



## *Chlorella vulgaris* Beyerinck [Beijerinck] (Chlorophyta) Suşlarının Kesikli Kültür Sisteminde Yığın Kültürlerinin Üretimi Üzerine Bir Çalışma

Dilek YALÇIN DUYGU\* 

Gazi Üniversitesi Gazi Eğitim Fakültesi, Orta Öğretim Fen ve Matematik Alanları, Ankara, Türkiye

### Ö Z

Bu çalışmada, tatlısu birikintilerinde yaygın olarak bulunan, tek hücreli bir yeşil alg olan *Chlorella vulgaris* türünün izolasyonu, kültür koşullarının oluşturulması ve yığın kültürlerinin elde edilmesi amaçlanmıştır. *C. vulgaris* gıda, kozmetik ve eczacılık sektöründe kullanıldığı gibi, son yıllarda biyodizel üretiminde ve atık suların arıtımında da umut verici hale gelmiştir. Tatlısu birikintilerinden izole edilen *C. vulgaris* suşları kesikli kültür sistemi oluşturularak, 100, 200, 500, 1000, 2000 ve 4000 ml'lik hacimlerde üretimleri yapılmıştır. Suşların başlangıç inokulum miktarı, uygun pH, sıcaklık, havalandırma gibi etmenler deneyerek optimum kültür koşulları oluşturulmuştur. 4000 ml'lik yığın kültürlerin 120. saatte yapılan hücre sayımlarında en yüksek değer AUFFH suşunda  $6,8 \times 10^4$  h/ml olarak tespit edilmiş bu suşu sırasıyla; TOH  $6,7 \times 10^4$  h/ml, UIK  $6,3 \times 10^4$  h/ml, GURH  $6,2 \times 10^4$  h/ml ve GUMSH  $6,1 \times 10^4$  h/ml suşları izlemiştir. Yaş ağırlıkları açısından 4000 ml'lik yığın kültürler için yine AUFFH 152 (g/2000 ml) ile en yüksek miktar elde edilirken onu sırasıyla TOH 129,6 (g/2000 ml), GURH 120,8 (g/2000 ml), GUMSH 84,3 (g/2000 ml), UIK 48,8 (g/2000 ml) takip etmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Chlorella vulgaris*, mikroalg, yığın kültür, kesikli kültür sistemi

### MAKALE BİLGİSİ

#### ARAŞTIRMA MAKALESİ

Geliş : 23.12.2016  
Düzeltilme : 30.03.2017  
Kabul : 07.04.2017  
Yayın : 21.08.2017



DOI: 10.17216/LimnoFish.280547

#### \* SORUMLU YAZAR

dilekduygu06@hotmail.com  
Tel : +90 532 328 21 47

### A Study on the Production of Batch Cultures in Semi-Continuous Culture System of *Chlorella vulgaris* Beyerinck [Beijerinck] (Chlorophyta) Strains

**Abstract:** In this study, it is aimed to isolate *Chlorella vulgaris* strain, a single-celled green algae that is common in freshwater deposits, to establish culture conditions and to obtain batch cultures. *C. vulgaris* has been used in food, cosmetics and pharmaceutical industries as well as become encouraging for the production of biodiesel and the treatment of wastewater in recent years. *C. vulgaris* strains isolated from freshwater deposits were cultivated in a semi-continuous culture system of 100, 200, 500, 1000, 2000 and 4000 ml. Subsequently growth factors such as initial inoculum amount of the strains, appropriate pH, temperature and ventilation were tested in order to optimize the conditions. The highest value in the cell counts of 4000 ml batch cultures at the 120<sup>th</sup> hours was determined as  $6.8 \times 10^4$  h/ml in AUFFH strain respectively the others were as follows: TOH  $6.7 \times 10^4$  h/ml, UIK  $6.3 \times 10^4$  h/ml, GURH  $6.2 \times 10^4$  h/ml and GUMSH  $6.1 \times 10^4$  h/ml. The highest amount in terms wet weight for 4000 ml batch cultures was obtained as AUFFH 152 (g/2000 ml), this value was followed by TOH 129.6 (g/2000 ml), GURH 120.8 (g/2000 ml), GUMSH 84.3 (g/2000 ml), UIK 48.8 (g/2000 ml).

**Keywords:** *Chlorella vulgaris*, microalgae, batch culture, semi-continuous system

#### Alıntılama

Yalçın Duygu D. 2017. *Chlorella vulgaris* Beyerinck [Beijerinck] (Chlorophyta) Suşlarının Kesikli Kültür Sisteminde Yığın Kültürlerinin Üretimi Üzerine Bir Çalışma. LimnoFish. 3(2): 61-67. doi: 10.17216/LimnoFish.280547

### Giriş

Mikroalgler, karbondioksiti güneş enerjisi yardımı ile biyokimyasal maddelere dönüştürebilme yeteneğine sahip olan fotosentetik mikroorganizmalardır. Bunu da karasal bitkilerden 10 kat fazla verimle yerine getirmektedirler (Murdock ve Wetzel 2009; Brennan ve Owende 2009). 50.000'den fazla mikroalg türü bulunmakla

birlikte, bunların yaklaşık 30.000'i üzerinde çalışılıp analiz edildiği tahmin edilmektedir (Richmond 2004). Mikroalg kültürleri sadece yetiştiricilikle uğraşanların değil, aynı zamanda bitki fizyologları ve biyomühendislerin uzun yıllar boyunca özel ilgi duydukları ve çalıştıkları bir konu olmuştur. Fotosentezi çalışmak amacıyla tek hücreli yeşil alglerden *Chlorella*'nın deneylerde kullanılmasından

sonra, bazı mikroalglerin de gün içinde biyokütlelerini defalarca artırabildikleri ve katı maddelerinin %50'den fazla proteinden oluştuğu bulunmuştur. Almanya'da 1940'ların başında mikroalglerin büyük miktarlarda üretilmesi için araştırmalar yapılmış, takip eden yıllarda çeşitli ülkelerde alglerin büyük ölçekli üretiminde verim, kimyasal kompozisyon ve azot fiksasyonu konularında çalışılmıştır (Cirik ve Gökpınar 1993). Son yıllarda, Asya'da geniş ölçekli mikroalg özellikle *Chlorella* sp. fabrikalarda üretilmekte, genellikle sağlık gıdası olarak kültürleri yapılmaktadır. Ototrofik, miksotrofik ve heterotrofik metotlar ile bunların kombinasyonlarıyla üretim sistemleri kurulmuş olup, üretim maliyetleri bakımından her bir sistemin avantaj ve dezavantajları değerlendirilmektedir (Iwamoto 2004; Vaiciulyte vd. 2014). Halen araştırmacılar, başta biyodizel üretimi olmak üzere gıda, kozmetik, su ürünleri yetiştiriciliği, eczacılık, atık su arıtımı, anti-tümör ve anti-bakteriyel bileşikler gibi ekonomik değerleri yüksek içeriklerinden dolayı mikroalg türleri üzerinde çalışmalarına devam etmektedirler (Borowitzka ve Borowitzka 1988; Cohen 1999; Rasmussen vd. 2007; Hosikian vd. 2010).

*Chlorella*; proteince zengin olması (kuru ağırlığının yaklaşık %70'i), çeşitli vitaminler (B<sub>12</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, pantotenik asit, niasin, tokoferon) içermesi açısından insan gıdası ve hayvan yemi olarak kullanılması, ürettiği pigment maddelerinin (karotenler, ksantofiller) hayvan dokularına, kümes hayvanlarının yumurtalarına sarı renk kazandırması, çeşitli antibiyotikler (korellin) içermesi ve oksidasyon kapasitelerinin yüksek olması açısından önem taşıyan bir mikroalg türüdür (Santhosh vd. 2016). Son yıllarda, immobilize *C. vulgaris*'in ağır metal emilimi üzerinde yapılan çalışmalar başarılı sonuçlar vermiş olup, atık suların temizlenmesinde kullanılmaya başlanılmışlardır (Chu vd. 2009; Ruiz-Marin vd. 2010). *C. vulgaris* en hızlı üreyen yeşil mikroalg olarak bilinmektedir. Çeşitli besi ortamları ve farklı kültür koşullarında, içeriğindeki yağ miktarı artırılarak biyodizel üretimi konusundaki çalışmalar halen devam etmektedir (Vaiciulyte vd. 2014; Al-Iwayzy vd. 2014; Aguoru ve Okibe 2015; Hamedi vd. 2016). Mikroalg yetiştiriciliğinde, farklı besi ortamları ve kültür tekniklerinin kullanılması ile ilgili araştırmaların çoğalması hem bilim dünyası hem de çeşitli sanayi dalları için önem taşımaktadır. Bu nedenle, çalışmamız *C. vulgaris* suşlarının izole edilmesi, uygun kültür koşullarının oluşturularak laboratuvar şartlarında üretilip yığın kültürlerinin yetiştirilmesi ve bu değerli doğal kaynağın ülkemiz sanayisine kazandırılması için bir ön çalışma olarak amaçlanmış ve yürütülmüştür.

## Materyal ve Metot

### İzolasyon

Çalışmamızda kullandığımız *C. vulgaris* suşları Ankara'daki farklı havuzlardan ve su birikintilerinden toplanan örneklerden izole edilmiştir. Suşların izolasyonunda tek koloniden üretme temeline dayalı saf kültür elde etme yöntemi kullanılmıştır (Parvin vd. 2007; CSIRO 2016). Toplanan örnekler laboratuvar ortamında ön zenginleştirme için sıvı besiyerine (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O-2,50 g, KNO<sub>3</sub>-5,0 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-1,25 g, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O-0,009 g, Distile Su-1000 ml) alınmıştır. Birkaç gün sonra lam üzerine örnekler alınıp mikroskopta *C. vulgaris*'in karakteristik sporları tür teşhis anahtarı kullanılarak tespit edilmiştir (Prescott, 1973). Daha sonra kültürler (KNO<sub>3</sub>-2,5 g, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O-1,250 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-0,62 g, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O-0,009 g, Agar-5 gr, Distile Su-500 ml) bileşiminden oluşan katı besi ortamlarına ekilmiştir. Agar plakları üzerinde üreyen *C. vulgaris* kolonileri tekrar ön zenginleştirme besi ortamına alınarak saf kültürleri elde edilmiştir.

### Kültür Koşulları

Yığın kültürlerin süspansiyon halinde tutulması için bir akvaryum motoru ile kültürler hava verilmiştir. Kültürlerin ışık ihtiyaçları yapay ışıklandırma ile gerçekleştirilmiştir. Işık kaynağı (150 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) kültürlerden 22 cm uzaklığa, yatay şekilde, arkadan verilmek suretiyle yerleştirilmiştir. Kültürlere 16:8 aydınlık/karanlık periyodu uygulanmış ve 22-25°C'de oda sıcaklığında yetiştirilmiştir.

### Yığın Kültürlerin Yetiştirilmesi

Çalışmaların başlangıcında inokulum miktarının tespiti için 10 ml'lik besiyerlerine seri (10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>) ekimler yapılmıştır. Uygun kültür koşullarında inkübasyona bırakılan kültürlerden üreme olan ve olmayan tüpler kaydedilmiş ve (10<sup>-1</sup>) dilüsyon tüplerinde verimli üreme tespit edilmiştir. İnokulum miktarının tespit edilmesiyle 9 ml besiyeri +1 ml süspanse kültür olacak şekilde ekimler gerçekleştirilmiştir. Yığın kültürlerin ekimlerine 100 ml ile başlanmış, ardından 200 ml, 500 ml, 1000 ml, 2000 ml ve 4000 ml olacak şekilde küçük hacimden büyük hacime doğru gidilmiştir. Yığın kültürlerin üretiminde Bold Wynne besi ortamı (NaNO<sub>3</sub>-0,250 g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O-0,075 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-0,075 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-0,0175 g; NaCl-0,025 g; CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O-0,025 g; Distile Su-1000 ml) kullanılmıştır. *C. vulgaris* kültürlerinin kodlamaları ve alındıkları ortamlar; Gazi Üniversitesi Rektörlük Havuzu (GURH), Gazi Üniversitesi Mediko Sosyal Havuzu (GUMSH), Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Havuzu (AUFFH), Turizm Otelcilik Havuzu (TOH), Ulus İnşaat Kuyusu (UIK) şeklindedir.

### Mikroalg Büyümesinin Ölçümü

Hücre yoğunlukları, Thoma lamındaki 16 kareye düşen hücrelerin sayısıyla tespit edilmiştir. Hücre sayımları ekim işleminin başlangıcında (0), (24), (48), (96) ve (120) saatlerde yapılmıştır. Hücre yoğunlukları (Guillard ve Sieracki 2005)'e göre aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$\text{Hücre sayısı} = \frac{\left( \frac{16 \text{ kareye düşen}}{\text{toplam hücre sayısı}} \right) \times 4000 (1 \text{ karenin hacmi})}{16}$$

Verim saptamalarının tayin edilmesi kültürlerin ekiminin 7. gününde yaş ağırlıklarının ölçülmesiyle yapılmıştır. 100 ml'lik kültürlerden 50 ml, 200 ml'lik kültürlerden 100 ml, 500 ml'lik kültürlerden 250 ml, 1000 ml'lik kültürlerden 500 ml, 2000 ml'lik kültürlerden 1000 ml, 4000 ml'lik kültürlerden 2000 ml alınarak santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant etüvde belli süre bekletilip fazla olan sıvı kısmı uçurulmuş, hassas terazide ölçülerek yaş ağırlıkları tayin edilmiştir (Borçaklı 1987).

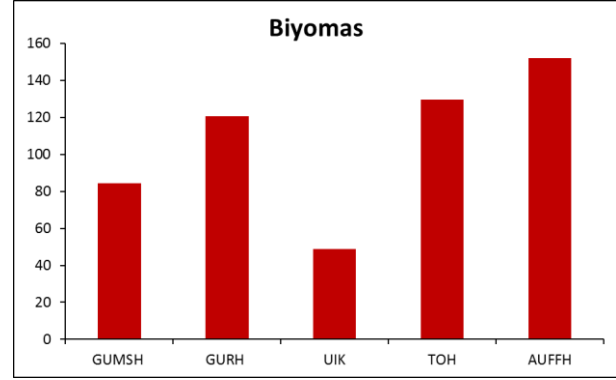
### Bulgular

*C.vulgaris* suşlarının hücre sayıları ve biyomas sonuçları Tablo 1'de verilmiştir. Ekimi takip eden saatler boyunca hücre sayıları sürekli artarak devam etmiştir. Ortamdaki besiyeri hücreler tarafından yaklaşık 20 günde tüketilmiş ve besiyeri seviyesi düşmüştür. Hücre sayıları ilk aşılama miktarına bağlı olarak artmış, biyomas ağırlıkları ise ekimi yapılan hacimlere göre, ortamda yetiştirme hızlarına ve ortama alışma sürelerine göre farklılık göstermiştir. En yüksek hücre yoğunluğu ve biyomas miktarı 4000 ml'lik hacim için AUFFH suşunda tespit edilmiştir. AUFFH suşunun hücre yoğunluğu  $6,8 \times 10^4$  h/ml, biyomas miktarı 152 (g/2000 ml) olarak bulunmuştur (Şekil 1 ve 2).

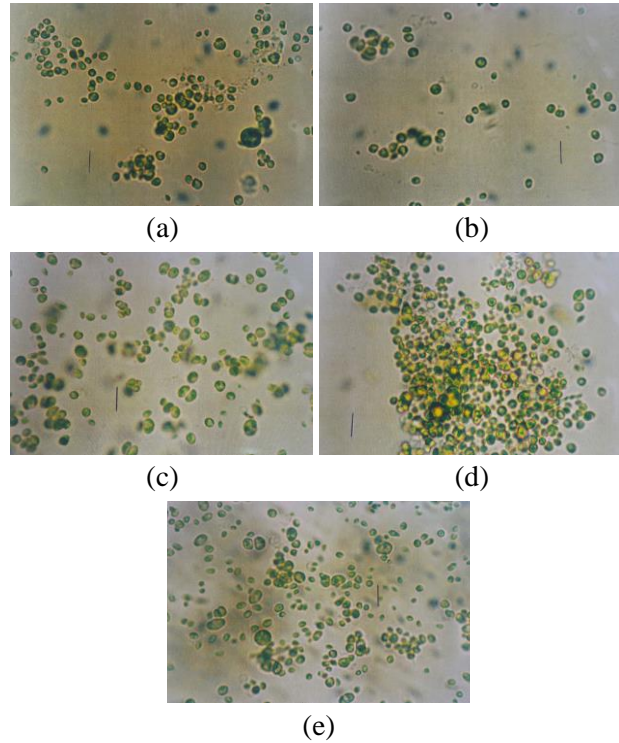
*C. vulgaris* suşlarının ekimi takiben 7. günde ışık mikroskopunda yapılan incelemelerine ait fotoğraf çekimleri Şekil 3'de verilmiştir.



Şekil 1. 4000 ml kültürlerin hücre sayıları



Şekil 2. 4000 ml kültürlerin yaş ağırlıkları



Şekil 3. Mikroskop Resimleri (10x40) (a) GURH; (b) GUMSH; (c) AUFFH; (d) TOH; (e) UIK

### Tartışma ve Sonuç

*C. vulgaris* Chlorophyta divisio'suna mensup olup, 1890'da Beyerinck tarafından tek hücreli, 1-6µ arasında değişen boyutlarda, elipsoid, küresel veya düz hücrelerden oluşan, normalde sadece tek kromatoforlu olarak tanımlanmıştır. Beyerinck tarafından tanımlanmasından bu yana bu tanımlama çok az değişmiştir (Shihira 1965). Nitekim Prescott (1968, 1973) ve Baydar (1990) tarafından *C. vulgaris* hücreleri küresel, 5-8µ ila 5-10µ büyüklükte, kloroplast periental, fical, bazen prenoidsiz, diğer algler arasında yayılmakta veya bazen yaklaşık saf yetişmiş olarak bulunmakta olup morfolojik olarak da kokkoid tipe girdiği ifade edilmiştir.

**Tablo 1.** *C. vulgaris* Suşlarının Hacimlere Göre Hücre Sayıları ve Biyomas Ağırlıkları

Kültürler	Hacim (ml)	Saatlere Göre Hücre Miktarı (h/ml)					Biyomas
		0	24	48	96	120	
GURH	100	3,6x10 <sup>4</sup>	4,2x10 <sup>4</sup>	4,8x10 <sup>4</sup>	5,5x10 <sup>4</sup>	5,8x10 <sup>4</sup>	1,3 (g/50 ml)
	200	3,9x10 <sup>4</sup>	4,6x10 <sup>4</sup>	4,8x10 <sup>4</sup>	5,6x10 <sup>4</sup>	5,9x10 <sup>4</sup>	3,5 (g/100 ml)
	500	3,4x10 <sup>4</sup>	3,8x10 <sup>4</sup>	4,5x10 <sup>4</sup>	5,1x10 <sup>4</sup>	5,4x10 <sup>4</sup>	3,5 (g/250 ml)
	1000	3,3x10 <sup>4</sup>	3,8x10 <sup>4</sup>	4,1x10 <sup>4</sup>	4,2x10 <sup>4</sup>	4,3x10 <sup>4</sup>	5,8 (g/500 ml)
	2000	2,3x10 <sup>4</sup>	3,1x10 <sup>4</sup>	4,1x10 <sup>4</sup>	4,4x10 <sup>4</sup>	4,8x10 <sup>4</sup>	12,6 (g/1000 ml)
	4000	2,9x10 <sup>4</sup>	3,9x10 <sup>4</sup>	5,9x10 <sup>4</sup>	5,7x10 <sup>4</sup>	6,2x10 <sup>4</sup>	120,8 (g/2000 ml)
GUMSH	100	3,9x10 <sup>4</sup>	4,6x10 <sup>4</sup>	5,1x10 <sup>4</sup>	5,7x10 <sup>4</sup>	6,9x10 <sup>4</sup>	1,9 (g/50 ml)
	200	3,5x10 <sup>4</sup>	3,7x10 <sup>4</sup>	4,1x10 <sup>4</sup>	4,2x10 <sup>4</sup>	4,8x10 <sup>4</sup>	2,8 (g/100 ml)
	500	3,3x10 <sup>4</sup>	4,6x10 <sup>4</sup>	5,1x10 <sup>4</sup>	5,7x10 <sup>4</sup>	6,1x10 <sup>4</sup>	5,7 (g/250 ml)
	1000	2,8x10 <sup>4</sup>	2,9x10 <sup>4</sup>	3,5x10 <sup>4</sup>	3,6x10 <sup>4</sup>	4,1x10 <sup>4</sup>	8,3 (g/500 ml)
	2000	2,2x10 <sup>4</sup>	2,7x10 <sup>4</sup>	4,2x10 <sup>4</sup>	4,4x10 <sup>4</sup>	4,7x10 <sup>4</sup>	19,0 (g/1000 ml)
	4000	3,2x10 <sup>4</sup>	3,9x10 <sup>4</sup>	4,7x10 <sup>4</sup>	6,1x10 <sup>4</sup>	6,1x10 <sup>4</sup>	84,3 (g/2000 ml)
AUFFH	100	4,3x10 <sup>4</sup>	4,6x10 <sup>4</sup>	5,1x10 <sup>4</sup>	5,3x10 <sup>4</sup>	6,5x10 <sup>4</sup>	1,1 (g/50 ml)
	200	4,1x10 <sup>4</sup>	4,7x10 <sup>4</sup>	4,9x10 <sup>4</sup>	5,7x10 <sup>4</sup>	6,2x10 <sup>4</sup>	1,8 (g/100 ml)
	500	4,3x10 <sup>4</sup>	4,6x10 <sup>4</sup>	4,7x10 <sup>4</sup>	5,1x10 <sup>4</sup>	5,5x10 <sup>4</sup>	3,6 (g/250 ml)
	1000	2,7x10 <sup>4</sup>	3,9x10 <sup>4</sup>	4,7x10 <sup>4</sup>	4,8x10 <sup>4</sup>	5,2x10 <sup>4</sup>	7,0 (g/500 ml)
	2000	3,9x10 <sup>4</sup>	4,4x10 <sup>4</sup>	5,5x10 <sup>4</sup>	6,1x10 <sup>4</sup>	6,7x10 <sup>4</sup>	43,0 (g/1000 ml)
	4000	4,2x10 <sup>4</sup>	4,7x10 <sup>4</sup>	5,3x10 <sup>4</sup>	5,9x10 <sup>4</sup>	6,8x10 <sup>4</sup>	152,0 (g/2000 ml)
TOH	100	3,3x10 <sup>4</sup>	3,6x10 <sup>4</sup>	4,1x10 <sup>4</sup>	4,4x10 <sup>4</sup>	4,5x10 <sup>4</sup>	0,7 (g/50 ml)
	200	3,6x10 <sup>4</sup>	4,1x10 <sup>4</sup>	4,4x10 <sup>4</sup>	4,6x10 <sup>4</sup>	5,1x10 <sup>4</sup>	1,4 (g/100 ml)
	500	2,7x10 <sup>4</sup>	3,6x10 <sup>4</sup>	4,5x10 <sup>4</sup>	5,3x10 <sup>4</sup>	6,1x10 <sup>4</sup>	4,7 (g/250 ml)
	1000	3,2x10 <sup>4</sup>	4,3x10 <sup>4</sup>	5,1x10 <sup>4</sup>	5,6x10 <sup>4</sup>	5,8x10 <sup>4</sup>	8,3 (g/500 ml)
	2000	3,4x10 <sup>4</sup>	3,7x10 <sup>4</sup>	5,3x10 <sup>4</sup>	5,8x10 <sup>4</sup>	6,6x10 <sup>4</sup>	62,2 (g/1000 ml)
	4000	3,5x10 <sup>4</sup>	3,9x10 <sup>4</sup>	5,4x10 <sup>4</sup>	5,9x10 <sup>4</sup>	6,7x10 <sup>4</sup>	129,6 (g/2000 ml)
UIK	100	3,4x10 <sup>4</sup>	3,8x10 <sup>4</sup>	4,8x10 <sup>4</sup>	4,9x10 <sup>4</sup>	5,3x10 <sup>4</sup>	0,6 (g/50 ml)
	200	4,1x10 <sup>4</sup>	4,7x10 <sup>4</sup>	4,9x10 <sup>4</sup>	5,6x10 <sup>4</sup>	6,1x10 <sup>4</sup>	2,0 (g/100 ml)
	500	4,1x10 <sup>4</sup>	4,7x10 <sup>4</sup>	4,9x10 <sup>4</sup>	5,4x10 <sup>4</sup>	6,2x10 <sup>4</sup>	5,9 (g/250 ml)
	1000	2,5x10 <sup>4</sup>	3,2x10 <sup>4</sup>	4,7x10 <sup>4</sup>	4,7x10 <sup>4</sup>	5,2x10 <sup>4</sup>	11,7 (g/500 ml)
	2000	3,4x10 <sup>4</sup>	4,2x10 <sup>4</sup>	5,2x10 <sup>4</sup>	5,9x10 <sup>4</sup>	6,9x10 <sup>4</sup>	29,4 (g/1000 ml)
	4000	3,1x10 <sup>4</sup>	3,7x10 <sup>4</sup>	4,5x10 <sup>4</sup>	5,3x10 <sup>4</sup>	6,3x10 <sup>4</sup>	48,8 (g/2000 ml)

Laboratuvarda mikroskop çalışmamız sırasında 10x40'lık objektifte, *C. vulgaris* hücrelerinin büyüklükleri 6 ila 10µ arasında tespit edilmiştir. Bazı suşların diğerlerine göre daha küçükken bazılarının da daha büyük olduğu gözlenmiştir. GURH suşunda hücreler oldukça büyük ve yaklaşık 10µ (Şekil 3a), GUMSH suşunda hücreler tipik kloroplasta sahip 10µ (Şekil 3b), AUFFH suşunda hücreler 6 ila 10µ arasında (Şekil 3c), TOH suşundaki hücreler 6µ (Şekil 3d), UIK suşunda hücreler daha küçük, yoğun ve 5µ (Şekil 3e) büyüklüğünde ölçülmüşlerdir.

Alglerin yaşama ortamlarının incelenmesi sonucunda bu organizmaların belirli besin maddelerine gereksinim duydukları kesin olarak ortaya çıkarılmıştır. Yapılan çalışmalara göre algler karbon, azot, fosfor, kükürt, magnezyum, sodyum,

potasyum, demir, mangan, iz elementler ve organik faktörlere gereksinim duymaktadırlar (Schenk vd. 2008; Kumar ve Das 2012; Feng vd. 2012). Araştırmamızda Bold Wynne besiyeri hazırlanmış, bu besi ortamında *C. vulgaris*'in maksimum üreme hızının yapılan deneyler sonucunda pH 6,5-7 aralığında olduğu tespit edilmiş ve çalışmalar bu pH aralığında yapılmıştır.

Alg kültürleri bir ışık kaynağına ihtiyaç duyarlar. Çünkü ışık fotosentezin enerji kaynağıdır. Işık yoğunluğuna karşı fotosentez hızı doğrusal bir şekilde artar. Yüksek ışık yoğunlukları fotosentezi inhibe eder, düşük yoğunlukları ise fotosentezi sınırlayıcı özelliğe sahiptir. Işığın yoğunluğu ve süresi kültürlerin verimliliği açısından önemlidir. Başlangıçta ışık yoğunluğuna paralel şekilde artan

organik üretim, kültürün daha ileri safhalarında sınırlayıcı bir faktör olarak ortaya çıkmaktadır. Bu sınırlayıcı etki ortamdaki hücre konsantrasyonunun bir sonucu olarak hücrelerin birbirlerini gölgelemesi ve ışığa doygun hale gelen hücrelerin daha fazla ışık enerjisi kullanmaması nedeniyle olur (Borcaklı 1987; Benli ve Uçal 1990). Az yoğun kültürlerde gelen ışığın ancak %2'si 7 cm derinliğe inerken, orta yoğun kültürlerde bu oran %20 yani 3 cm'lik tabakalara ulaşabilir (Cirik ve Gökpinar 1993). Bu da kültürlerdeki verimi azaltmaktadır. Kültür uygulamaları suni aydınlatma kaynakları ile yürütülecekse, bunların güneş ışığına eşdeğer kaynaklar olmasına dikkat edilmelidir. Bu işlem için genellikle floresan lambalar (daylight veya COO-white) ve karanlık/aydınlık farklı periyotlar kullanılmaktadır (Amini vd. 2012). Yaptığımız çalışmalarda daylight floresan lambalar ( $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) ile 16:8 aydınlık/karanlık periyodu uygulandığında maksimum üreme tespit edilmiştir.

Alg kültürlerinin biyolojik aktiviteleriyle ortam sıcaklıkları arasında genel bir ilişki bulunmaktadır. Büyüme hızları belirli bir optimuma kadar sıcaklığa bağlı olarak artar. Ancak, bu noktadan sonra azalmaya başlar (Behrens 2005). Bu optimum pek çok deniz ve tatlısu türleri için 18-25 °C aralığındadır. Sabit sıcaklıktaki kültür koleksiyonu odaları genellikle 18 °C'de tutulur (Cirik ve Gökpinar 1993). Bu nedenle alg kültür salonlarındaki sıcaklığın kontrol edilmesi, düzensiz sıcaklık değişimlerini önlemek için önem taşımaktadır. Kültürlerimizin yetiştirildiği laboratuvar ortamında sıcaklık 22-25 °C olarak ölçülmüş ve bu sıcaklık değerinin sabit kaldığı tespit edilmiştir.

Güneş enerjisi sayesinde sulardaki yeşil bitkilerin oluşturduğu canlı madde biyomas olup, belli bir zamanda belirli bir alan veya hacimde üretilen canlı madde miktarı olarak ifade edilir. Kültürlerin kantitatif değerlendirilmesi hücre sayısı, optik yoğunluk, kuru veya yaş ağırlık, klorofil miktarı, organik karbon vb. gibi algal büyümeyle ilgili parametrelerin hassas bir şekilde ölçülmesiyle elde edilir (Cirik ve Gökpinar 1993; Andersen 2005).

Algal büyümedeki karakteristik fazlar kesikli kültür tekniği ile yapılan kültürlerde görülebilir. Kültür ortamına aşılana hücrelerin büyümeye başlamadan önce ortama uyum için bir duraklama devresi geçirmesi, sonra logaritmik bir şekilde artması, belli bir noktada büyümenin yavaşlayarak sabit bir evreye girmesi kesikli kültürlerde gözlenir (Chia vd. 2013; Hakalin vd. 2014). Belirli bir müddet sonra üremeye başlayan hücreler ortamdaki nutrientlerin tükenmesi ve büyümenin ulaştığı maksimum noktada ışığa doygun hücrelerin oluşması gibi faktörlerin etkisi ile hücrelerin ulaştıkları bir

maksimumdan sonra büyüme durmaktadır (Becker 1994). Önceki çalışmalarımızda 6 farklı besi yerinde 10 ml'lik tüplerin içerisinde *C. vulgaris* şuşlarının yetiştirilmesi yapılmıştır. Bu çalışma sonrasında en iyi üreme gösteren 5 suş ve hücre sayısı bakımından en iyi üredikleri besi ortamı olarak tespit edilen Bold Wynne yığın kültür üretilmesi için seçilmiştir. 4000 ml'lik yığın kültürlerin 120. saatte yapılan hücre sayımlarında en yüksek değer AUFFH suşunda  $6,8 \times 10^4$  h/ml olarak tespit edilmiş, bu suşu sırasıyla TOH  $6,7 \times 10^4$  h/ml, UIK  $6,3 \times 10^4$  h/ml, GURH  $6,2 \times 10^4$  h/ml ve GUMSH  $6,1 \times 10^4$  h/ml suşları izlemiştir. Yaş ağırlıkları açısından 4000 ml'lik yığın kültürler için yine AUFFH 152 (g/2000 ml) ile en yüksek miktar elde edilirken onu sırasıyla TOH 129,6 (g/2000 ml), GURH 120,8 (g/2000 ml), GUMSH 84,3 (g/2000 ml), UIK 48,8 (g/2000 ml) takip etmiştir. AUFFH, TOH, GUMSH ve GURH suşlarının hücre sayıları ve biyomas miktarları birbirlerine orantılı çıkmakla birlikte UIK suşunun hücre sayısı yüksek çıkarken biyomasının diğerlerine nazaran daha düşük çıktığı gözlenmiştir. Bunun nedeninin UIK suşundaki hücrelerin üreme sonrası gelişen yeni genç hücreler olabileceği düşünülmektedir. Vaiciulyte vd. (2014) kültürlerin yağ içeriklerinin artırılması için farklı besi ortamları ile yaptıkları yığın kültür üretimi çalışmalarında hücre sayılarını 230-250 (hücre  $\times 10^6/L$ ), kuru ağırlıklarını 2,04-2,2 g/L olarak tespit etmişlerdir. Chia vd. (2013) yılında yaptığı çalışmada, hücre sayısının biyomas için önemli bir parametre olduğunu belirterek besi ortamına göre değiştiğini ifade etmiştir. *C. vulgaris* ile yaptıkları bu çalışmada LC Oligo ortamından yüksek algal üreme ve hücre yoğunluğunu elde ettiklerini ( $2,74 \times 10^6$  hücre  $\text{mL}^{-1}$ ) belirtmiştir. Bu sonuçlar bizim değerlerimiz ile paralellik göstermektedir.

Sonuç olarak mikroalglerden elde edilen pigmentler (Hosikian vd. 2010), besin maddeleri ile tıbbi takviyeler (Rasmussen vd. 2007), ağır metallerin sulardan temizlenmesi (Chu vd. 2009; Ruiz-Marin vd. 2010), karbondioksit emisyonunun düşürülmesi ve biyodizel (Al-Iwayzy vd. 2014; Brennan ve Owende 2009) üretimi bu mikroorganizmaların ne kadar önemli olduklarını göstermektedir. Bu çalışmanın sonucunda kesikli kültür sisteminde mikroalg yetiştiriciliği için gerekli koşulların araştırılarak sağlandığı, inokulum miktarının mikroalg büyümesindeki etkisi, farklı ışık/karanlık döngüleri, sıcaklık, pH ve besleyici ortam formülasyonları gibi diğer parametrelerin etkileri ile Bold Wynne besi ortamının hücre sayısı ve biyomas ağırlığını artırdığı gözlenmiştir. Böylece mikroalg türlerinin izole edilerek yetiştirilmesi için tecrübe kazanılmış ve farklı türlerin izolasyonu ve yetiştirilmesi çalışmalarına başlanmıştır.

## Kaynaklar

- Aguoru CU, Okibe PO. 2015. Content and composition of lipid produced by *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Advances in Life Science and Tech.* 36 (2015):96-100.
- Al-lwayzy SH, Yusaf T, Al-Juboori RA. 2014. Biofuels from the Fresh Water Microalgae *Chlorella vulgaris* (FWM-CV) for Diesel Engines. *Energies* 7(3):1829-1851.  
doi:10.3390/en7031829
- Amini KZ, Seyfabadi J, Ramezounpour Z. 2012. Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Aquacult. Int.* 20(1):41-49.  
doi: 10.1007/s10499-011-9440-1
- Andersen RA. 2005. *Algal culturing techniques*. Burlington: Elsevier Academic Press 578 p.
- Baydar S. 1990. Tohumuz bitkiler sistematiği. Trabzon: Karadeniz Teknik Üniversitesi 261 s.
- Becker EW. 1994. *Microalgae: biotechnology and microbiology*. New York: Cambridge University Press 293 p.
- Behrens PW. 2005. Photobioreactors and fermentors: the light and dark sides of growing algae. In: Andersen RA, editors. *Algal culturing techniques*, London: Elsevier Academic Press. p. 189-204.
- Benli HA, Uçal O. 1990. Deniz canlı kaynakları yetiştirme teknikleri. Bodrum: T.C. Tarım, Orman ve Köy İşleri Bakanlığı, Su Ürünleri Araştırma Ens. Müd. Seri A. Yayın no:3 105 s.
- Borcaklı M. 1987. Yeni gıda kaynağı olarak mikroalgler ve üretim yöntemleri. Kocaeli: TÜBİTAK MAM Beslenme ve Gıda Teknolojileri ile Soğutma Tekniği Araştırma Bölümü. Cilt 2. Yayın no:12. 73-86.
- Borowitzka MA, Borowitzka JL. 1988. *Micro-algal biotechnology*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Brennan L, Owende P. 2009. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14(2):557-577.  
doi:10.1016/j.rser.2009.10.009
- Chia MA, Lombardi AT, Melao MDG. 2013. Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media. *An Acad Bras Cienc.* 85(4):1427-1438.  
doi: 10.1590/0001-3765201393312
- Chu WL, See TC, Phang SM. 2009. Use of immobilised *Chlorella vulgaris* for the removal of colour from textile dyes. *J Appl Phycol.* 21(6): 641-648.  
doi: 10.1007/s10811-008-9396-3
- Cirik S, Gökpinar Ş. 1993. *Plankton Bilgisi ve Kültürü*. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi 274 s.
- Cohen Z. 1999. *Chemical from Microalgae*. London: Taylor&Francis UK 419 p.
- CSIRO 2016. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation. *Microalgal Isolation Techniques*; [Erişim Tarihi: 29.11.2016]. Erişim Adresi:<http://www.marine.csiro.au/microalgae/methods/microalgal%20isolation%20techniques.htm>
- Feng P, Deng L, Hu F. 2012. Lipid accumulation and growth characteristics of *Chlorella zofingiensis* under different nitrate and phosphate concentrations. *J Biosci Bioeng.* 114(4):405-410.  
doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.05.007
- Guillard RRL, Sierachiki MS. 2005. Counting cells in cultures with the light microscope. In: Andersen RA, editors. *Algal culturing techniques*, London: Elsevier Academic Press. p. 239-252.
- Hakalin NLS, Paz AP, Aranda DAG, Moraes LMP. 2014. Enhancement of cell growth and lipid content of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. by optimizing nitrogen, phosphorus and vitamin concentrations for biodiesel production, *Natural Science.* 6(12):1044-1054.  
doi: 10.4236/ns.2014.612095
- Hamed S, Mahdavi MA, Gheshlaghi R. 2016. Improved lipid and biomass productivities in *Chlorella vulgaris* by differing inoculation medium from production medium. *Biofuel Research Journal* 10(2016):410-416.  
doi: 10.18331/BRJ2016.3.2.6
- Hosikian A, Lim S, Halim R, Danquah KM. 2010. Chlorophyll extraction from microalgae: A review on the process engineering aspects. *International Journal of Chemical Engin.* 2010:1-11.  
doi: 10.1155/2010/391632
- Iwamoto H. 2004. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products-major industrial species *Chlorella*. In: Richmond A, editors. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. UK: Blackwell Science 255-263.
- Kumar K, Das D. 2012. Growth characteristics of *Chlorella sorokiniana* in airlift and bubble column photo-bioreactors. *Bioresour Technol.* 116:307-313.  
doi: 10.1016/j.biortech.2012.03.074
- Murdock JN, Wetzel DL. 2009. FT-IR Microspectroscopy enhances biological and ecological analysis of algae. *Appl. Spectros.* 44(4):335-361.  
doi: 10.1080/05704920902907440
- Parvin M, Zannat MN, Habib MAB. 2007. Two important technique for isolation of microalgae. *Asian Fisheries Science.* 20(1):117-124.
- Prescott GW. 1968. *The algae*. Boston: Michigan State University p. 37-67.
- Prescott GW. 1973. *Algae of the Western Great Lakes Area*. Michigan: Michigan State University Department of Botany and Plant Pathology 1004 p.
- Rasmussen RS, Morrissey T, Steve LT. 2007. Marine biotechnology for production of food ingredients. *Advances in Food and Nutrition Res.* 52 (2007):237-292.  
doi: 10.1016/S1043-4526(06)52005-4
- Richmond A. 2004. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. 2nd ed. Australia: Blackwell Science Ltd. 719 p.
- Ruiz-Marin A, Mendoza-Espinosa L, Stephenson T. 2010. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technol.* 101(1): 58-64.  
doi: 10.1016/j.biortech.2009.02.076

- Santhosh S, Dhandapani R, Hemalatha NA. 2016. A Review on potential biotechnological applications of microalgae. J App Pharm Sci. 6(08): 179-184.  
[doi: 10.7324/JAPS.2016.60829](https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.60829)
- Schenk PM, Thomas-Hall SR, Stephens E, Marx UC, Mussgnug JH, Posten C, Kruse O, Hankamer B. 2008. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodisel production. BioEnergy Res. 1(1):20-43.  
[doi: 10.1007/s12155-008-9008-8](https://doi.org/10.1007/s12155-008-9008-8)
- Shihira I. 1965. Chlorella physiology and taxonomy of forty-one isolates. Maryland: University of Maryland, College Park 97 p.
- Vaiciulyte S, Padovani, G, Kostkeviciene J, Carozzi P. 2014. Batch growth of *Chlorella vulgaris* CCALA 896 versus semi-continuous regimen for enhancing oil-rich biomass productivity. Energies 7(6):3840-3857.  
[doi:10.3390/en7063840](https://doi.org/10.3390/en7063840)