



Chlorella sorokiniana'nın İzolasyonu, Moleküler Tanılanması, Fototrofik, Miksotrofik ve Heterotrofik Üretimi

Döndü YALÇIN BİNGÜL¹ , Zeliha DEMİREL² , Meltem CONK DALAY^{2*} 

¹ Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Aydın, Türkiye

² Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir, Türkiye

ÖZ

İzmir'in Gümüldür bölgesinden alınan su örneğinde, seyreltme ve dökme plaka yöntemleri kullanılarak mikroalg izolasyonu yapılmıştır. Işık mikroskopuyla morfolojik olarak değerlendirilen türün *Chlorella* sp. olduğu saptanmıştır. Moleküler yöntemlerle mikroalg DNA'sı izole edilerek 16S ve 18S rRNA gen bölgeleri PCR'da çoğaltılmıştır. Bu dizinin sekanslanması ve filogenetik olarak değerlendirilmesi sonucu *Chlorella sorokiniana* olduğu belirlenmiştir. Aksenik *C. sorokiniana* elde etmek için santrifüj ile yıkama, antibiyotik ile muamele, agar ortamında büyütme ve tek hücre izolasyonu gibi farklı yöntemler kullanılarak aksenikleştirme işleminden başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Fototrofik *C. sorokiniana*'dan elde edilen biyokütle (0,19 g L⁻¹) ve spesifik büyüme hızı (0,78 gün⁻¹), miksotrofik *C. sorokiniana*'dan elde edilen biyokütle (0,31 g L⁻¹) ve spesifik büyüme hızı (1,3 gün⁻¹), heterotrofik *C. sorokiniana*'dan elde edilen biyokütle (0,6 g L⁻¹) ve spesifik büyüme hızı (2,52 gün⁻¹) olarak belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre aksenik mikroalg *C. sorokiniana*'nın farklı üretim koşullarındaki biyokütle verimliliği şu şekilde sıralanabilir: heterotrofi>miksotrofi>fototrofi.

Anahtar kelimeler: *Chlorella sorokiniana*, moleküler tanılama, fototrofi, miksotrofi, heterotrofi

MAKALE BİLGİSİ

ARAŞTIRMA MAKALESİ

Geliş : 19.03.2020

Düzeltilme : 05.01.2021

Kabul : 10.01.2021

Yayım : 26.08.2021

DOI:10.17216/LimnoFish.703234



* SORUMLU YAZAR

meltem.dalay@ege.edu.tr

Tel : +90 232 388 49 55

Isolation, Molecular Identification, Phototrophic, Mixotrophic and Heterotrophic Production of *Chlorella sorokiniana*

Abstract: Microalgae was isolated using dilution and pouring plate method from the sea water sample taken from the Gumuldur region of Izmir. The species was identified as *Chlorella* sp. through morphologic evaluation under light microscope. Microalgae DNA was isolated through molecular methods and 16S and 18S rRNA gene regions were amplified by means of PCR. As a result of sequencing and phylogenetic evaluation of the gene regions, it was determined that the microalgae was *Chlorella sorokiniana*. Different methods such as centrifuge washing, antibiotic treatment, growth on agar and single cell isolation used to obtain axenic *C. sorokiniana* yielded successful results. Biomass and specific growth rate of phototrophic *C. sorokiniana* (0.19 g L⁻¹ and 0.78 days⁻¹, respectively), mixotrophic *C. sorokiniana* (0.31 g L⁻¹ and 1.3 days⁻¹, respectively) and heterotrophic *C. sorokiniana* (0.6 g L⁻¹ and 2.52 days⁻¹, respectively) were determined. According to the findings obtained, the biomass productivity of axenic *C. sorokiniana* under different culture conditions can be ordered as: heterotrophy > mixotrophy > phototrophy.

Keywords: *Chlorella sorokiniana*, molecular identification, phototrophy, mixotrophy, heterotrophy

Alıntılama

Yalçın Bingül D, Demirel Z, Conk Dalay M. 2021. *Chlorella sorokiniana*'nın İzolasyonu, Moleküler Tanılanması, Fototrofik, Miksotrofik ve Heterotrofik Üretimi. LimnoFish. 7(2): 128-137. doi: 10.17216/LimnoFish.703234

Giriş

Dünyada 30.000' den fazla mikroalg türü vardır ve bunlardan sadece 100' e yakını ekonomik açıdan değerlendirilmektedir (Sasson 1997; Borowitzka 1992). Mikroalgler, gelişmiş ülkelerde, pigmentler gibi yüksek katma değerli bileşiklerin elde edilmesinde, gıda endüstrisi ve sağlık amaçlı gıda

üretiminde; gelişmekte olan ülkelerde ise atık arıtımı ve proteince zengin gıda ve yem katkısı üretimini birleştiren küçük ölçekli projeler ile büyük ölçekli atık su arıtımında kullanılırlar (Sasson 1997). Mikroalglerin kimyasal kompozisyonu türe ve kültür koşullarına göre değişmekle (Zhu 2015) birlikte genellikle

protein (%10-63) (Becker 2007; Miao ve Wu 2004) karbonhidrat (%6-57) (Yeh vd. 2010; Hariskos ve Posten 2014) ve lipitler (%4-55) (Becker 2007; Miao ve Wu 2004) gibi primer metabolitlerden oluşur.

Mikroalgler, genellikle ototrofik olarak yaşarlar ve fotosentez yaparak, karbondioksit, su ve güneş ışığını biyokütleye dönüştürürler (Pragya vd. 2013; Zhu 2015). Fakat bazı mikroalg türleri enerji ve karbon kaynağı olarak organik substratları kullanarak heterotrofik ve mikсотotrofik olarak da gelişebilirler (Chen 1996; Lee 2001). Örneğin, *Chlorella vulgaris* (Mitra vd. 2012), *Chlorella sorokiniana* (Wang vd. 2012), *Chlorella zofingiensis* (Liu vd. 2011), *Haematococcus pluvialis* (Kobayashi vd. 1992), *Spirulina platensis* (Marquez vd. 1993) ve *Botryococcus braunii* (Zhang vd. 2011) ototrofik, heterotrofik ve mikсотotrofik şartlar altında

gelişebilmektedir (Kim vd. 2013).

Heterotrofik kültürler, ışısız koşullar altında tek karbon kaynağı olarak organik karbonu kullanırlar. Mikсотotrofik kültürler ise ototrofik ve heterotrofik beslenmenin birleşimi bir karakteristik gösterirler, karbon kaynağı olarak hem organik hem de inorganik karbonu kullanırlar (Kim vd. 2013; Chen vd. 2011). Heterotrofik ve mikсотotrofik büyümede genellikle organik karbon kaynağı olarak glikoz, galaktoz, mannoz, fruktoz, sükröz ve laktoz kullanılmaktadır (Abreu vd. 2012). Organik karbondan elde edilen enerji, hücre sentezinde kullanılırken, ışık enerjisinden dönüştürülen kimyasal enerji depolanmaktadır (Chojnacka ve Marquez-Rocha 2004). Mikroalg kültür koşullarına bağlı enerji ve karbon kaynakları ve metabolit yolağına göre pH değişimi Tablo 1' de gösterilmektedir.

Tablo 1. Ototrofik, heterotrofik ve mikсотotrofik şartlarda enerji ve karbon kaynağı, pH değişiminin özeti

Table 1. Summary of energy and carbon source, pH change in autotrophic, heterotrophic and myxotrophic conditions			
Kültür tipi	Enerji kaynağı	Karbon kaynağı	Metabolizma
Ototrof	Işık	İnorganik	$H_2O + HCO_3^- \rightarrow C(\text{biyokütle}) + 1/2 O_2 + 3OH^-$: pH artar.
Heterotrof	Organik	Organik	$(1+a)CH_2O + O_2 \rightarrow C(\text{biyokütle}) + aCO_2 + (1+a)H_2O$: pH azalır.
Mikсотotrof	Işık ve organik	İnorganik ve organik	$bHCO_3 + cCH_2O \rightarrow (b+(c-a))C(\text{biyokütle}) + 3OH^- + aCO_2$: pH değişkendir.

Ototrofik mikroalgler, inorganik karbonu kullanırlar ve hidroksil üreterek pH'ı yükseltirler. Heterotrofik mikroalgler, organik karbonu kullanırlar ve CO_2 üreterek pH'ı düşürürler. Mikсотotrofik mikroalgler eş zamanlı olarak hem organik hem de inorganik karbonu kullanırlar ve pH değeri değişkenlik göstermektedir. (Elcik ve Çakmakçı 2017).

Literatür taraması sonucu ototrofik, heterotrofik ve mikсотotrofik mikroalg büyüme hızı sırasıyla 0,2-0,7 gün⁻¹, 0,4-0,9 gün⁻¹ ve 0,3-0,6 gün⁻¹ arasında değişmektedir. Heterotrofik mikroalglerin büyüme hızının, diğer kültür tipleriyle kıyaslandığında daha yüksek olduğu görülmektedir. Heterotrofik büyüme şekli özellikle değerli kimyasalların ve farmasötiklerin üretimi için uygundur.

Yapılan bu çalışmada, yerel bir kaynaktan izole edilen örneğin morfolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak tür teşhisi yapılmış ve *Chlorella sorokiniana* olduğu saptanmıştır. Biyoteknolojik olarak önemli bir tür olan *C. sorokiniana* fototrofik, mikсотotrofik ve heterotrofik üretim potansiyeli açısından değerlendirilmiştir. Sonuç olarak en

verimli üretim yöntemi heterotrofik şartlar altında sağlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada kullanılan *Chlorella sorokiniana* İzmir'in Gümüldür bölgesinden izole edilmiştir. ESW (Enriched Seawater) ortamı kullanılarak türün kültürü yapılmıştır (Tablo 2) (Provasoli 1963, 1968; McLachlan 1973).

ESW ortamı hazırlamak için 1L steril edilmiş deniz suyuna 20 mL/L zenginleştirilmiş çözelti (Enrichment Seawater Solution) eklenerek pH 7,8 olarak ayarlanmıştır. Heterotrofik ve mikсотotrofik kültürlerde karbon kaynağı olarak glukoz (3 g/L) kullanılmıştır.

Kültürü yapılan mikroalg örneği düzenli aralıklarla kültür ortamları ile seyreltilerek ve dökme plaka yöntemi kullanılarak izole edilmiştir. Kültüre alınan örnek agar (%1,5) besiyerine ve yatık agara çizgi ekim metodu uygulanarak saklanmıştır (Sukatar 2002). Safılaştırılan tür, 25°C'de ve sürekli aydınlatmada (Wiselight marka 24W day-light) steril agar üzerinde inkübasyona bırakılmıştır.

Tablo 2. ESW (Zenginleştirilmiş Deniz Suyu) ortamının hazırlanışı**Table 2.** Preparation of ESW (Enriched Seawater) medium

Kimyasal	Miktar	Son konsantrasyon
NaNO ₃	2,35 g/L	34 mM
Na ₂ gliserofosfat.5H ₂ O	0,35 g/L	1,6 mM
ES Fe Çözeltisi	163 mL/L	
P-II Metal Çözeltisi	163 mL/L	
Tris	1 g/L	
Vitamin B12	1,5 mL/L	
Biotin Vitamin Çözeltisi	1,5 mL/L	
Tiamin Vitamin Çözeltisi	1,5 mL/L	
ES Fe Çözeltisi		
Kimyasal	Miktar	Son konsantrasyon
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,35 g/500 mL	1,8 mM
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,30 g/500 mL	1,6 mM
P-II Metal Çözeltisi		
Kimyasal	Miktar	Son konsantrasyon
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,1 g/100 mL	0,27 mM
H ₃ BO ₃	0,114 g/100mL	1,8 mM
MnSO ₄ .H ₂ O	16,4 mg/100 mL	0,097 mM
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,2 mg/100 mL	0,007 mM
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,48 mg/100 mL	0,002 mM
Vitamin Çözeltisi		
Kimyasal	Miktar	
Vitamin B12	0,0135 g/100 mL	
Biotin	0,0025 g/100 mL	
Tiamin	0,11 g/100 mL	

Saflaştırılan mikroalgin morfolojik tayini için ışık mikroskobu (Olympus CH40) kullanılmıştır. Moleküler tür tayini için mikroalg DNA'ları, ZRFungal/Bacterial DNA Kiti kullanılarak saflaştırılmıştır. 50-100 mg agar yüzeyinden alınan mikroalg hücresi 200 µl ultra saf su içerisinde porselen boncukların olduğu tüpe alınarak üzerine lizis solüsyonu eklendikten sonra hücrelerin parçalanması için maksimum hızda 5 dk vorteks yapılmıştır. Lizis tüpü 10.000 x g de 1 dk santrifüjlendikten sonra Spin filter tüpüne aktarılan süpernatant 7.000 rpm de 1 dk santrifüj edilmiş ve DNA Binding Tamponu eklenerek toplama tüpüne ilave edilmiştir. Zymo-Spin Column toplama tüpü içerisine yerleştirilen ve 10.000 x g 1 dk santrifüj edilen Zymo-Spin Column yeni toplama tüpü içerisine yerleştirilir ve filtre üzerine DNA Pre-Wash Tamponu ilave edilip, 10.000 x g 1 dk santrifüjlendikten sonra 500 µl DNA Wash Tamponu ilave edilir ve sonra tekrar aynı şekilde santrifüjlenir. Zymo-Spin Column 1,5 ml steril ependorf içerisine dikkatlice yerleştirilir ve üzerine DNA Elution Tamponu ilave edilerek 10.000 x g 30 saniye santrifüjlenerek filtrede tutulan DNA'nın ependorf içerisine toplanması sağlanmıştır. Mikroalg genlerinin spesifik bölgelerinin PCR (HelixAmp™ HyberSense DNA polimeraz

(Nanohelix) kiti) yöntemiyle amplifikasyonları için mikroalglerin gen bölgelerine özgül primer dizileri 16S rRNA 359F (5'-GGG GAA TYT TCC GCA ATG GG-3') -781R(a) (5'-GAC TAC TGG GGT ATC TAA TCC CAT T-3') ve (b) (5'-GAC TAC AGG GGT ATC TAA TCC CTT T-3') ve ayrıca 18S ribozomal küçük alt birim rRNA SSU-F (5'-TGG TTG ATC CTG CCA GTA G-3', SSU-R; 5'-TGA TCC TTC CGC AGG TTC AC-3') kullanılmıştır (Nübel, 1997; Boutte vd. 2006; Yıldırım vd. 2014). PCR cihazı HelixAmp™ HyberSense DNA polimeraz kiti kullanılarak; ilk denatürasyon adımı 95 °C de 2 dk olarak tek adımda başlatılmış ve 35 döngü 95 °C de 30 s, bağlanma ısı (359F-781R (a, b)) için 65°C ve SSUF-R için 54 °C sıcaklıkta 40 s de, 72 °C de 40 s den sonra son uzama adımı, 1 döngü olarak 72 °C de 5 dk olacak şekilde ayarlanmıştır. DNA ve PCR ürünleri %1 agaroz jel elektroforezin de 1x-Tris-borik asit-EDTA (TBE) tamponu içerisinde 5 V/cm yürütüldükten sonra SYBR safe ile boyanan jel UV görüntüleme cihazı ile görüntülenmiştir.

PCR sonuçlarının dizi analizi İzmir İleri Teknoloji Enstitüsü Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda (ABI3130XL, 16 KAPİLLER SİSTEM)

yapılmıştır. Sonuçlar NCBI-Blast programı yardımıyla değerlendirilmiştir.

Hücre konsantrasyonunu tespit etmek ve büyüme grafiklerini çıkarabilmek için gün aşırı örnek alınmıştır. 2,5 mL mikroalg örneğinin 2 mL'si optik yoğunluk (OD) ölçümünde ve geri kalanı Neubauer sayım kamarası yardımıyla mikroskop altında sayılmıştır. *C. sorokiniana*'nın OD değeri 600 nm'de Ultraspec 1100 pro markalı spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür.

Spesifik büyüme hızlarının ve ikilenme sürelerinin hesaplamaları Becker (1995)' in formülüne göre yapılmıştır.

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{\Delta t}$$

μ , spesifik büyüme hızı; x_2 , t_2 zamanındaki hücre konsantrasyonu; x_1 , t_1 zamanındaki hücre konsantrasyonu; $\Delta t = t_2 - t_1$, DT, ikilenme süresi

$$DT = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Aksenik kültür izolasyonu için 100 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ampicilin, 25 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ kanamisin, 25 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ streptomisin ve 25 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ gentamisin içeren antibiyotik kokteyli 0,2 μm steril filtreden geçirilerek kullanılmıştır. Antibiyotik uygulamasından önce *C. sorokiniana* örneği 4500 rpm' de 5 dk süreyle santrifüj işlemiyle steril kültür ortamı ile 3 kere yıkanmıştır. İşlem sonrasında kalan pellet, 5 ml taze ESW ortamıyla homojenize edilerek 200 μl antibiyotik kokteyli eklenmiş ve 24 saat bekletilmiştir. Kültür taze ESW ortamına alınarak antibiyotiksiz agara çizgi ekim yöntemiyle transfer edilmiştir. Santrifüj işlemiyle bakteri sayısı azaltılan kültür aynı zamanda 5 ml taze ESW ortamına transfer edilmiş ve 25 μl örnek antibiyotikli agar üzerine çizgi ekim yöntemiyle ekilmiştir. Hem antibiyotikli hem de antibiyotiksiz agar üzerinde oluşan mikroalg kolonileri steril edilmiş kürdan yardımıyla teker teker toplanıp 3 mL steril sıvı ortam içeren test tüplerine alınmıştır. Yoğun ışık altında inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.

Yoğunlaşan kültürlerin akseniklik testi için 100 μL örnek "Nutrient Agar" üzerine yayma ekim yöntemiyle transfer edilerek 30°C' de 2-3 günlük inkübasyona bırakılmıştır.

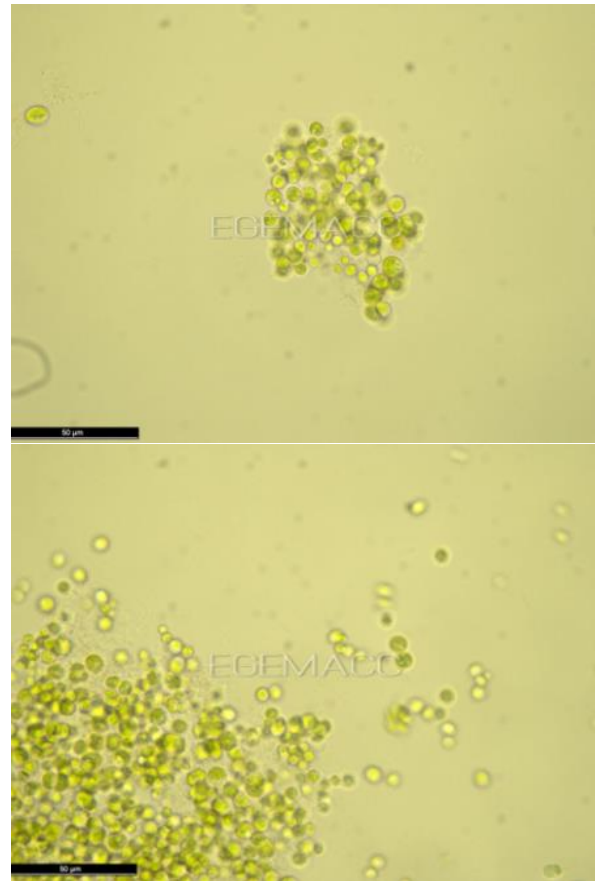
Bulgular

Chlorophyta grubunun üyeleri genellikle 2-10 μm çapındaki boyutlara sahiptir. Hücreler küresel ya da elipsoid şekillidir. Ayrıca hücrelerinde tek nükleus ve bir kromatofor vardır, tek tek olduğu gibi koloni de meydana getirebilirler. Vejetatif safhada kamçıları olmayan, hareketsiz alglerdir.

Kloroplastlarında bulunan pirenoidlerde nişasta oluştururlar. Nişastayı sitoplazma yerine kloroplastlarında oluşturdukları için diğer alg gruplarından ayrılırlar. Bu grup üyeleri hem denizlerde hem de tatlı sularda yayılış gösterir (Güner ve Aysel 1991).

Mikroalg taksonunun sınıflandırılmasında AlgaeBase web sitesi temel alınmıştır (AlgaeBase 2021).

Domain	: Eukaryota
Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Viridiplantae
Infrakingdom	: Chlorophyta infrakingdom
Phylum	: Chlorophyta
Subphylum	: Chlorophytina
Class	: Trebouxiophyceae
Order	: Chlorellales
Family	: Chlorellaceae
Genus	: Chlorella

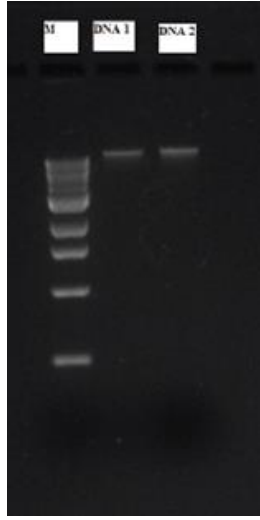


Şekil 1. *Chlorella* sp.'nin ışık mikroskobu görüntüsü 60X

Figure 1. Light microscope image of *Chlorella* sp. 60X

Chlorophyta üyelerinin morfolojik olarak birbirine çok benzemesi sebebiyle moleküler olarak tanılamayı da zorunlu kılmıştır. Les Algues D'eau Douce, Initiation à la systématique (Bourrelly 1966/70) mikroalg kataloğu yardımıyla ışık mikroskobuyla morfolojik olarak *Chlorella* sp. Beyerinck [Beijerinck], 1890 olduğu tespit edilen

türün (Şekil 1) DNA'sı ZRFungal/Bacterial DNA Kiti ile izole edilmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. *Chlorella sp.*'nin elde edilen DNA'sının agaroz jel üzerindeki görüntüsü Marker (M) 1kb DNA ladder (10,0 kb, 8 kb, 6,0 kb, 5,0 kb, 4,0 kb, 3,0 kb, 2,0 kb, 1,5 kb, 1,0 kb ve 0,5 kb); 1(a)-2(b)

Figure 2. The image of DNA obtained from *Chlorella sp.* on agarose gel Marker (M) 1kb DNA ladder (10.0 kb, 8 kb, 6.0 kb, 5.0 kb, 4.0 kb, 3.0 kb, 2.0 kb, 1.5 kb, 1.0 kb and 0.5 kb); 1 (a) -2 (b)

359 F-781R(a) için bağlanma sıcaklığı 62 °C, 359 F-781R(b) için Nanohelix PCR kitinde 65 °C derece kullanılarak optimizasyonları yapılmıştır.

Şekil 3' de elde edilen PCR sonuçlarına göre 359F-781R(a) primeriyle çoğaltılan DNA silik bir bant oluştururken, 359 F-781R(b) primeriyle çoğaltılan DNA, belirgin bir bantlaşma göstermiştir. PCR da çoğaltılan 18S rRNA gen bölgesi de Şekil 3 de belirtilmiştir.

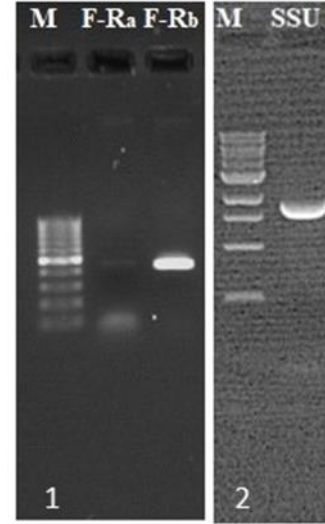
Dizi analizi sonuçları NCBI-Blast programına göre;

359F-781R (a) *Auxenochlorella protothecoides* 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial

sequence; chloroplast, AY553213.1; türüne maksimum %90 benzerlik göstermiştir.

359F-781R (b) *Chlorella sorokiniana* plastid DNA small subunit (16Slike) ribosomal RNA, X65689.1; türüne maksimum %97 benzerlik göstermiştir.

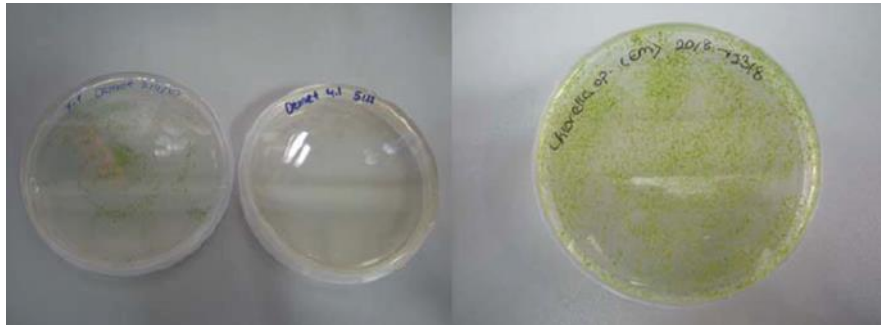
SSUF-SSUR *Chlorella sorokiniana* isolate 34-2 18S ribosomal RNA gene, KU948991.1 türüne maksimum %97,88 benzerlik göstermiştir (Tablo 3).



Şekil 3. PCR sonuçları, 1: Marker (M); 356F-781R(a) (F-Ra); 356F-781R(b) (F-Rb); 2: Marker (M); SSUF-SSUR (SSU)

Figure 3. PCR results, 1: Marker (M): 356F-781R (a) (F-Ra); 356F-781R (b) (F-Rb); 2: Marker (M); SSUF-SSUR (SSU)

Akseniklik kontrolü için yoğunlaşan kültürler "Nutrient Agar" üzerinde temiz bir görüntü oluşturmuştur. Mikroalg dışında bir mikroorganizma üremediği gözlenmiştir (Şekil 4). Ayrıca kültürün optik yoğunluğu (OD), bulanıklığı, pH değişimi ve Faz-Kontrast mikroskopuyla kontaminasyon içerip içermediği kontrol edilmiştir.

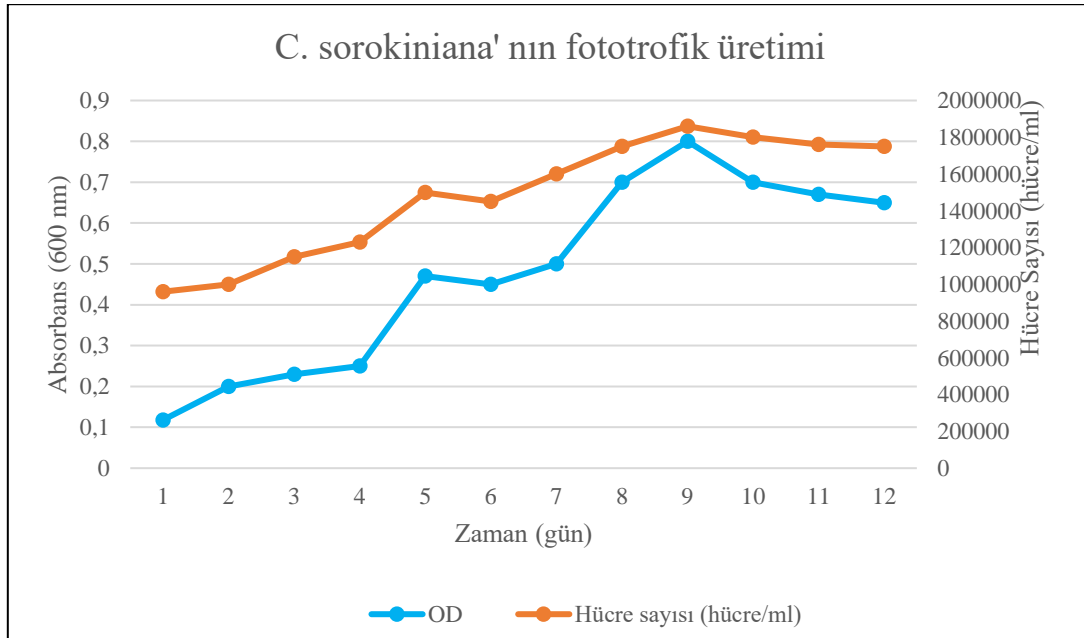


Şekil 4. Aksenik *Chlorella sorokiniana* kültürü

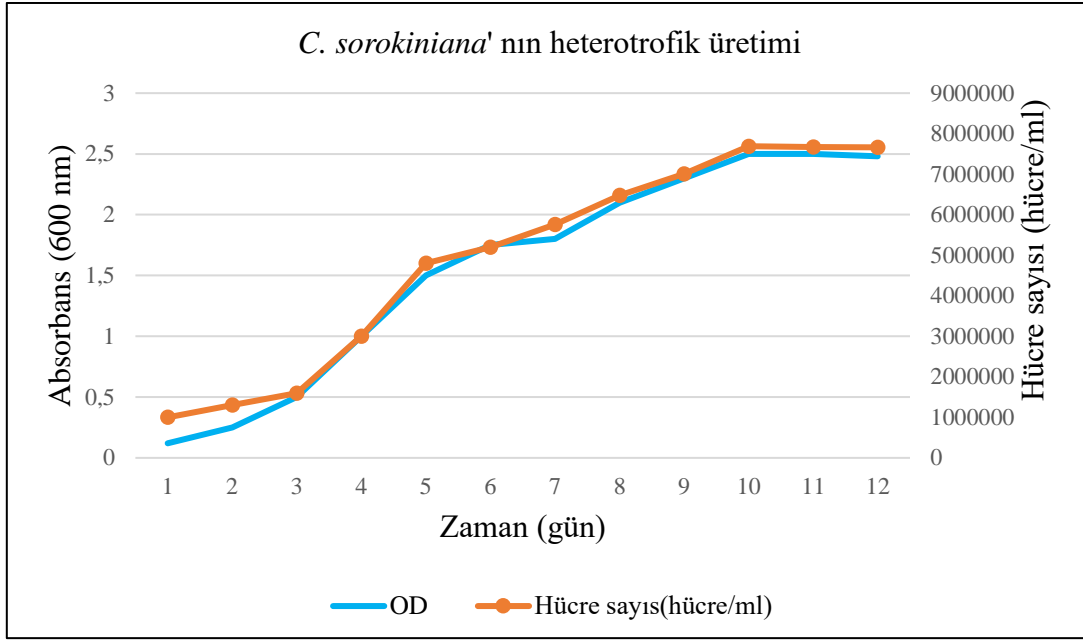
Figure 4. Axenic *Chlorella sorokiniana* culture

Tablo 3. Çoğaltılan gen bölgelerinin NCBI daki nükleotid dizileri ile uyumu (BLAST 2021)**Table 3.** Compatibility of the amplified gene regions with the nucleotide sequences in NCBI (BLAST 2021)

Tanımlama	Maksimum skor	Skor	Sorgulama kılıfı	E değeri	Yüzde tanımlama	Erişim numarası
<i>Chlorella sp.</i> EGEMACC40 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1794	1794	1	0.0	%100,00	JQ981943.1
<i>Chlorella sorokiniana</i> isolate 34-2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1622	1622	0,96	0.0	%97,88	KU948991.1
<i>Chlorella sp.</i> YACCYB97 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1607	1607	0,97	0.0	%97,57	MH619545.1
<i>Pseudochlorella pringsheimii</i> 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA gene, complete sequence	1605	1605	0,97	0.0	%97,47	KY364701.1
<i>Chlorella sp.</i> QUCCCM33 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1605	1605	0,97	0.0	%97,47	KM985401.1
<i>Chlorella sorokiniana</i> strain SAG 211-31 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	1605	1605	0,97	0.0	%97,47	KF673387.1
<i>Chlorella sp.</i> ZJU0209 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1605	1605	0,97	0.0	%97,47	JX097061.1
<i>Chlorella sorokiniana</i> 18S rRNA gene, strain Prag A14	1605	1605	0,97	0.0	%97,47	X74001.1
<i>Chlorella sorokiniana</i> strain Icheon4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1604	1604	0,97	0.0	%97,47	KF864476.1

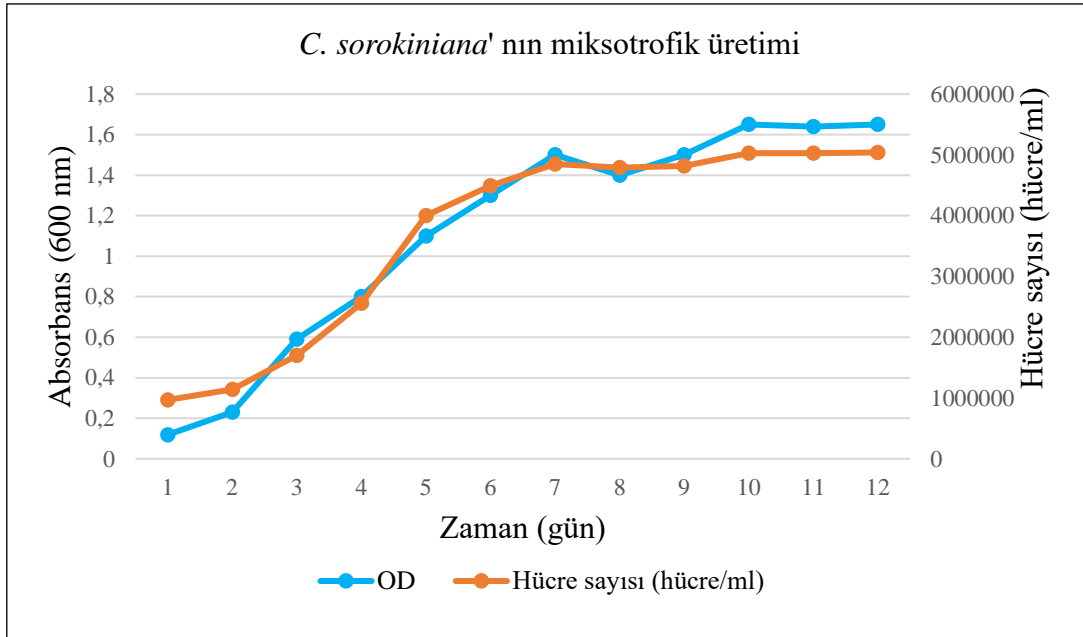


Şekil 5. *Chlorella sorokiniana*’nın 12 günlük fototrofik koşullar altında optik yoğunluk ve hücre sayısı ölçüm sonuçları
Figure 5. Optical density and cell number measurement results of *Chlorella sorokiniana* under 12-day phototrophic conditions



Şekil 6. *Chlorella sorokiniana*’nın 12 günlük heterotrofik koşullar altında optik yoğunluk ve hücre sayısı ölçüm sonuçları

Figure 6. Optical density and cell number measurement results of *Chlorella sorokiniana* under 12-day heterotrophic conditions



Şekil 7. *Chlorella sorokiniana*’nın 12 günlük mikсотrofik koşullar altında optik yoğunluk ve hücre sayısı ölçüm sonuçları

Figure 7. Optical density and cell number measurement results of *Chlorella sorokiniana* under 12-day myxotrophic conditions

Pigment farkından dolayı OD’nin birbiri ile karşılaştırılamayacağı düşünülürse biyokütle artışı esas alınmıştır. 12 günlük deney süresince Şekil 5, 6 ve 7’de gösterildiği gibi *C. sorokiniana*’nın hücre sayısı başlangıçtaki hücre sayısına göre fototrofik üretimde yaklaşık 2 kat, heterotrofik üretimde 7,5 kat ve mikсотrofik üretimde ise 5,2 kat artmıştır. Bu üç üretim şekline göre *C. sorokiniana*’nın

spesifik büyüme hızı ve ikilenme süresi Tablo 4’te verilmiştir.

C. sorokiniana fototrofik, heterotrofik ve mikсотrofik üretim açısından değerlendirildiğinde maksimum büyümenin 8. gün olduğu bulunmuştur. Akselik *C. sorokiniana*’nın farklı üretim yöntemleri karşılaştırıldığında en iyi üretim yönteminin (Şekil 6) heterotrofik üretim yönteminde olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4. Fototrofik, mikсотrofik ve heterotrofik üretimi yapılan *C. sorokiniana*'nın spesifik büyüme hızı (μ değeri) ve ikilenme süreleri**Table 4.** Specific growth rate (μ value) and doubling times of *C. sorokiniana* produced under phototrophic, myxotrophic and heterotrophic conditions

	Spesifik büyüme hızı (gün^{-1})	İkilenme süresi (gün)
Fototrofik üretim	0,069	10,05
Mikсотrofik üretim	0,108	6,93
Heterotrofik üretim	0,247	2,56

Tartışma ve Sonuç

Son yıllarda yenilenebilir enerji kaynaklarına ve ekonomik üretim yöntemlerine olan ilgi artmıştır. Alglerin bu enerji kaynakları arasındaki yerini alma nedeni ise hızlı büyüme özelliğine sahip olmaları, ortam koşullarındaki değişimlere dayanıklı ve toleranslı olmaları sayılabilir. Mikroalgler genelde fotosentetik organizmalar olarak değerlendirilir. Ancak yapılan çalışmalar çoğu türün heterotrofik ve mikсотrofik büyüme yeteneği olduğunu göstermiştir (Droop 1974). Ayrıca bu heterotrofik türler neredeyse alglerin bütün taksonomik sınıflarında bulunurlar. Geçtiğimiz elli yıl içerisinde geliştirilen fermantasyon teknolojisi ile büyük miktarlarda maya ve bakterinin endüstriyel üretimi yapılabilmektedir ve bu teknoloji ile heterotrofik algal üretim kolayca yapılabilir. Diğer mikroorganizmalar için kullanılan fermantasyon tankları aynı zamanda heterotrofik alg üretimi içinde uygundur. Buna ek olarak hücrenin büyümesi ve biyokimyasal içeriğini etkileyen bazı parametreler de kontrol edilebilir. Ayrıca verimliliği artırma maliyetleri azaltma metotları ile ilgili zengin bir endüstriyel mikrobiyolojik bilgi kaynağı da vardır.

Bulut (2009) tarafından *Chlorella vulgaris*' in fototrofik üretimi sonucu elde edilen maksimum kuru ağırlık $0,19 \text{ g L}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Başka bir çalışmaya göre heterotrofik olarak üretilen; *Chlorella sorokiniana*' dan $1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, *Nitzschia alba*' dan $0,8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, *Arthrospira* sp.' dan $1,2 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ biyokütle elde edilmiştir (AlgaePARC 2021). Kim vd. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada *C. sorokiniana*' nın spesifik büyüme hızı fototrofik, heterotrofik ve mikсотrofik koşullarda sırasıyla $0,24 \text{ gün}^{-1}$, $0,53 \text{ gün}^{-1}$ ve $0,44 \text{ gün}^{-1}$ olarak bildirilmiştir. Ayrıca aynı çalışma sonuçlarına göre *C. sorokiniana*' nın nitrojen ve fosfor giderim hızı heterotrofik üretimin fototrofik üretimden iki kat daha yüksek olduğu görülmüştür. Heterotrofik mikroalglerin organik substratları ve besinleri giderim hızı yüksek olduğu için ileri atık su arıtımında iyi bir seçenek olabilir. Baytut vd. (2014) Türkiye' nin alg florasında *C. sorokiniana* Shihira & Kraus (A102) ilk kez 2014 yılında kayıt altına almıştır. *C. sorokiniana* tatlı sularda yaşayan bir

yeşil mikroalg olmasına (Kim vd. 2016) rağmen Chen vd. (2013) yerel izolatları olan *C. sorokiniana* CY1 türünü %20 deniz suyu ortamında yetiştirerek yağ miktarını % 61 ve biyokütle miktarını ise 3 g/L olarak belirlemiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma ile ülkemiz sularında yayılış gösteren bir yerel mikroalg izole edilmiş, moleküler yöntemlerle tanımlanmış laboratuvar koşullarında kültürü yapılmıştır. NCBI gen bankasına kayıt ettirilen mikroalg için JQ981943.1 aksesyon numarası alınmıştır. Tür tayini yapılan mikroalg örneği Ege Üniversitesi Mikroalg Kültür Koleksiyonu' na (EGE-MACC 40) eklenmiştir. *C. sorokiniana* biyokütle verimliliği açısından değerlendirilerek bu tür için üç üretim şekline en iyi sonuç heterotrofik koşullar altında sağlanabilmiştir. Bu çalışma ile elde edilen verilerin de ileride yapılması planlanan büyük ölçekli üretime temel oluşturabilecek ön çalışma niteliği taşıdığı düşünülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışmayı destekleyen Ege Üniversitesi-Biyomühendislik Bölümü Algal Biyoteknoloji Laboratuvar ekibine ve Doç. Dr. Müge İşleten Hoşoğluna teşekkür ederim.

Kaynaklar

- Abreu AP, Fernandes B, Vicente AA, Teixeira J, Dragone G. 2012. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresour Technol.* 118:61-66.
doi: 10.1016/j.biortech.2012.05.055
- AlgaeBase. 2021. [Erişim tarihi: 09 Mar 2021]. Erişim Adresi: https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=r7b5b5e3003154f99
- AlgaePARC. 2021. Wageningen University&Research, [Erişim tarihi: 09 Mar 2021]. Erişim Adresi: <http://www.algaeparc.com/news>
- Baytut Ö, Gürkanlı CT, Gönüloğlu A, Özkoç I. 2014. Molecular phylogeny of *Chlorella*-related chlorophytes (Chlorophyta) from Anatolian freshwaters of Turkey. *Turkish Journal of Botany.* 38(3): 600-607.
doi:10.3906/bot-1304-32

- Becker EW. 1995. Microalgae biotechnology and microbiology. Cambridge University Press. p. 293. doi:10.1002/jctb.280470214
- Becker EW. 2007. Microalgae as a source of protein. Biotechnol Adv. 25(2):207-210. doi: 10.1016/j.biotechadv.2006.11.002
- BLAST. 2021. [Erişim tarihi: 09 Mar 2021]. Erişim Adresi: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHd_r_395406506
- Borowitzka MA. 1992. Algal biotechnology products and process-Matching science and economics. J. appl. Phycol. 4: 267-279.
- Bourrelly P. 1966/1970. "Les Algues D'eau Douce. Initiation à la systématique". Tome I: Les Algues vertes. Tome II: Chrysophyées, Xanthophycées et Diatomées. Tome III: Eugléniens, Péridiniens, Algues rouges et Algues bleues. – Avec 118 + 115 + 137 planches, 13+ 22+ 14 figures, 512 + 440 +544pp. Paris: Editions N. Boubée & Cie. doi:10.1002/iroh.19740590219
- Boutte C, Grubisic S, Balthasart P and Wilmotte A. 2006. Testing of primers for the study of cyanobacterial molecular diversity by DGGE. Journal of Microbiological Methods. 65:542-550. doi: 10.1016/j.mimet.2005.09.017
- Bulut, Y. 2009. *Chlorella*'da (*Clorophyceae*) yağ miktarının artırma olanaklarının araştırılması. [Yüksek Lisans Tezi]. Çukurova Üniversitesi. 62 s.
- Chen F. 1996. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. Trends in Biotechnology. 14:421-426. doi: 10.1016/0167-7799(96)10060-3
- Chen CY, Yeh KL, Aisyah R, Lee DJ, Chang JS. 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. Bioresour Technol. 102(1):71-81. doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.159
- Chen CY, Chang JS, Chang HY, Chen TY, Wu JH, Lee WL. 2013. Enhancing microalgal oil/lipid production from *Chlorella sorokiniana* CY1 using deep-sea water supplemented cultivation medium. Biochemical Engineering Journal. 77:74-81. doi:10.1016/j.bej.2013.05.009
- Chojnacka K, Marquez-Rocha FJ. 2004. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. Biotechnology. 3:21-34. doi:10.3923/biotech.2004.21.34
- Droop MR. 1974. Heterotrophy of carbon. In: Stewart WDP, editor. Algal Physiology and Biochemistry. Oxford (England). Blackwell Scientific Publ. p. 530-559.
- Elcik H, Çakmakçı M. 2017. Mikroalg üretimi ve mikroalglerden biyoyakıt eldesi. Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University. 32(3):795-820. doi: 10.17341/gazimmfd.337627
- Güner H ve Aysel V. 1991. Tohumuz Bitkiler Sistematigi, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No:108
- Hariskos I, Posten C. 2014. Biorefinery of microalgae opportunities and constraints for different production scenarios. Biotechnol J. 9(6):739-752. doi: 10.1002/biot.201300142
- Kim BH, Ramanan R, Kang Z, Cho DH, Oh HM, Kim HS. 2016. *Chlorella sorokiniana* HS1, a novel freshwater green algal strain, grows and hyperaccumulates lipid droplets in seawater salinity. Biomass and Bioenergy. 85:300-305. doi:10.1016/j.biombioe.2015.12.026
- Kim S, Park JE, Cho YB, Hwang SJ. 2013. Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. Bioresour Technol. 144:8-13. doi: 10.1016/j.biortech.2013.06.068
- Kobayashi M, Kakizono T, Yamaguchi K, Nishio N, Nagai S. 1992. Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions. J Ferment Bioeng. 74 (1):17-20. doi: 10.1016/0922-338X(92)90261-R
- Lee YK. 2001. Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential. Journal of Applied Phycology. 13:307-315. doi: 10.1023/A:1017560006941
- Liu J, Huang J, Sun Z, Zhong Y, Jiang Y, Chen F. 2011. Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: assessment of algal oils for biodiesel production. Bioresource Technology. 102:106-110. doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.017
- McLachlan J. 1973. Growth media marine, In Stein, J.R (ed.) Culture Methods&Growth Measurements. Cambridge University Press. p. 25-51.
- Marquez FJ, Sasaki K, Kakizono T, Nishio N, Nagai S. 1993. Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions. Journal of Fermentation and Bioengineering. 76:408-410. doi: 10.1016/0922-338X(93)90034-6
- Miao X, Wu Q. 2004. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. J Biotechnol. 110(1):85-93. doi: 10.1016/j.jbiotec.2004.01.013
- Mitra D, van Leeuwen J, Lamsal B. 2012. Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. Algal Res. 1(1):40-48. doi: 10.1016/j.algal.2012.03.002
- Nübel U, Garcia- Pichel F and Muyzer G. 1997. PCR Primers to amplify 16S rDNA Genes from cyanobacteria. Applied and Environmental Microbiology. 63(8):3327-3332. doi: 10.1128/AEM.63.8.3327-3332.1997
- Pragya N, Pandey KK, Sahoo PK. 2013. A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. Renewable Sustainable Energy Rev. 24:159-171. doi: 10.1016/j.rser.2013.03.034
- Provasoli L. 1963. Growing marine seaweeds. In: De

- Virville AD and Feldmann J (Eds.) Proceedings of the Fourth International Seaweed Symposium. Pergamon Press. Oxford. p. 9-17.
- Provasoli L. 1968. Media and prospects for the cultivation of marine algae. In: Watanabe H, Hattori A, (eds.). *Cultures and collections of algae*. Proceedings US-Japan Conference. Hakone: Japanese Society of Plant Physiology. p. 63-75.
- Sasson A. 1997. Microalgal biotechnologies: Recent developments and prospects for developing countries. Biotec Publication. 1:76.
- Sukatar A. 2002. Algal culture methods (in Turkish). Ege Üni Fen Fak. Kitapları Serisi No:184. s.104.
- Yeh KL, Chang JS, Chen WM. 2010. Effect of light supply and carbon source on cell growth and cellular composition of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. Eng Life Sci. 10(3):201-208.
[doi: 10.1002/elsc.200900116](https://doi.org/10.1002/elsc.200900116)
- Yıldırım A, Demirel Z, İşleten-Hoşoğlu M, Akgün İH, Hatipoğlu-Uslu S, Conk-Dalay M. 2014. Carotenoid and fatty acid compositions of an indigenous *Ettlia texensis* isolate (Chlorophyceae) under phototrophic and mixotrophic conditions. Applied Biochemistry and Biotechnology. 172(3): 1307-1319.
[doi: 10.1007/s12010-013-0599-y](https://doi.org/10.1007/s12010-013-0599-y)
- Zhang H, Wang W, Li Y, Yang W, Shen G. 2011. Mixotrophic cultivation of *Botryococcus braunii*. Biomass and Bioenergy 35:1710-1715.
[doi: 10.1016/j.biombioe.2011.01.002](https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.01.002)
- Zhu L. 2015. Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework. Renewable Sustainable Energy Rev. 41:1376-1384.
[doi: 10.1016/j.rser.2014.09.040](https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.09.040)
- Wang H, Xiong H, Hui Z, Zeng X. 2012. Mixotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* with diluted primary piggery wastewater to produce lipids. Bioresour Technol. 104:215-220.