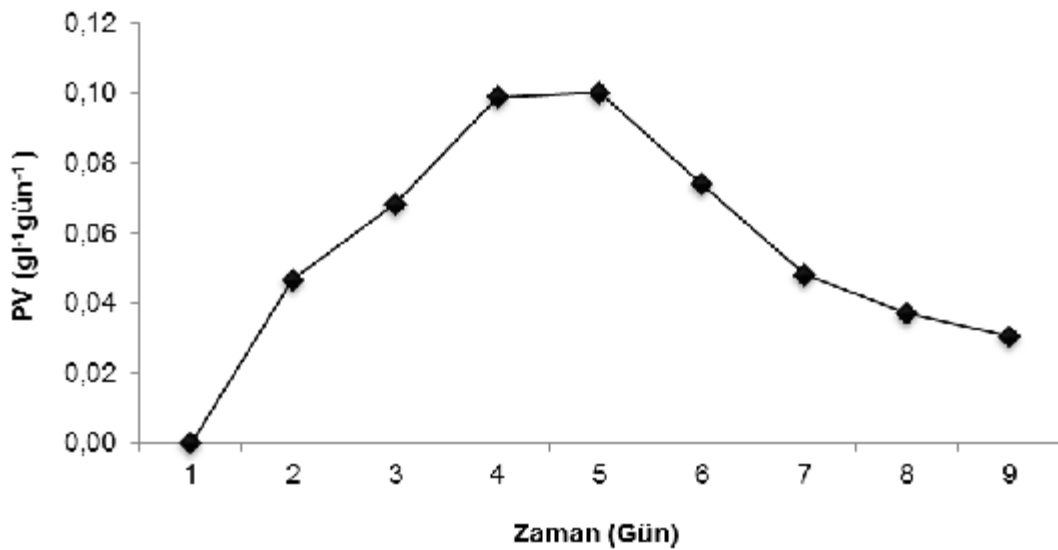
Başlangıç klorofil *a* değeri $281.94 \pm 2 \mu \text{g l}^{-1}$ olan deneme grubunun en yüksek klorofil *a* değerine $545.92 \pm 3 \mu \text{g l}^{-1}$ ile 2'inci günde ulaşılmıştır. 2'inci günden itibaren

düzenli bir azalış gösteren grupta, 6'ncı gün kültür duraklama fazına girmiştir. Son gün klorofil *a* değeri $248.13 \pm 5 \mu\text{g l}^{-1}$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. %100 N Eksik Ortamda *P. tricornutum* Klorofil *a* Değerleri Değişimi

Denemede %100 N eksiltelen gruba ait ilk gün biyomas miktarları kullanılarak hesaplanan PV en yüksek çıkış oranı 5'inci günde $0.100 \text{ g l}^{-1} \text{ gün}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Denemenin 6'ncı gününden itibaren PV değerlerinde azalmalar meydana gelmiş ve son gün PV çıkış oranı $0.031 \text{ g l}^{-1} \text{ gün}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. %100 N Eksik Ortamda *P. tricornutum* Hacimsel Biyomas Çıkış Oranları Değişimi

P. tricornutum kontrol grubu ve 2 farklı besi ortamında kültüre alınmış ve her gruba ait büyüme parametreleri belirlenmiştir. Uygulanan muamelelerin OD üzerine etkisi istatistiksel olarak farklılık yaratmamış ancak, biyomas, klorofil *a* ve lipid değerleri üzerine etkisi istatistiksel olarak farklılık yaratmıştır ($p<0.05$) (Çizelge 4.2). elde edilen son gün verilerine göre optik yoğunluklar 3 grupta da istatistiki olarak benzerlik gösterirken; biyomas miktarları karşılaştırıldığında en yüksek biyomasın kontrol grubunda elde edildiği ve diğer 2 grupta ise istatistiki olarak benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Klorofil *a* miktarları N eksiltme oranı arttıkça azalmalar göstermiş ve 3 grup birbirinden istatistiki olarak farklı bulunmuştur. En yüksek lipid oranı 30.18 ± 1 ile 50 N eksiltelen grupta saptanmıştır.

Çizelge 4.2. *P. tricornutum* Kültürlerinde Büyüme Değerleri ve Lipid İçeriklerinin Karşılaştırılması

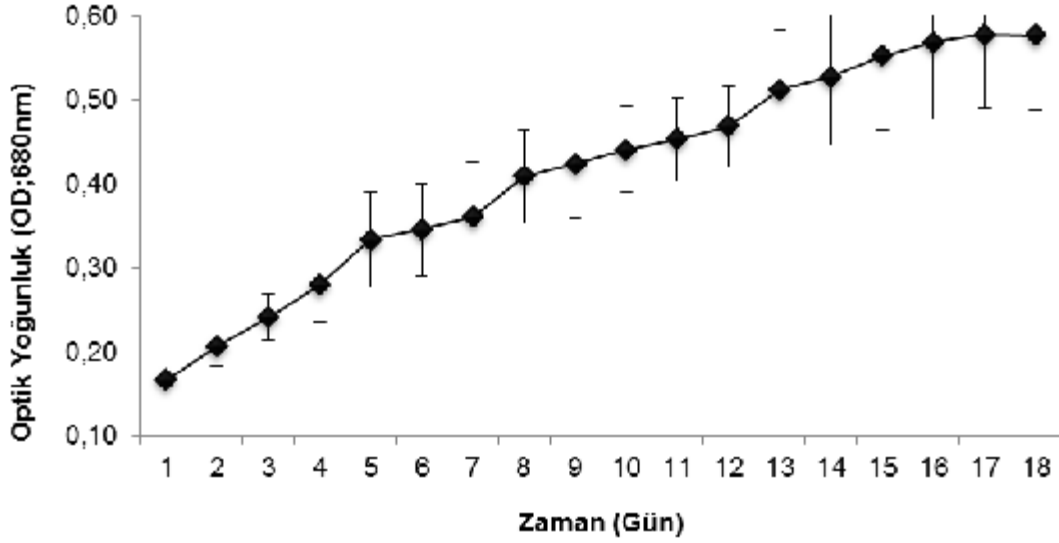
	Kontrol	%50 N(-)	%100 N(-)
Parametre			
(Son gün)			
OD ₆₂₅	0.370±0.01 ^a	0.336±0.02 ^a	0.332±0.01 ^a
Biyomas (g l ⁻¹)	1.061±0.02 ^a	0.978±0.02 ^b	0.922±0.05 ^b
Klorofil <i>a</i> (µg l ⁻¹)	719.87±1 ^a	306.45±3 ^b	248.13±5 ^c
Lipid (%)	20.50±0.7 ^c	30.18±1 ^a	24.03±0.1 ^b

^{a, b, c} harfleriyle sembolize edilen sütunlar ortalamaları arasında istatistiksel olarak fark vardır ($p<0.05$), (n=3).

4.1.3. *Porphyridium cruentum*

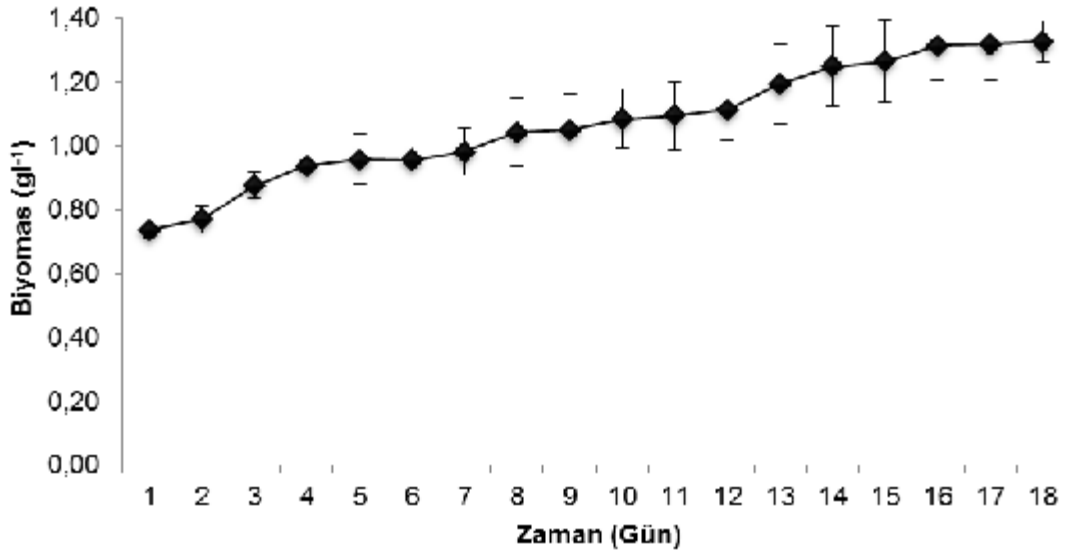
4.1.3.1. *P. cruentum* Kontrol Grubu Büyüme Değerleri ve Lipid İçeriği

Bu denemede F/2 besi ortamı kullanılmış ve *P. cruentum* büyüme özellikleri araştırılmıştır. Kontrol grubuna ait deneme 18 gün sürmüştür. 680nm optik yoğunlukları değişimine bakıldığında deneme boyunca düzenli bir artış meydana gelmiş, başlangıç optik yoğunluğu 0.167 ± 0.007 OD₆₈₀ iken, denemenin son günü 0.577 ± 0.08 OD₆₈₀ olarak tespit edilmiştir. En yüksek optik yoğunluğu 0.578 ± 0.08 OD₆₈₀ ile denemenin 17'inci günü elde edilmiştir. Denemenin 17 ve 18'inci günlerinde kültür duraklama fazına girmiştir (Şekil 4.25).



Şekil.4.25. Kontrol Grubu *P. cruentum* Optik Yoğunluk Değişimi

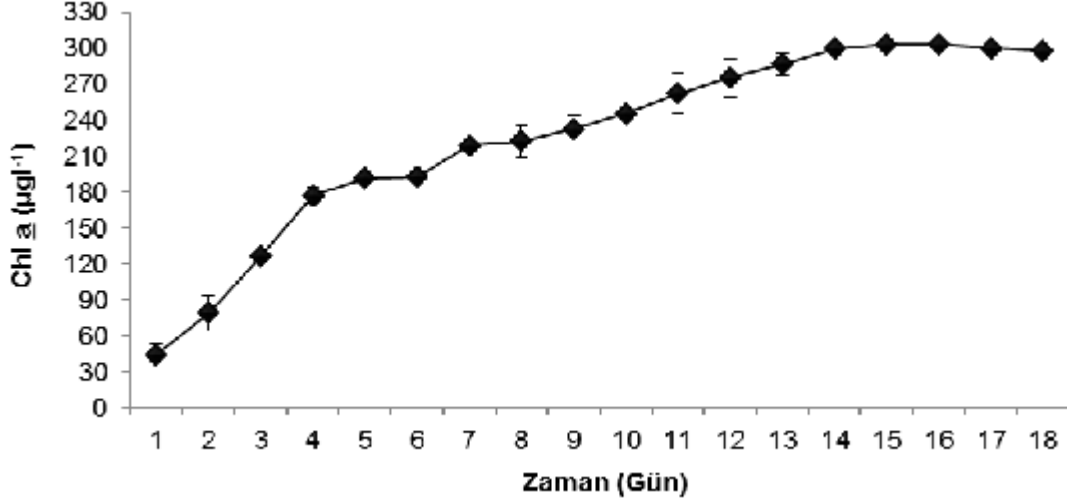
0.737±0.02gl⁻¹ ile başlayan kontrol grubuna ait biyomas miktarı düzenli bir artış göstermiş ve denemenin son günü biyomas miktarı 1.327±0.06gl⁻¹ olarak bulunmuştur. Denemenin 16, 17 ve 18'inci günlerinde deneme duraklama fazına girmiştir (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. Kontrol Grubu *P. cruentum* Biyomas Miktarı Değişimi

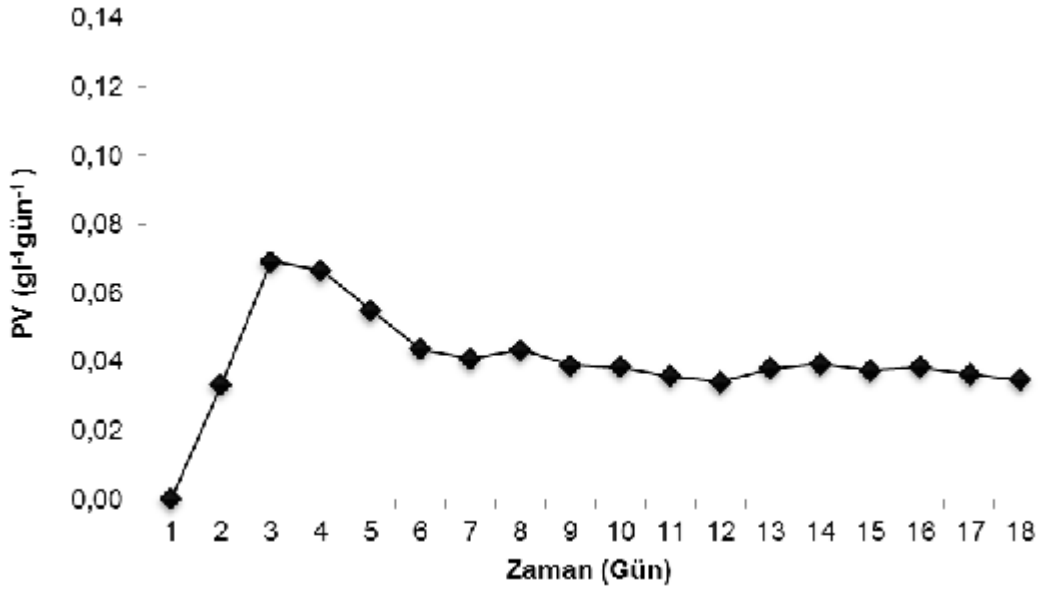
Başlangıç klorofil *a* miktarı 44.58±9µgl⁻¹ olan denemede kısmen düzenli bir artış gözlenmiş olup; denemenin son günü bu değer 298.23±4µgl⁻¹ olarak

bulunmuştur. En yüksek değer $303.57 \pm 2 \mu\text{gl}^{-1}$ ile denemenin 15'inci günü elde edilmiş ve kültür duraklama fazına girmiştir. (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. Kontrol Grubu *P. cruentum* Klorofil a Değerleri Değişimi

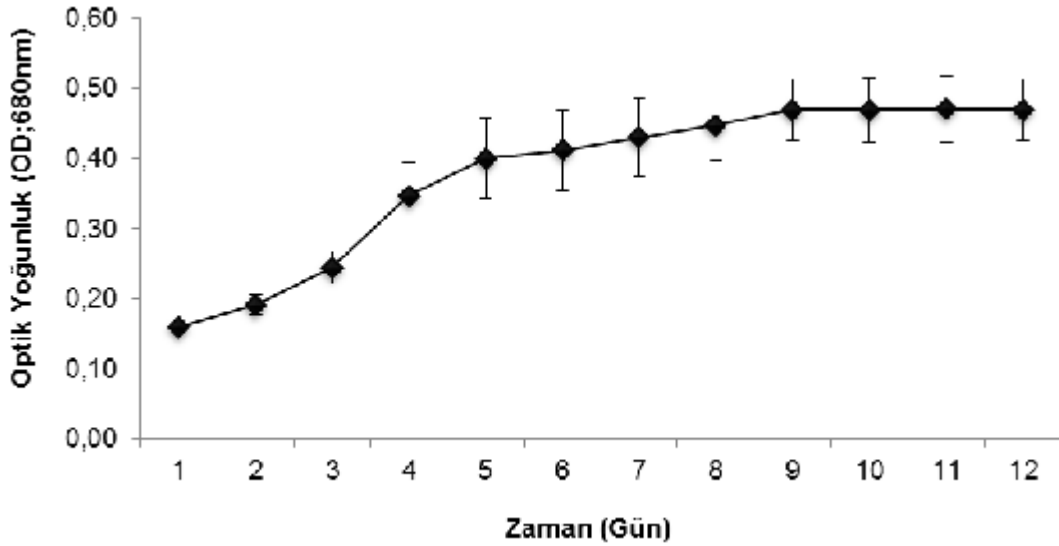
İlk gün elde edilen biyomas miktarları dikkate alınarak hesaplanan kontrol grubuna ait PV çıkış oranları en yüksek $0.069 \text{gl}^{-1}\text{gün}^{-1}$ olarak denemenin 3'üncü gününde elde edilmiştir. Son gün PV çıkış oranı $0.035 \text{gl}^{-1}\text{gün}^{-1}$ olarak belirlenmiştir (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. Kontrol Grubu *P. cruentum* Hacimsel Biyomas Çıkış Oranları Değişimi

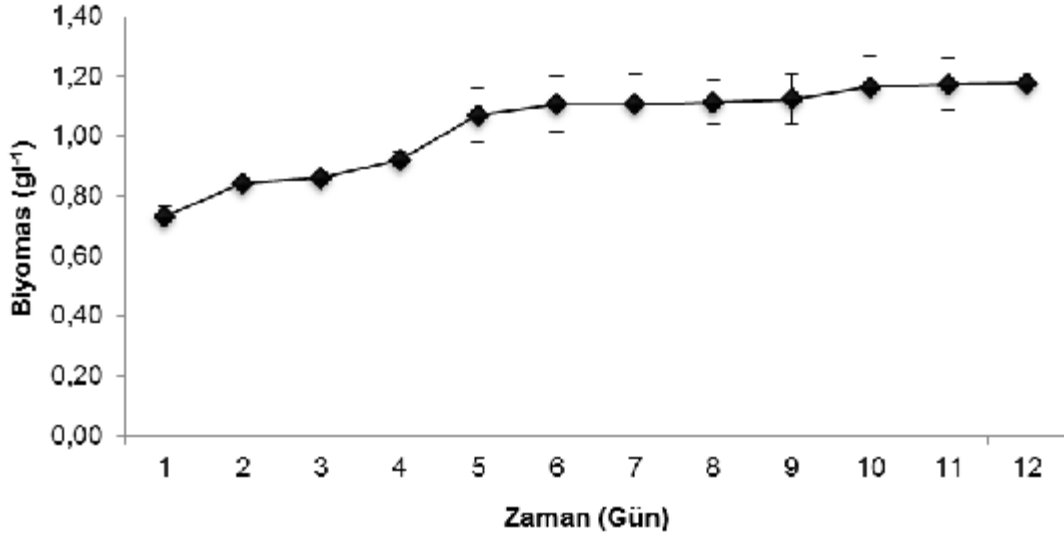
4.1.3.2. *P. cruentum*'un %50 N Eksiltelen Kültüründe Büyüme Değerleri ve Lipid İçeriği

Bu deneme grubunda besi yeri olarak F/2 kültür ortamı kullanılmış ancak, besi yerindeki N kaynağı olan NaNO_3 %50 oranında azaltılarak besi yeri hazırlanmış ve *P. cruentum* kültüre alınmıştır. 680nm optik yoğunluklarına göre büyüme fazları belirlenmiş ve %50 N eksilmesi uygulanan deneme 12 gün sürmüştür. Başlangıç optik yoğunluğu $0.161 \pm 0.001 \text{ OD}_{680}$ olan denemenin ilk 5 günü nisbeten daha hızlı bir artış gözlenmiş ve son gün optik yoğunluğu $0.469 \pm 0.05 \text{ OD}_{680}$ olarak bulunmuştur. Deneme 9'uncu günde duraklama fazına girmiş olup; en yüksek optik yoğunluk $0.470 \pm 0.05 \text{ OD}_{680}$ ile denemenin 11'inci günü elde edilmiştir. (Şekil 4.29).



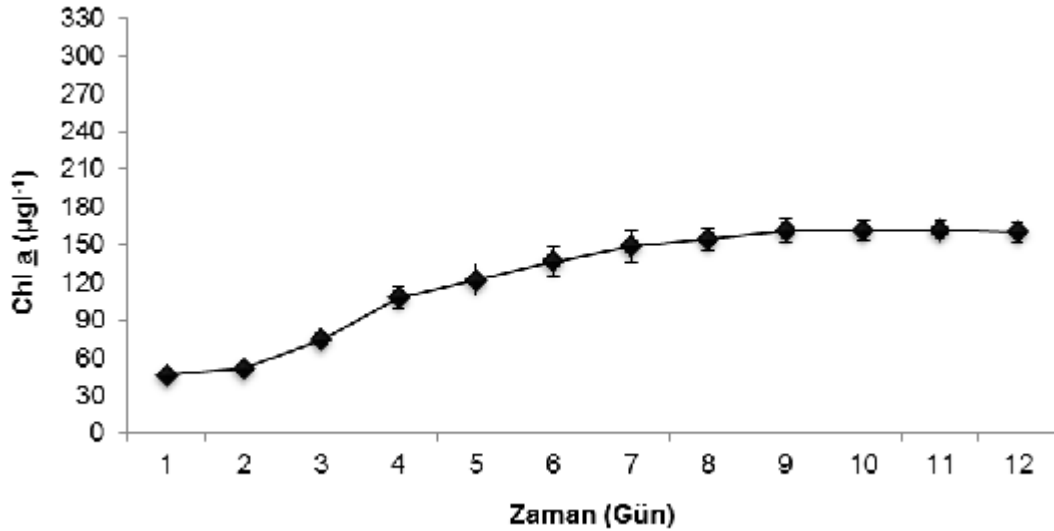
Şekil 4.29. %50 N Eksik Ortamda *P. cruentum* Optik Yoğunluk Değişimi

Denemenin ilk gün biyomas miktarı $0.732 \pm 0.03 \text{ g l}^{-1}$ iken; 5'inci güne kadar daha düzenli bir artış göstermiş ve 12 günlük denemenin sonunda en yüksek biyomas miktarına $1.177 \pm 0.01 \text{ g l}^{-1}$ ile ulaşılmıştır. Denemenin 10'uncu gününde kültür duraklama fazına girmiştir (Şekil 4.30).



Şekil 4.30. %50 N Eksik Ortamda *P. cruentum* Biyomas Miktarı Değişimi

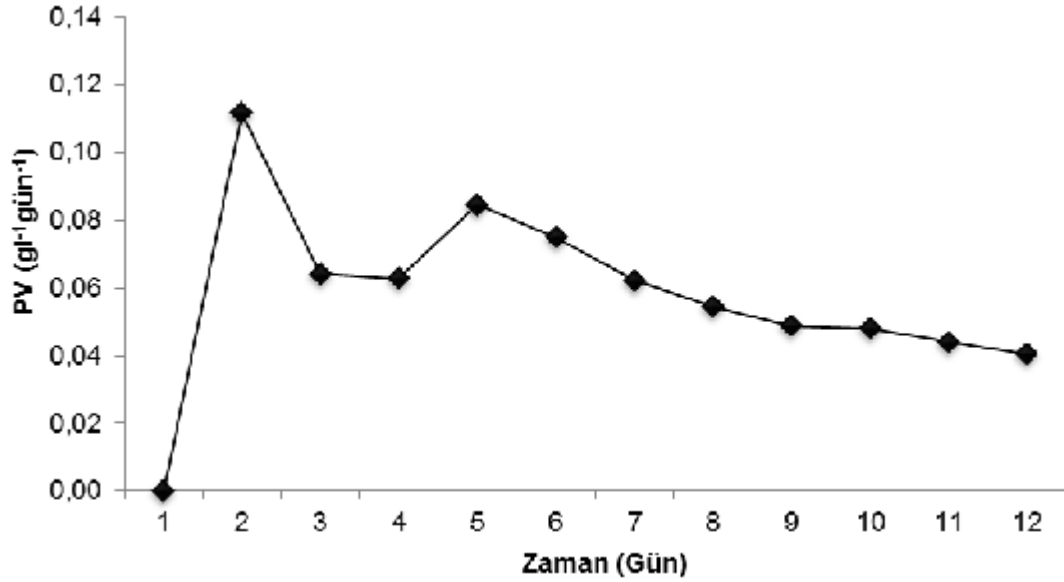
Başlangıç klorofil *a* değeri $46.37 \pm 2 \mu\text{gl}^{-1}$ olan deneme grubunda düzenli bir artış olmuş, denemenin son günü bu değer $159.71 \pm 7 \mu\text{gl}^{-1}$ olarak bulunmuştur. En yüksek klorofil *a* değerine denemin 11'inci günü $161.51 \pm 7 \mu\text{gl}^{-1}$ ile ulaşılmıştır (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. %50 N Eksik Ortamda *P. cruentum* Klorofil *a* Değerleri Değişimi

Denemeden elde edilen ilk gün biyomas miktarları dikkate alınarak PV değerleri hesaplanmıştır. Denemede elde edilen en yüksek PV değeri denemenin

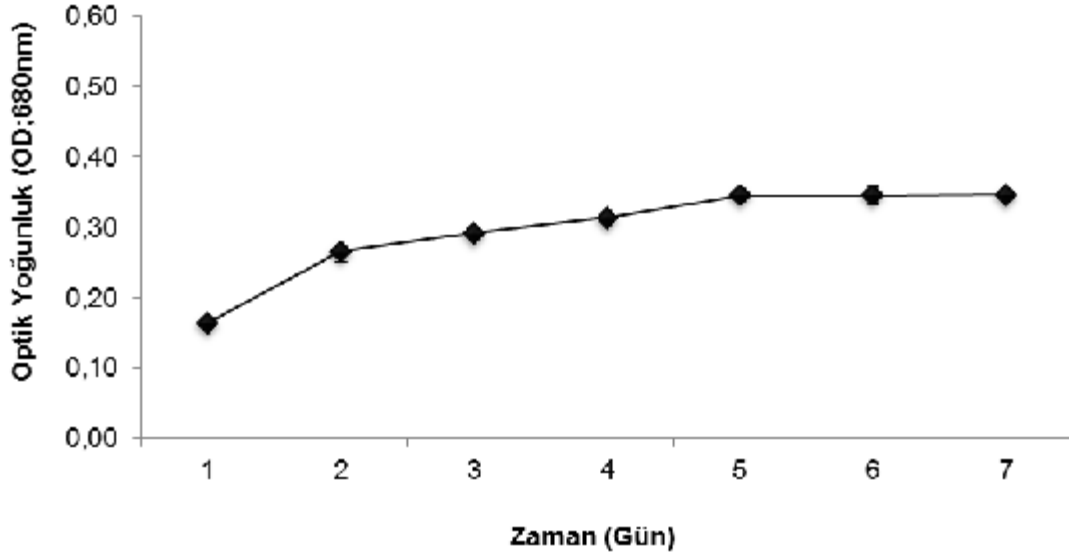
2'inci günü $0.112\text{gl}^{-1}\text{gün}^{-1}$ ile elde edilmiştir. Son gün PV değeri $0.040\text{gl}^{-1}\text{gün}^{-1}$ olarak belirlenmiştir (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. %50 N Eksik Ortamda *P. cruentum* Hacimsel Biyomas Çıkış Oranları Değişimi

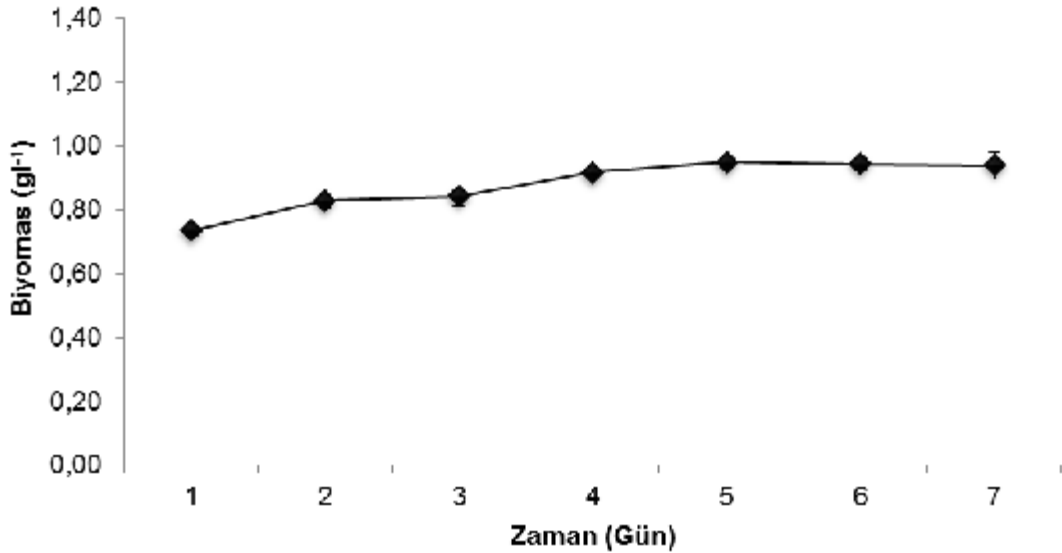
4.1.3.3. *P. cruentum*'un %100 N Eksiltelen Kültüründe Büyüme Değerleri ve Lipid İçeriği

Bu deneme grubunda besi yeri olarak F/2 kültür ortamı kullanılmış ancak, besi yerindeki N kaynağı olan NaNO_3 %100 oranında azaltılarak besi yeri hazırlanmış ve *P. cruentum* kültüre alınmıştır. Deneme 7 gün sürmüştür. Başlangıç optik yoğunluğu 0.165 ± 0.001 OD_{680} olan denemenin son gün yoğunluğu 0.346 ± 0.01 olarak bulunmuştur. Deneme 5'inci günde duraklama fazına girmiştir (Şekil 4.33).



Şekil 4.33. %100 N Eksik Ortamda *P. cruentum* Optik Yoğunluk Değişimi

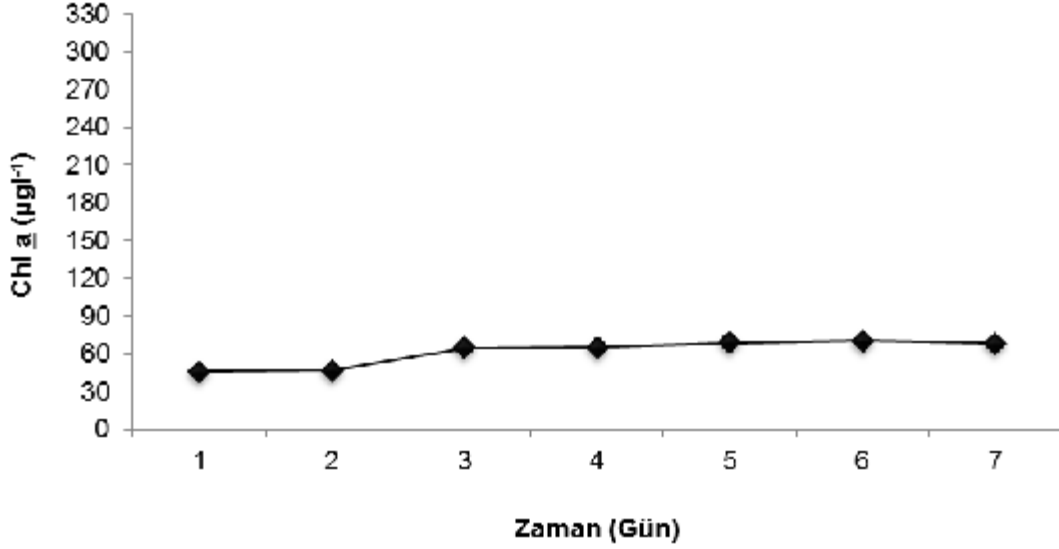
Başlangıç biyomas miktarı $0.733 \pm 0.07 \text{gl}^{-1}$ olan deneme grubunda elde edilen en yüksek biyomas miktarı $0.950 \pm 0.005 \text{gl}^{-1}$ ile 5'inci günde tespit edilmiş ve kültür duraklama fazına girmiştir. 7 gün süren denemenin sonunda ise biyomas miktarı $0.938 \pm 0.04 \text{gl}^{-1}$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.34).



Şekil 4.34. %100 N Eksik Ortamda *P. cruentum* Biyomas Miktarı Değişimi

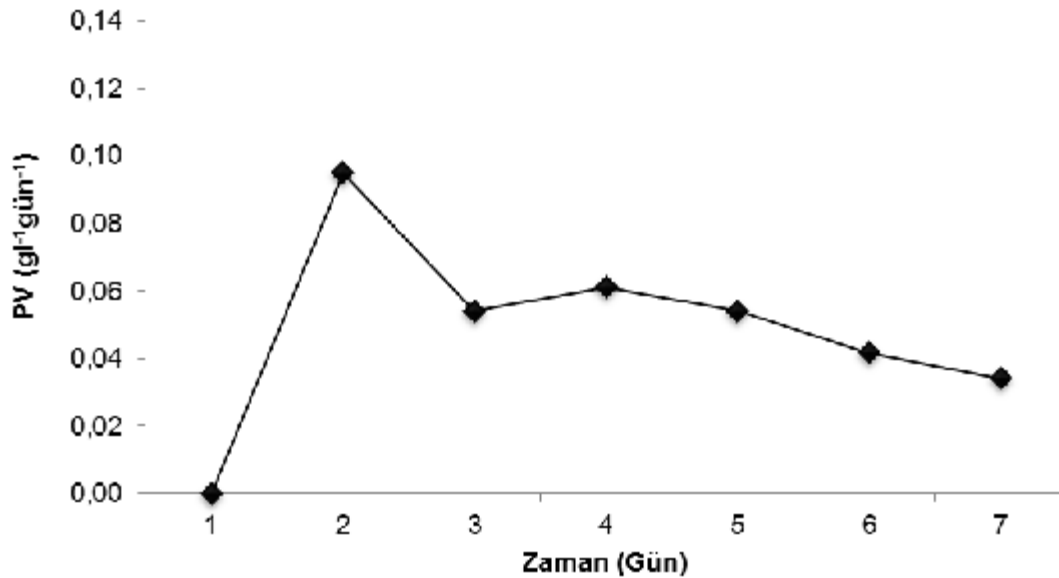
%100 N eksiltelen gruba ait klorofil *a* miktarı denemenin ilk gününden ($45.65 \pm 1 \mu\text{gl}^{-1}$) sonuna kadar fazla bir değişim göstermemiş ve deneme sonunda bu

değer $68.40 \pm 0.7 \mu\text{gl}^{-1}$ olarak bulunmuştur. En yüksek değer denemenin 6'ncı günü $70.34 \pm 0.3 \mu\text{gl}^{-1}$ ile elde edilmiştir (Şekil 4.35).



Şekil 4.35. %100 N Eksik Ortamda *P. cruentum* Klorofil a Değerleri Değişimi

Biyomas miktarları dikkate alınarak hesaplanan PV değerleri denemenin 2'inci günü en yüksek değerine ulaşmış ve $0.095 \text{gl}^{-1}\text{gün}^{-1}$ olarak elde edilmiştir. Deneme sonunda bu değer $0.034 \text{gl}^{-1}\text{gün}^{-1}$ olarak belirlenmiştir (Şekil 4.36).



Şekil 4.36. %100 N Eksik Ortamda *P. cruentum* Hacimsel Biyomas Çıkış Oranları Değişimi

P. cruentum kontrol grubu ve 2 farklı besi ortamında kültüre alınmış ve her gruba ait büyüme parametreleri belirlenmiştir. Uygulanan muamelelerin OD, biyomas, klorofil *a* ve lipid değeri üzerine etkisi istatistiksel olarak belirlenmiş ve farklılık olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$) (Çizelge 4.3). Son gün elde edilen verilere göre en yüksek OD, biyomas ve klorofil *a* değerlerinin kontrol grubunda, en düşük değerlerin ise %100 N eksiltmesi uygulanan grupta elde edildiği saptanmıştır. Lipid miktarı %100 N eksiltmesi uygulanan grupta en yüksek çıkarken, en düşük kontrol grubunda çıkmıştır ($p<0.05$).

Çizelge 4.3. *P. cruentum* Kültürlerinde Büyüme Değerleri ve Lipid İçeriklerinin Karşılaştırılması

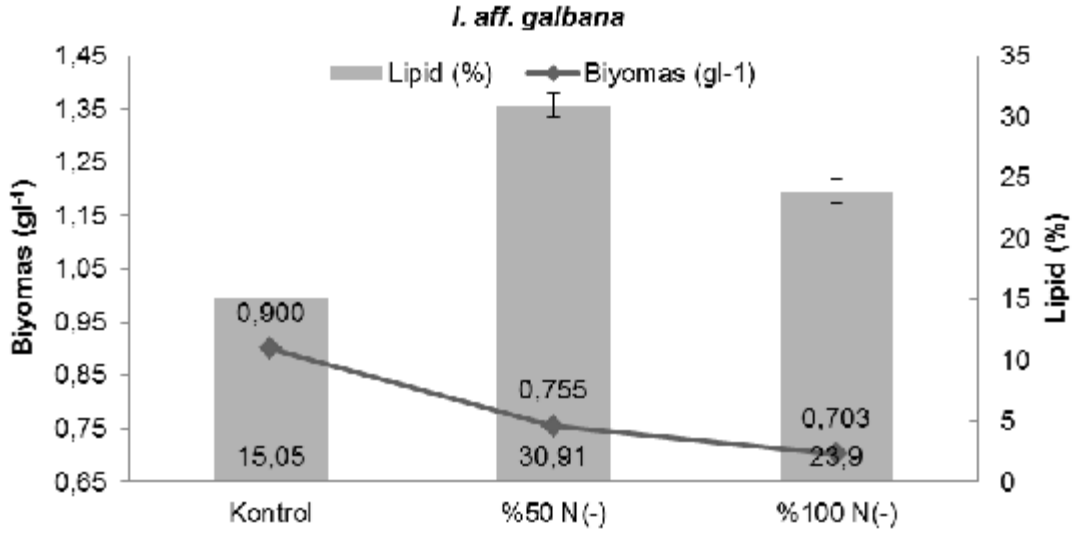
Parametre	Kontrol	%50 N(-)	%100 N(-)
(Son gün)			
OD ₆₈₀	0.577±0.08 ^a	0.469±0.05 ^b	0.346±0.01 ^c
Biyomas (g l ⁻¹)	1.327±0.06 ^a	1.177±0.01 ^b	0.938±0.04 ^c
Klorofil <i>a</i> (µg l ⁻¹)	298.23±4 ^a	159.71±7 ^b	68.40±0.7 ^c
Lipid (%)	7.44±0.2 ^c	9.50±0.9 ^b	11.23±0.4 ^a

^{a, b, c} harfleriyle sembolize edilen sütunlar ortalamaları arasında istatistiksel olarak fark vardır ($p<0.05$), (n=3).

4.1.4. *I. affinis galbana*, *P. tricornutum* ve *P. cruentum* Türlerinde Biyomas ve Lipid içeriklerinin Karşılaştırılması

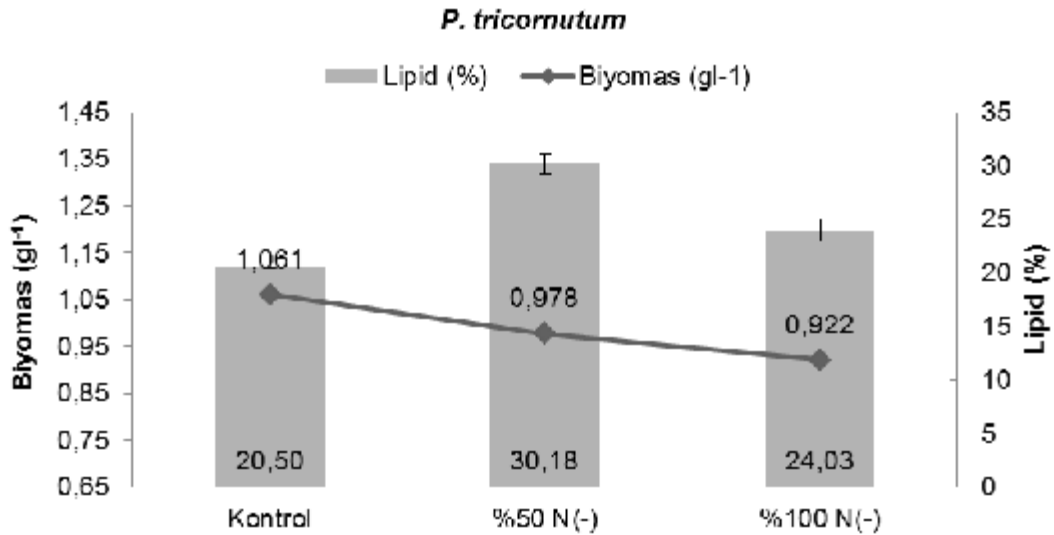
I. affinis galbana, *P. tricornutum* ve *P. cruentum* türlerinin farklı N konsantrasyonlarına göre büyümeleri birbirinden farklı olup; biyomas verimlilikleri ve lipid içerikleri de birbirinden farklı bulunmuştur.

I. affinis galbana türünde biyomas ve lipid miktarları, uygulanan muamele gruplarına göre farklılık göstermiştir. En fazla lipid oranı %30.91 ve 0.755±0.03g l⁻¹ biyomas ile %50 N(-) uygulanan grupta elde edilmiştir. En düşük biyomas miktarı 0.703±0.04g l⁻¹ ile %100 N(-) uygulanan muamele grubunda gözlenirken; lipid oranı %23.90 olarak bulunmuştur. En fazla biyomasa sahip olan kontrol grubunda ise lipid oranı %15.05 olarak bulunmuştur (Şekil 4.37).



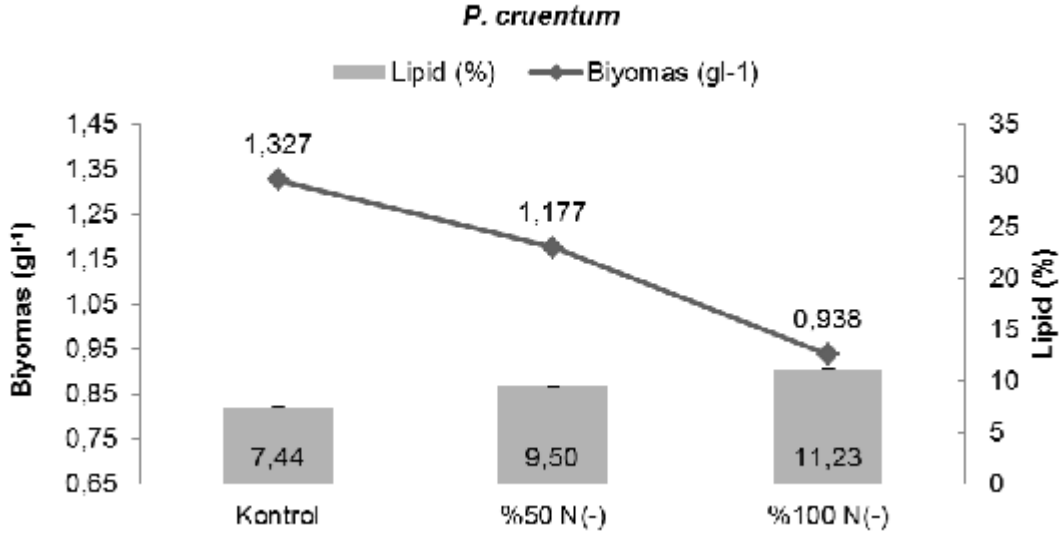
Şekil 4.37. *I. affinis galbana*'ya Ait Lipid ve Biyomas Miktarları

P. tricornutum'da en yüksek lipid düzeyi %50 N(-) uygulanan grupta %30.18 ile bulunurken, biyomas miktarı $0.978 \pm 0.02 \text{gl}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir. En düşük biyomasın ($0.922 \pm 0.05 \text{gl}^{-1}$) tespit edildiği %100 N(-) uygulanan muamele grubunda lipid oranı %24.03 olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda ise biyomas en yüksek, lipid ise en düşük bulunmuştur (Şekil 4.38).



Şekil 4.38. *P. tricornutum*'a Ait Lipid ve Biyomas Miktarları

P. cruentum türünde en fazla lipid oranı %11.23 ile %100 N(-) uygulanan muamele grubunda tespit edilirken, en düşük biyomas $0.938 \pm 0.04 \text{gl}^{-1}$ ile yine aynı grupta belirlenmiştir. %50 N(-) yapılan grupta lipid oranı %9.50 ve biyomas $1.177 \pm 0.01 \text{gl}^{-1}$ olarak bulunmuştur. En düşük lipid miktarı %7.44, $1.327 \pm 0.06 \text{gl}^{-1}$ ile en yüksek biyomasa sahip olan kontrol grubunda tespit edilmiştir (Şekil 4.39).



Şekil 4.39. *P. cruentum*'a Ait Lipid ve Biyomas Miktarları

I. affinis galbana, *P. tricornutum* ve *P. cruentum* türlerine uygulanan muamelelerin türler arasında istatistiki olarak karşılaştırılması yapılmış olup, Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5'te verilmiştir. Türlerin kontrol grubuna ait biyomas miktarları birbirinden farklı olup, en yüksek biyomas *P. cruentum*'da bulunurken; en düşük biyomas *I. affinis galbana*'da bulunmuştur. Azot eksiltme oranı arttıkça biyomas miktarı tüm türlerde azalma göstermiş olup, en düşük biyomas %50 N(-) yapılan grupta *I. affinis galbana*'da tespit edilmiştir. Bu muamele grubu; türlerin biyomas miktarları üzerine istatistiksel olarak farklılık yaratmış; en yüksek biyomas *P. cruentum*'da belirlenmiştir. %100 N(-) uygulanan grupta biyomas miktarları istatistiksel olarak farklılık yaratmış olup; en düşük biyomas *I. affinis galbana*'da tespit edilirken; *P. tricornutum* ve *P. cruentum*'da biyomas miktarları benzerlik göstermektedir ($p > 0.05$).

Çizelge 4.4. Uygulanan Muamelelerde Türler Ait Biyomas Miktarlarının Karşılaştırılması

Tür	Biyomas miktarları (gl ⁻¹)		
	Kontrol	%50 N(-)	%100 N(-)
<i>I. affinis galbana</i>	0.900±0.02 ^a	0.755±0.03 ^a	0.703±0.04 ^a
<i>P. tricornutum</i>	1.061±0.02 ^b	0.978±0.02 ^b	0.922±0.05 ^b
<i>P. cruentum</i>	1.327±0.06 ^c	1.177±0.01 ^c	0.938±0.04 ^b

^{a, b, c} harfleriyle sembolize edilen satırlar ortalamaları arasında istatistiksel olarak fark vardır (p<0.05), (n=3).

Türlere uygulanan muameleler sonucunda elde edilen lipid miktarları tüm türlerde kontrol grubunda düşük ve farklı çıkarken p<0.05); %50 N(-) uygulaması yapılan türlerde en yüksek lipid oranı *I. affinis galbana* ve *P. tricornutum* türünde benzer bulunmuştur (p<0.05). *P. cruentum* türüne ait en yüksek lipid oranı ise %100 N(-) yapılan grupta bulunmuş ancak, diğer 2 türe göre lipid oranı bu muamele grubunda en düşük olarak tespit edilmiştir (p<0.05).

Çizelge 4.5. Uygulanan Muamelelerde Türler Ait Lipid Miktarlarının Karşılaştırılması

Tür	Lipid içerikleri (%)		
	Kontrol	%50 N(-)	%100 N(-)
<i>I. affinis galbana</i>	15.05±0.6 ^b	30.91±1 ^a	23.90±1 ^a
<i>P. tricornutum</i>	20.50±0.7 ^a	30.18±1 ^a	24.03±0.1 ^a
<i>P. cruentum</i>	7.44±0.2 ^c	9.50±0.9 ^b	11.23±0.4 ^b

^{a, b, c} harfleriyle sembolize edilen satırlar ortalamaları arasında istatistiksel olarak fark vardır (p<0.05), (n=3).

4.2. Tartışma

Bu araştırma kapsamında, Prymnesiophyceae sınıfına ait *Isochrysis affinis galbana*, Bacillariophyceae sınıfına ait *Phaeodactylum tricornutum* ve Rhodellophyceae sınıfına ait *Porphyridium cruentum* türlerinde lipid içeriğinin artırılması amacıyla, N sınırlamasının, büyüme, lipid ve klorofil *a* içerikleri üzerine etkisi araştırılmıştır.

Fiziksel koşullar ile birlikte kültür ortamında kullanılan besleyici elementler ile bunların konsantrasyonları mikroalgal büyüme ve mikroalgin biyokimyasal yapısı

üzerinde değişikliklere neden olabilir. Büyüme, besi ortamlarında kullanılan besleyici elementin çeşidinin yanı sıra konsantrasyonları da etkilemektedir (Brown ve ark., 1989). Bu çalışmada birçok mikroalg türü için uygun olan F/2 besi ortamı kullanılmıştır.

Farklı N kaynakları ve konsantrasyonlarının mikroalglerin büyüme ve biyokimyasal yapılarında etkili olduğu bilinmektedir (Gökpınar, 1991; Fidalgo ve ark., 1995). F/2 besi ortamında N kaynağı olarak $\text{NO}_3\text{-N}$ 'u kullanılmaktadır. Bu çalışmada $882\mu\text{mol l}^{-1}$ $\text{NO}_3\text{-N}$ 'u temel alınmış (Guillard, 1973), bununla birlikte besi ortamına eklenen N kaynağında %50 oranında ($441\mu\text{mol l}^{-1}$) ve %100 oranında ($0\mu\text{mol l}^{-1}$) azaltma yolu ile N sınırlaması gerçekleştirilmiştir. Ortamdaki N düzeyleri *I. affinis galbana*, *P. tricornutum* ve *P. cruentum*'da büyümeyi etkileyen parametrelerden olmuştur. Azot sınırlamasının %50 ve %100 yapıldığı her üç türde de OD ve biyomas miktarlarında düşüşlerin olduğu gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada düşük N konsantrasyonunun *N. oculata*'da büyüme hızını düşürdüğü, *C. vulgaris*'te ise etkilemediği belirlenmiştir (Converti ve ark., 2009). Xu ve ark. (2001), *Ellipsoidion* sp.'yi farklı N kaynakları ve azotsuz ortamda kültüre almışlardır. Çalışmada azotsuz ortamdaki kültürde büyümenin düşük olduğunu belirtmişlerdir.

Alglerin lipid içeriğine bağlı olarak elde edilen biyomas miktarları da önem taşımaktadır. Azot eksikliği uygulanan kültürlerde genellikle biyomas düşmektedir. Thomas ve ark. (1984), *P. tricornutum*'u hücrelere yetecek kadar N bulunan bir ortamda ve N eksikliğinin yapıldığı bir ortamda kültüre almış ve biyomas miktarının N eksikliği uygulanan besi ortamında düşük olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan benzer çalışmalarda da N sınırlanmasının türlerde hücre yoğunluğunun düşmesine ve biyomas miktarlarında azalmalara neden olduğu belirtilmiştir (Kilham ve ark., 1997; Pruvost ve ark., 2009). Bu çalışmada *I. affinis galbana*'da en düşük biyomas miktarı %23.9 lipid elde edilen %100 N(-) uygulanan grupta $0.703\pm 0.04\text{g l}^{-1}$ olarak, *P. tricornutum*'da en düşük biyomas %100 N(-) uygulanan grupta $0.922\pm 0.05\text{g l}^{-1}$ olarak, *P. cruentum* türünde de en düşük biyomas en fazla lipid oranına sahip olan %100 N(-) uygulanan grupta $0.938\pm 0.04\text{g l}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar ile bu çalışmadan elde edilen biyomas miktarındaki azalmalar benzerlik göstermekte

olup; N sınırlamasının türleri strese sokup büyüme hızını yavaşlattığı sonucunu ortaya çıkarmaktadır.

Azot eksikliği uygulaması birçok türde lipid oranını artırmaktadır. Yapılan bu çalışma stres faktörlerinden N eksikliğinin *I. aff galbana*, *P. tricornutum* ve *P. cruentum* türlerinde hücresel yağ içeriğine etkisini belirlemek üzere planlanmış ve kültürlerde büyüme periyodu sonunda ortalama lipid miktarları karşılaştırılmıştır. Kültürlerde muamelelere göre belirlenen ortalama % lipid değerleri arasında önemli bir fark olduğu belirlenmiştir. Muamelelerden elde edilen sonuçlara göre uygulanan N eksikliği ile stres oluşturulması türlerde lipid miktarında artışa neden olmuştur. Yapılan bu çalışmada %50 N(-) uygulanan gruplarda *I. affinis galbana* %30.91, *P. tricornutum* %30.18 ile en yüksek lipid elde edilirken; *P. cruentum* türünde en yüksek lipid %11.23 ile %100 N(-) yapılan grupta bulunmuştur. Yürütülen bazı çalışmalarda N eksikliğinde *P. tricornutum*'un yüksek miktarda lipid biriktirdiği (Thomas ve ark., 1984); *I. galbana*'da N miktarının yükseltildiğinde lipid oranının %22'den %16.9'a düştüğü (Utting, 1985); azot açlığında *Porphyridium cruentum*'un lipid içeriğini 2 katına çıkardığı (Piorreck ve Pohl, 1984) bildirmişlerdir.

Azot sınırlamasının büyüme hızını yavaşlattığı ancak lipid oranını artırdığı *Dunaliella tertiolecta*, *N. Oloebundas*, *I. affinis galbana*, *B. braunii*, *D. salina*, *Nannochloropsis* sp, *N. oculata*, *C. vulgaris*, *P. tricornutum*, *Chaetoceros* sp., *I. galbana*, *P. lutheri*, *N. atomus*, *Tetraselmis* sp. ve *Gymnodinium* sp, *H. pluvialis* ve *S. platensis* gibi pek çok mikroalg türünde belirlenmiştir (Fabregas ve ark., 1989; Tornabene ve ark. 1983; Sukenik ve Wahnon 1991; Zhila ve ark., 2005; Weldy ve Huesemann, 2007; Rodolfi ve ark., 2009; Converti ve ark., 2009; Reitan ve ark., 1994; Damiani ve ark., 2010; Uslu ve ark., 2011). Bu çalışmada da benzer şekilde azot sınırlaması büyüme hızını yavaşlatmış, bununla birlikte hücresel lipid oranını artırmıştır. Ancak burada önemli olan artan yağ içeriğinin ekonomik olarak değerlendirilebilmesi amacıyla biyomas oranının makul düzeylerde elde edilebilmesidir.

Lipid üretimine etki eden faktörlerden biri de uygulanan aydınlanma süresidir. Aydınlanma süresi uzadıkça hücre yoğunlukları artmaktadır. 18 saatlik aydınlanma süresi ile 12 saatlik aydınlanma süresi karşılaştırıldığında, hücre

konsantrasyonları arasında farkın fazla olmadığı ve maksimum hücre yoğunluğuna ulaşıldığı bildirilmiştir (Oh ve ark., 2009). Bu çalışmada kültürlere 16:8 aydınlık-karanlık periyodu ve 80 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddeti uygulanmıştır. Oh ve ark. (2009), *P. cruentum* türünü farklı büyüme koşullarında kültüre alarak en fazla yağ oranını %19.3 ile 12:12 aydınlık-karanlık periyodu uygulanan grupta saptamışlardır. Renaud ve ark. (2002), *Isochrysis* sp., *Chaetoceros* sp., *Rhodomonas* sp. ve *Cryptomonas* sp. türlerini 12:12 aydınlık-karanlık periyodu uygulayarak kültüre almışlar ve en yüksek lipid oranını %21.7 ile *Isochrysis* sp.'de belirlemişlerdir. Bandarra ve ark., (2003) yaptıkları çalışmada *I. galbana*'yı 2 farklı aydınlanma zamanında (24 saat devamlı ışık ve 16:8 aydınlık-karanlık periyodu) kültüre almış ve en yüksek PUFA oranının 8 saatlik aydınlanma yapılan kültürlerde meydana geldiğini bildirmişlerdir. Araştırmacıların bildiriyle yapılan bu çalışmalar ile uygulanan aydınlık-karanlık periyodunun yağ artışını olumlu yönde etkilediği sonucuna varılmıştır.

Alg kültürlerinin farklı fazlarında elde edilen biyomasın biyokimyasal içerikleri farklılıklar göstermektedir. Lipid miktarı kültürün yaşıyla artış göstermektedir. Durgunluk fazında elde edilen lipid miktarı diğer fazlara göre daha yüksektir (Liang ve ark., 2002). Bu çalışmada türler durgunluk fazının sonunda hasat edilmiştir. Yapılan çalışmalarda *Cylindrotheca* türünde (Liang ve ark., 2002) ve *I. galbana* (Fidalgo ve ark., 1998)'da en yüksek lipid miktarları duraklama fazında elde edilmiştir.

Mikroalg kültürlerinde N sınırlamasının metabolitler üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, hücre sayısı ve klorofil *a* miktarlarında azalma saptanırken, yağ gibi organik karbon bileşikleri oranlarında artış kaydedilmiştir. Bununla birlikte kültürlerde karoten miktarının artmasına bağlı olarak renkte sararma gözlenmiştir (Shifrin ve Chisholm, 1981; Sukenik ve ark., 1989). Yürütülen bu çalışmada her üç türde de %50 N ve %100 N(-) yapılan kültürlerde klorofil içeriğinde azalmalar meydana gelmiştir. En düşük klorofil *a* düzeyi her üç türde de %100 N(-) grupta bulunmuş, *I. affinis galbana*'da 36.9 $\mu\text{g l}^{-1}$, *P. tricorutum*'da 248.1 $\mu\text{g l}^{-1}$ ve *P. cruentum*'da da 68.4 $\mu\text{g l}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. N sınırlaması yapılan tüm kültürlerde renkte sararma gözlenmiştir.

Kültürlerde ilk gün elde edilen biyomas miktarına göre hesaplanan hacimsel (PV) biyomas çıkış oranları belirlenmiştir. *I. affinis galbana* türünün kontrol grubunda elde edilen PV oranları %50 ve %100 N(-) yapılan gruplara göre daha fazla bulunmuş, %50 N(-) yapılan grupta son gün elde edilen değer ilk gün elde edilen değere göre daha düşük, %100 N(-) yapılan grupta ise üretimin olmadığı belirlenmiştir. Aynı durum *P. tricornutum* türü içinde geçerli olup, en yüksek PV değerleri kontrol grubunda, en düşük değerler ise %100 N(-) yapılan grupta tespit edilmiştir. Ancak bu grupta üretim eksi değerlere ulaşmamış, tam aksine ilk gün elde edilen biyomas miktarının üzerinde biyomas elde edilmiştir. *P. cruentum* türünde kontrol grubu PV biyomas artış hızı değeri, %50 N(-) yapılan gruptan daha düşük bulunmuş, en düşük PV %100 N(-) yapılan grupta tespit edilmiştir. Bu durum sadece birim hacimdeki biyomas artış hızını belirleyip, elde edilen biyomas miktarını temsil etmemektedir. Her üç türde de en fazla biyomas kontrol grubunda tespit edilirken, en düşük biyomas %100 N(-) yapılan grupta saptanmıştır. Scragg ve ark., 2002 yılında 0.63msn^{-1} hızda çalışan tubular fotobiyoreaktör sistemde yaptıkları çalışmada, düşük N konsantrasyonunda *C. vulgaris* ve *C. emorsonii* türlerinde elde ettikleri PV değerlerinin kontrol grubundan daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Bu durum N eksilmesi yapılan gruplarda biyomasın daha düşük olduğu sonucunu açıklamaktadır.

Kültürlerden elde edilen OD değerlerine baktığımızda, *I. affinis galbana* türünde en yüksek OD değeri kontrol grubunda belirlenirken, diğer 2 grupta istatistiki olarak benzerlik bulunmuştur. Ancak gözlem değeri en düşük bulunan grup %100 N(-) yapılan grup olmuştur. *P. tricornutum* türünde ise 3 grupta da elde edilen OD değeri istatistiksel olarak benzer olmasına rağmen, gözlem değeri en yüksek kontrol grubu olurken, en düşük grup yine diğer türde olduğu gibi %100 N(-) yapılan grup olmuştur. *P. cruentum* türünde en yüksek OD kontrol grubunda en düşük ise %100 N(-) yapılan grupta tespit edilmiştir. Bu durum bize diğer parametrelerde olduğu gibi, N eksilmesi yapılan gruplarda optik yoğunluğun daha düşük olduğu sonucunun elde edilmesini sağlamıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, *I. affinis galbana*, *P. tricornutum* ve *P. cruentum* türlerinin, laboratuvar ortamında $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de, $80\mu\text{molphotonm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddeti ve 16:8 saat aydınlık-karanlık periyodu uygulaması yapılarak farklı N konsantrasyonlarında hazırlanan F/2 ve Si-F/2 besin ortamlarında kültürü yapılmıştır. Uygulanan N konsantrasyonları, tüm türlerin biyokimyasal yapısında değişikliklerin meydana gelmesine neden olmuştur. N eksikliğinin tüm türlerde biyomas miktarı, OD ve klorofil *a* değerlerinde azalmaya; ancak, lipid oranında ise artışa neden olduğu belirlenmiştir. Denemede en fazla lipid elde edilen türlerin, %50 N eksiltmesi yapılan muamele gruplarında %30.91 lipid ve $0.755\pm 0.03\text{gl}^{-1}$ biyomas ile *I. affinis galbana*'da, %30.18 lipid ve $0.978\pm 0.02\text{gl}^{-1}$ biyomas ile *P. tricornutum*'da oldukları saptanmıştır. En fazla biyomasın elde edildiği *P. cruentum*'da lipid oranı diğer 2 türe göre oldukça düşük bulunmuştur.

Yapılan bu çalışma ışığı altında, denemede kullanılan türlerin denizel türler olması nedeniyle besi ortamı olarak F/2 ve Si-F/2 besi ortamlarının kullanılması önerilmektedir.

Özellikle hücre içi yağ içeriğini artırma çalışmalarında, besi ortamında N elementinin azaltılması veya tamamen uzaklaştırılması lipid miktarını arttırdığından, yağ içeriğinin artırılması için stres faktörü olarak N sınırlaması önerilmektedir.

N sınırlaması sonucunda *I. affinis galbana*, *P. tricornutum* ve *P. cruentum* türlerinin büyümesinde ve biyokimyasal yapısında değişiklikler meydana gelmiştir. N sınırlaması, *I. affinis galbana* ve *P. tricornutum*'da yüksek miktarda lipid elde edilmesini sağlamıştır.

I. affinis galbana türü özellikle deniz balıkları yetitiriciliğinde larva beslemede, zooplankton rotifer kültürlerinde canlı yem olarak ve *P. tricornutum* türü de hem lipid hem de biyomas miktarındaki verimliliği yönünden uygun olması açısından kuluçkahanelerde karides beslemede kullanılması önerilmektedir.

Aynı zamanda *I. affinis galbana* ve *P. tricornutum*'dan elde ettiğimiz biyomas miktarları yüksek değerlere çıkartılabiliştir. Bu amaçla denemeden elde edilen veriler doğrultusunda *I. affinis galbana* ve *P. tricornutum*'u %50 N eksiltmesi ile

hazırlanmış besi ortamında kültürünün sürekliliği, endüstriyel boyutta yağ elde etme çalışmalarının yapılabilirliğini; böylece, dünyada halen devam eden mikroalglerden biyoyakıt eldesi çalışmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Denemede kullanılan *P. cruentum*'un biyomas miktarının yüksek ancak yağ içeriğinin düşük olması bu türün yağ çalışmaları için uygun bir tür olmadığını göstermiştir.

Azot, enzimlerin ve proteinlerin yapısında kaynak oluşturduğu için N konsantrasyonlarının *I. affinis galbana*, *P. tricornutum* ve *P. cruentum*'da protein yapısında ve aynı zamanda N sınırlaması, türlerin yağ asitleri profilinde ne gibi değişikliklere sebep olduğu araştırılmalıdır.

Akuakültür çalışmalarında, protein, lipid, pigment, sterol gibi değerli metabolitlerce zengin olan türler kullanılmaktadır. Mikroalglerde N sınırlaması yaparak yağ içeriği artarken, pigment miktarı azalmaktadır. Mikroalglerde yağ miktarını artırırken, aynı zamanda pigment miktarını artırma çalışmaları yapılabilir.

I. affinis galbana'da havalandırma oranı çok önemlidir. Değişik havalandırma oranları denenerek, biyokimyasal yapısındaki değişiklik incelenebilir.

Farklı ışık şiddetleri kullanılarak, N sınırlaması yapılan ortamlarda *I. affinis galbana*, *P. tricornutum*'da ne gibi hücresel değişikliklerin olduğu belirlenebilir.

Elde edilen bulgulara göre, özellikle *P. tricornutum* türünün kültürünün kolay, biyomas miktarı ve yağ içeriğinin yüksek olması nedeniyle endüstriyel boyutlara taşınması kuvvetle önerilebilir. Bu amaçla *P. tricornutum*'un dışarı ortamda fotobiyoreaktör sistemde ve açık havuzlarda süreklilik çalışmaları önerilmekte ve elde edilen biyomasın biyoyakıtta dönüştürülerek alternatif yakıt kaynağı olarak değerlendirilmesi araştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

- ACIÉN FERNÁNDEZ, F.G., HALL, D.O., CAÑIZARES GUERRERO, E., KRISHNA RAO, K. and MOLINA GRIMA, E., 2003. Outdoor production of *Phaeodactylum tricornutum* biomass in a helical reactor. *Journal of Biotechnology*, 103: 137-152.
- BANDARRA, N.M., PEREIRA, P.A., BATISTA, I. and VILELA, H., 2003. Fatty acids, sterols and α -tocopherol in *Isochrysis galbana*. *Journal of Food Lipids*, 10: 25-34.
- BECKER, E.W., 1994. *Microalgae biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- BEN-AMOTZ, A., TORNABENE, T.G. and THOMAS, W.H., 1984. Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *Journal of Phycology*, 21(1): 72-81.
- BİLGÜVEN, M., 2002. *Yemler Bilgisi, Yem Teknolojisi ve Balık Besleme*. Akademisyen yayınevi, Mersin, 446s.
- BLIGH, E.G. and DYER, W.J. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can.J.Biochem.Physiol.*, 37: 911-917.
- BOUSSIBA, S., FAN, L. and VONSHAK, A., 1992. Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *H. pluvialis*. *Methods in Enzymology*, 213: 386-391.
- BROWN, M.R., JEFFRY, S.W. and GARLAND, C.D., 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: a literature review. *CSIRO Mar. Lab. Rep.* 205-244.
- BROWN, M.R., GARLAND, C.D., JEFFRY, S.W., JAMESON, I.D. and LEROI, J.M., 1993a. The gross and amino acid compositions of batch and semi-continuous cultures of *Isochrysis* sp., *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *J. Appl. Phycol.*, 5: 285-296.
- BROWN, M.R., DUNSTAN, G.A., JEFFRY, S.W., VOLKMAN, J.K., BARRETT, S.M. and LEROI, J.M., 1993b. The influence of irradiance on the biochemical composition of the Prymnesiophyte *Isochrysis* sp.(CLONE T-ISO). *J. Appl. Phycol.*, 29(5): 601-612.

- BULUT MUTLU, Y., IŞIK, O., USLU, L., KOÇ, K., DURMAZ, Y., 2011. The effects of nitrogen and phosphorus deficiencies and nitrite addition on the lipid content of *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). African Journal of Biotechnology, 10(3): 453-456.
- CİRİK, S. ve GÖKPINAR, Ş., 1999. Plankton Bilgisi ve Kültürü. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları. No:47, Ders kitabı, 2.baskı. İzmir, 274s.
- CONVERTI, A., CASAZZA, A.A., ORTIZ, E.Y., PEREGO, P. and DEL BORGHI, M., 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. Chemical Engineering and Processing, 48: 1146-1151.
- DAMIANI CECILIA, M., POPOVICH, C.A., CONSTENLA, D. and LEONARDI, P.I., 2010. Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use a biodiesel feedstock. Bioresource Technology, 101(11): 3801-3807.
- DAVIS, A.R., 1977. Principles of Oceanography. Univ. of South Florida Aquafarms, Inc., Florida, 126p.
- DURMAZ, Y., IŞIK, O., BANDARRA, N.M, CİRİK, S., TURAN, G. ve GÖKPINAR, Ş., 2002. *Porphyridium cruentum* (Rhodophyceae) Yağ Asitleri Kompozisyonuna Kurutma Yöntemlerinin Etkisi. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi. 19(1-2): 189-195.
- FÁBREGAS, J., ABALDE, J. and HERRERO, C., 1989. Biochemical composition and growth of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with different ammonium nitrogen concentrations as chloride, sulphate, NO₃e and carbonate. Aquaculture, 83(3-4): 289-304.
- FÁBREGAS, J., MASEDA, A., DOMÍNGUEZ, A. and OTERO, A., 2004. The cell composition of *Nannochloropsis sp.* changes under different irradiances in semicontinuous culture. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 20: 31-35.

- FAJARDO, A.R., CERDAN, L.E., MEDINA, A.R., FERNANDEZ, F.G.A., MORENO, P.A.G. AND GRIMA, E.M., 2007. Lipid extraction from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*, European Journal of Lipid Science and Technology. 109: 120–126.
- FIDALGO, J.P., CID, A., ABALDE, J. and HERRERO, C., 1995. Culture of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* with different nitrogen sources: growth, nutrient conversion and biochemical composition. Cah. Biol. Mar., 36: 165-173.
- FIDALGO, J.P., CID, A., TORRES, E., SUKENIK, A. and HERRERO, C., 1998. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipids classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. Aquaculture, 166: 105-116.
- FLYNN, K.J., ZAPATA, M., GARRIDO, J.L., OPIK, H. and HIPKIN, C.R., 1993. Changes in carbon and nitrogen physiology during ammonium and NO₃^e nutrition and nitrogen starvation in *Isochrysis galbana*. European Journal of Phycology, 28(1): 47-52.
- GANTT, E., 1981. Phycobilisomes. Annual Review of Plant Physiology, 32: 327-347.
- GOLDMAN, J.C., 1979. Outdoor Algal Mass Cultures. I. Applications. Water Research, 13: 1-19.
- GOUVEIA, L., MARQUES, A.E., LOPES DA SILVA, T. and REIS, A., 2009. *Neochloris oleabundans* UTEX1185: A suitable renewable lipid source for biofuel production. J. Ind. Microbiol Biotechnol., 36: 821-826.
- GÖKPINAR, Ş., 1991. Akuakültürde önemli beş deniz flagellatının inorganik N alınımları üzerine sıcaklık değişimlerinin etkisi. Dokuz Eylül Üniversitesi Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Enstitüsü, Doktora Tezi, İzmir, 88s.
- GÖKPINAR, Ş., 1994. *Nannochloropsis* sp. (Chlorophyceae) inorganik N kaynakları kullanımı üzerine sıcaklık değişimlerinin etkisi. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi, 1169-1178.
- GUILLARD, R.R.L., 1973. Division Rates. In: Stein, R.J. (Ed.) Handbook of Phycological Methods, Culture Methods and Growth Measurement. Cambridge Univ. Press, N. Y., 283-311.

- HARRISON, P.J., THOMPSON, P.A., and CALDERWOOD, G.S., 1990. Effects of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton. *J. Appl Phycol.*, 2: 45-56.
- HOFF, F.H. and SNELL T.W., 1987. *Plankton Culture Manual* (3rd edn. ed.), Florida Aqua Farms, Dade City, 155pp
- <http://sn2000.taxonomy.nl/Taxonomicon/TaxonTree.aspx?id=127554&tree=0.1>, 01.07.2011.
- <http://sn2000.taxonomy.nl/Taxonomicon/TaxonTree.aspx?id=127579&tree=0.1>, 01.07.2011.
- <http://sn2000.taxonomy.nl/Taxonomicon/TaxonTree.aspx?id=122600&tree=0.1>, 01.07.2011.
- HU, H. and GAO, K., 2006. Response of growth and fatty acid compositions of *Nannochloropsis* sp. to environmental factors under elevated CO₂ concentration. *Biotechnology Letters*, 28: 987-992.
- ILLMAN, A.M., SCRAGG, A.H. and SHALES, S.W., 2000. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology*, 27: 631-635.
- KHOZIN-GOLDBERG, I., BIGOGNO, C., SHRESTHA, P. and COHEN, Z., 2002. Nitrogen starvation induces the accumulation of arachidonic acid in the freshwater green alga *Parietochloris incisa* (Trebuxiophyceae). *J. Phycology*, 38: 991-994.
- KHOZIN-GOLDBERG, I. and COHEN, Z., 2006. Effect of phosphate starvation on lipid and fatty acid composition of *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry* 67: 696-701.
- KILHAM, S.S., KREEGER, D.A., GOULDEN, C.A. and LYNN, S.G., 1997. Effects of nutrient limitation on biochemical constituents of *Ankistrodesmus falcatus*. *Freshwater Biology*, 38: 591-596.
- KUSMIYATI, N.W.S.A., 2007. Antibacterial activity assay from *Porphyridium cruentum* microalgae. *Biodiversitas*, 8(1): 48-53.
- LEWIN, J.C., 1958. The Taxonomic Position of *Phaeodactylum tricorutum*. *Journal of General Microbiology*, 18: 427-432.

- LI, Q., DU, W., LIU, D., 2008. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl Microbial Biotechnol*, 80: 749-756.
- LIANG, Y.H., MAI, K. and SUN, S., 2002. Effects of harvest stage on the total lipid and fatty acid composition of four *Cylindrotheca* strains. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 20(2): 157-161.
- LIANG, Y.H., BEARDALL, J. and HERAUD, P., 2006. Effects of nitrogen source and UV radiation on the growth, chlorophyll fluorescence and fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornerutum* and *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 82: 161-172.
- LIN, Y.H., CHANG, F.L., TSAO, C.Y. and LEU, J.Y., 2007. Influence of growth phase and nutrient source on fatty acid composition of *Isochrysis galbana* CCMP 1324 in a batch photoreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 37: 166-176.
- NEENAN, B., FEINBERG, D., HILL, A., MCINTOSH, R., TERRY, K., 1986. Fuels from microalgae: Technology status, potential, and research requirements. Publ. No. SERi/SP-231-2550, Solar Energy Research institute.
- OH, H.S., HAN, J.G., KIM, Y., HA, J.H., KIM, S.S., JEONG, M.H., JEONG, H.S., KIM, N.Y., CHO, J.S., YOON, W.B., LEE, S.Y., KANG, D.H. and LEE, H.Y., 2009. Lipid production in *Porphyridium cruentum* grown under different culture conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108(5): 429-434.
- PARSONS, T.R., and STRICKLAND, J.D.H., 1963. Discussion of Spectrophotometric Determination of Marine Plant Pigments, with Revised Equations for Ascertaining Chlorophylls and Carotenoids. *Journal of Marine Research*, 21(3): 115-163.
- PIORRECK, M., POHL, P., 1984. Formation of biomass, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acid in green and bluegreen algae during one growth phase. *Phytochemistry* 23: 217-223.

- PRUVOST, J., VAN VOOREN, G., COGNE, G. and LEGRAND, J., 2009. Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. *Bioresource Technology*, 100: 5988-5995.
- QIANG, H., and RICHMOND, A., 1994. Optimizing the population density in *Isochrysis galbana* grown outdoors in a glass column photobioreactor. *J. Appl. Phycol.*, 6: 391-396.
- RAGHAVAN, G., HARIDEVI, C.K., GOPINATHAN, C.P., 2008. Growth and proximate composition of the *Chaetoceros calcitrans f. pumilus* under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. *Aquaculture Research*, 39: 1053-1058.
- RAMUS, J., KENNEY, B.E., and SHAUGHNESSY, E.J., 1989. Drag reducing properties of microalgal exopolymers. *Biotechnology and Bioengineering*, 33: 550-556.
- REITAN, K.J., RAINUZZO, J.R. and OLSEN, Y., 1994. Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. *J. Phycol.*, 30: 972-979.
- RENAUD, M.S., THINH, V.L., LAMBRINIDIS, G., PARRY, L.D., 2002. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*, 211: 195-214.
- RICHARDSON, B., ORCUTIT, D.M., SCHWERTNER, H.A., MARTINEZ, C.L. and WICKLINE, H.E., 1969. Effects of Nitrogen Limitation on the Growth and Composition of Unicellular Algae in Continuous Culture. *Applied Microbiology*, 18(2): 245-250.
- RODOLFI, L., ZITTELLI, G.C., BASSI, N., PADOVANI, G., BIONDI, N., BONINI, G. and TREDICI, M.R., 2009. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1): 100-112.

- ROUSCH, J.M., BINGHAM, S.E. and SOMMERFELD, M.R., 2003. Changes in fatty acid profiles of thermo-intolerant marine diatoms during temperature stress. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 295: 145-156.
- SÁNCHEZ, S., MARTINEZ, M., ESPINOLA, F., 2000. Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isochrysis galbana* in relation to culture medium. *Biochem. Eng. J.*, 6: 13–18.
- SATOH, A., KATO, M., YAMATO, K., ISHIBASHI, M., SEKIGUCHI, H., KURANO, N., MIYACHI, S., 2010. Characterization of the Lipid Accumulation in a New Microalgal Species, *Pseudochoricystis ellipsoidea* (Trebouxiophyceae). *Journal of the Japan Institute of Energy*, 89: 909-913.
- SAWAYAMA, S., INOUE, S., DOTE, Y., YOKOYAMA, S.Y., 1995. CO₂ fixation and oil production through microalga. *Energy Convers Manag.*, 36: 729–31.
- SCHLEGEL, H.G., 1985. *Allgemeine Microbiologie*. Thieme, Stuttgart, 571p.
- SCRAGG, A.H., ILLMAN, A.M., CARDEN, A., SHALES, S.W., 2002. Growth of microalgae with increased caloric values in a tubular bioreactor. *Biomass and Bioenergy*, 23: 67-73.
- SHIFRIN, N.S. and CHISHOLM, S.W., 1981. Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of NO₃^e, silicate and light–dark cycles. *J. Phycol.*, 17: 374–384.
- SIAUT, M., HEIJDE, M., MANGOGNA, M., MONTSANT, A., COESEL, S., ALLEN, A., MANFREDONIA, A., FALCIATORE, A., BOWLER, C., 2007. Molecular toolbox for studying diatom biology in *Phaeodactylum tricorutum*. Gene. doi:10.1016/j.gene.2007.05.022 Golden, CO, 149p.
- SIRON, R., GIUSTI, G., BERLAND, B., 1989. Changes in the fatty acid composition of *Phaeodactylum tricorutum* and *Dunaliella tertiolecta* during growth and under phosphorus deficiency. *Marine Ecology Progress Series*, 55: 95-100.
- SUKENIK, A., CARMELI, Y. and BERNER, T., 1989. Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *J. Phycology*, 25: 686-692.

- SUKENIK, A., 1991. Ecophysiological considerations in the optimization of eicosapentaenoic acid production by *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). *Bioresource Technol.*, 35(3): 263-269.
- SUKENIK, A. and WAHNON, R., 1991. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, 97(1): 61-72.
- THOMAS, W.H., SEIBERT, D.L.R., ALDEN, M., NEORI, A. and ELDRIDGE, P., 1984. Yields, photosynthetic efficiencies and proximate composition of dense marine microalgal cultures. I. Introduction and *Phaeodactylum tricornutum* experiments. *Biomass*, 5(3): 181-209.
- THOMPSON, P.A., GUO, M., HARRISON, P.J., WHYTE, J.N.C., 1992. Effects of variation in temperature. I. On the fatty acid composition of eight species of marine phytoplankton. *J Phycol.*, 28: 488-497.
- TORNABENE, T.G., HOLZER, G., LIEN, S. and BURRIS, N., 1983. Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans*. *Enzyme Microb. Tech.*, 5(6): 435-440.
- TSUZUKI, M., OHNUMA, E., SATO, N., TAKAKU, T. and KAWAGUCHI, A., 1990. Effects of CO₂ Concentration During Growth on Fatty Acid Composition in Microalgae. *Plant Physiol.* 93: 851-856.
- USLU, L., IŞIK, O., KOÇ, K., GÖKSAN, T., 2011. The effects of nitrogen deficiencies on the lipid contents of *Spirulina platensis*. *African Journal of Biotechnology*, 10(3): 386-389.
- UTTING, S.D., 1985. Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. *Aquacult. Eng.*, 4: 175-190.
- VONSHAK, A., 1988. *Porphyridium*. In: Borowitzka MA, Borowitzka LJ (eds) *Micro-algal biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, 122-134.
- WELDY, C.S. and HUESEMANN, M., 2007. Lipid production by *Dunaliella salina* in batch culture: effects of nitrogen limitation and light intensity, U.S. Department of Energy Journal of Undergraduate Research, 7(1): 115-122.

- WIDJAJA, A., 2009. Lipid production from microalgae as a promising candidate for biodiesel production. *Makara Teknologi*, 13(1): 47-51.
- XU, N., ZHANG, X., FAN, X., HAN, L. and ZENG, C., 2001. Effects of nitrogen source and concentration on growth rate and fatty acid composition of *Ellipsoidion* sp. (Eustigmatophyta). *Journal of Applied Phycology*, 13: 463-469.
- XU, F., CAI, Z., CONG, W. and OUYANG, F., 2004. Growth and fatty acid composition *Nannochloropsis* sp. grown mixotrophically in fed-batch culture. *Biotechnology Letters*, 26: 1319-1322.
- XU, H., MIAO, X. and WU, Q., 2006. High quality biodiesel production from microalgae *Chlorella protothecoides* by heterotrophic grown in fermenters. *Journal of Biotechnology*, 126: 499-507.
- YONGMANITCHAI, W. and WARD, O.P., 1991. Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(2): 419-425.
- ZAR, J.H., 1999. *Biostatistical Analysis*. Upper Saddle River. Prentice Hall, New Jersey. 4th Edition. Cap 12, 231-272.
- ZHAO, Y., YU, Z., SONG, X. and CAO, X., 2009. Biochemical compositions of two dominant bloom-forming species isolated from the Yangtze River Estuary in response to different nutrient conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 368: 30-36.
- ZHILA, N.O., KALACHEVA, G.S. and VOLOVA, T.G., 2005. Effect of nitrogen limitation the growth and lipid composition of the green algae *Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252. *Russian Journal of Plant Physiology*, 52(3): 357-365.
- ZHU, C.J., LEE, Y.K., CHAO, T.M. and LIM, S.H., 1997. Diurnal changes in gross chemical composition and fatty acid profiles of *Isochrysis galbana* TK1 in outdoor closed tubular photobioreactors. *J. Mar. Biotechnol*, 5: 153-157.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Aksaray'da doğdu. İlkokulu Kars'ta, orta ve lise öğrenimini Adana'da tamamladı. 1996 yılında Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesinde lisans eğitimine başladı ve 2000 yılında Su Ürünleri Mühendisi olarak mezun oldu. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalında Yüksek Lisans, 2004 yılında Doktora eğitimine başladı. 2002 yılında yine Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalında açılmış olan asistanlık sınavını kazandı ve halen görevine devam etmektedir.