EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BİYOFLOK İÇİNDE MİKROALG-BAKTERİYEL KONSORSİYOMLAR ÜRETİMİ

Saygın YILDIRIM

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Semra CİRİK

Su Ürünleri Yetiştiricilik Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 12.12.2018

Bornova-İZMİR
2018

Saygın YILDIRIM tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan "Biyoflok içinde mikroalg-bakteriyel konsorsiyomlar üretimi" başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 12.12.2018 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:	**İmza**
Jüri Başkanı : Prof. Dr. Semra CİRİK	
Raportör Üye : Prof. Dr. Aynur LÖK	
Üye : Doç. Dr. Güzel Yücel Gier	

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum "Biyoflok içinde mikroalg-bakteriyel konsorsiyomlar üretimi" başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

12/12/2018

İmzası

Adı Soyadı

Saygın YILDIRIM

ÖZET

MİKROALG-BAKTERİYAL KONSORSİYOMUNDAN BİYOFLOK ÜRETİMİ

YILDIRIM, Saygın

Yüksek Lisans Tezi, Su Ürünleri Yetiştiricilik Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Semra CİRİK

Aralık 2018, 60 sayfa

İnsan nüfusunun aşırı artışı nedeniyle su ürünleri yetiştiriciliği gibi gıda üretim endüstrileri, protein gıdası stoklarındaki eksiklik sorunuyla başa çıkabilmek için daha da genişlemeye çalışmaktadırlar. Çevrenin ve doğal kaynakların korunması için bu genişlemenin çevre dostu bir şekilde yapılması gerekmektedir. Mikrobik biyokütle gibi çözünmüş besin maddelerini yeniden kullanan biyoflok teknolojisinin kullanımı, su ürünleri yetiştiriciliğini daha sürdürülebilir hale getirme konusundaki küresel kaygıyı umut verici bir şekilde karşılamaktadır. Şu anda, operasyonel parametreler; esas olarak bir deneme yanılma temeline dayanmaktadır ve bu tekniği ticarileştirmek için daha bilimsel bir yaklaşıma doğru kaymaya açık bir gereksinim vardır.

Bu tezde, esas olarak mikroalg türü olan *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann, 1898) ve *Nitrosomonas-Nitrobacter* sp. içeren karışık bir nitrifikasyon bakteri topluluğunun birlikte yetiştirilmesi üzerinde duruldu. Bu birliktelik sayesinde su içinde bulunan toksik etkiye sahip Amonyak (NH_3^-) ve Nitrat (NO_3^-), müdahalede bulunmadan ortamdan uzaklaştırılması için çalışıldı. Aynı zamanda bu birliktelikte meydana gelen oluşum potansiyel olarak istiridye yavruları için besin kaynağı olabilecektir.

Genel olarak, farklı azot kaynakları eklenerek oluşan bileşimin ve bu bileşime bakteri eklenmesinin, algal büyüme, biyokütle üretimi ve azot giderimi üzerinde önemli bir rol oynadığını düşünebiliriz. *Chaetoceros muelleri* ve karışık

nitrifikasyon topluluğunun yetiştirilmesi, tüm farklı ortamlarda başarılı bir şekilde sonuç vererek, amonyak ve nitrat ortamdan uzaklaştırılmıştır. Yüksek amonyak konsantrasyonu olan ortamda alg büyümesi; Nitratin yoğunlukta olduğu ortama oranla nitrifikasyon bakterileri topluluğundan etkilenmemiştir. Bu algal-bakteriyel ekim sırasında başarıya daha çok yaklaşmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar sözcükler: Alg-bakteri Konsorsiyumu, Biyoflok teknolojisi, *Chaetoceros muelleri,* nitrifikasyon bakterileri.

ABSTRACT

ALGAL-BACTERIAL CONSORTIA IN BIOFLOC SYSTEMS

YILDIRIM, Saygın

MSc in Aquaculture
Supervisor: Prof. Dr. Semra CIRIK

December 2018, 60 pages

Due to the exponential growth of the human population, food production industries such as aquaculture require further expansion in order to cope with the problem of shortages in protein food supplies. However, in order to preserve the environment and natural resources, this expansion will need to take place in a sustainable way. The use of biofloc technology, which re-uses dissolved nutrients such as microbial biomass, holds a promising response to the global concern of making aquaculture more sustainable. Currently, operational parameters are mainly adjusted on a trial-and-error basis, and there is a clear need to shift towards a more scientific based approach in order to commercialize this technique.

In this thesis, we mainly focused on co-cultivation of the microalgae *Chaetoceros mülleri* and a mixed nitrifier community consisting of *Nitrosomonas* sp. and *Nitrobacter* sp. and their usage as a non-intrusive technique for selective removal of pollution, such as ammonia (NH_3^-) and nitrate (NO_3^-) from wastewater with the added value of producing proteinaceous feed *in situ* that potentially serves as a food source for oyster spats.

In general we can conclude that medium composition (e.g. nitrogen source) and addition of bacteria play an important role on algal growth, biomass production and nitrogen removal. The cocultivation of *Chaetoceros mülleri* and a mixed nitrifying community scored well in all different media, succesfully removing ammonium and nitrate. However only in medium containing a higher ammonium concentration compared to nitrate was algal growth not effected by

the presence of the nitrifying community. As such further reseach is required to unravel the underlying mechanisms in these algal-bacteral co-cultivations.

Keywords: Algal-bacterial consortia, Biofloc technology, *Chaetoceros muelleri*, nitrifier community.

TEŞEKKÜR

Yapmış olduğum bu araştırmanın konusu, deneysel çalışmaların yönlendirilmesi ve yazımı esnasında bana yapmış olduğu büyük katkılarından dolayı başta tez danışmanım Prof. Dr. Semra CİRİK'e, yurt dışına gitmeden önce hazırlık aşamasında benden yardımını esirgemeyen Prof. Dr. Şevket GÖKPINAR ve Prof. Dr. Aynur LÖK'e, Gent Üniversitesinde çalışmalarım esnasında benden yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Peter BOSSİER ve Araştırma görevlisi Nancy Nevejan, Japonyada bulunduğum esnada bana her türlü yardımda bulunan Prof. Dr. Juji Tanaka Sensei'ye, eğitimimin başından sonuna kadar attığım her adımdan haberleri olan ve beni yanlız bırakmayıp yardımcı olan Doç. Dr. Tolga DİNÇER, Araştırma Görevlisi Gamze TURAN ve Hatice TEKOĞUL'a, tez yazım aşamasında desteğini hep aldığım Bram VEKEMAN'a teşekkür ederim.

Yurtdışında bulunduğum zaman diliminde ve araştırmam esnasında özellikle manevi desteğini hiç esirgemeyen ve hep yanımda olan en değerli varlığım aileme, Roland CSIZMADIA ve can dostum Sefer YILMAZ'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET vii
ABSTRACT ix
TEŞEKKÜR xi
İÇİNDEKİLER xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ xviii
KISALTMALAR xviii
1. GİRİŞ 1
1.1. Su Ürünleri Yetiştiriciliği 1
1.2. Biyoflok Teknolojisi 3
1.3. Mikrobiyal Biyofloklar 5
1.3.1. Mikroalgler 7
1.3.2. Bakteriler 9
1.3.3. Alg-bakteri etkileşimleri 12
1.4. Biyoflok Teknolojisinde Flok Oluşumunu ve Flok Yapısını Etkileyen Faktörler. 15
1.4.1. Karıştırma yoğunluğu 15
1.4.2. Çözünmüş oksijen 16
1.4.3. Organik karbon kaynağı 17
1.4.4. Organiklerin eklenme oranı 18
1.4.5. Sıcaklık 19
1.4.6. pH 20
1.5. Su Ürünleri Yetiştiriciliği İçin Biyoflok Teknolojisinin Genel Katkısı 20

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

1.6. Tezin Kavramsal Çerçevesi 21
2. MATERYAL VE METOT 24
2.1. Kültürler 24
2.2. Kültürlenme, Ortam ve Büyüme Koşulları 25
2.2.1. Mikroalg ve bakterilerin birlikte yetiştirilmesi 25
2.2.2. Walne ortamı bileşimi 26
2.3. Analitik Metotlar 27
2.3.1. Amonyum ve nitrat hesaplaması 27
2.3.2. Algal büyüme ölçümü 27
2.3.3. Biyokütle izleme 29
2.3.4. Fizikokimyasal parametreler 30
3. BULGULAR VE TARTIŞMA 31
3.1. Alg Hücre Sayıları ve Biyokütle Arasındaki Korelasyon 31
3.2. Farklı İnorganik Nitrojen Koşullarında Bakteri ve Alg Büyümesi 31
3.2.1. Algal büyüme 31
3.2.2. Biyokütle üretimi 35
3.2.3. Fizikokimyasal parametreler 36
3.3. Farklı İnorganik Azot Koşullarında Amonyum ve Nitrat Dönüşümü 38
4. SONUÇ VE ÖNERİLER 41
KAYNAKLAR DİZİNİ 44
ÖZGEÇMİŞ 60

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil Sayfa

1.1. Su ürünleri yetiştirme sistemlerine ve çevrelerine genel bakış 2

1.2. Biyoflok teknolojisinin su ürünleri yetiştirme sistemlerinde nasıl uygulanabileceğinin şematik gösterimi ……...5

1.3. Biyoflok yoğunluk ölçümü, yapısı ve bileşimi …….....6

1.4. Nitrifikasyon işlemi ....……...……..10

1.5. Bu tezin amacı ve şemasının şematik taslağı ……...……...23

2.1. Bu çalışmada kullanılan kültürler …….....……24

2.2. Nitrifikasyon bakterileri ilaveli veya ilavesiz farklı azot ortamlarında algleri yetiştirme düzeneği
…….……...26

2.3. Algal büyüme izlenimi ……...…….29

3.1. Işık saçılması ile uyarılan alg hücre sayımları ve absorbans arasındaki korelasyon …….31

3.2. Farklı inorganik azot ortamında büyüme ……..…….....33

3.3. Farklı büyüme koşullarında zaman içindeki toplam organik biyokütle üretimi …….……..……35

3.4. pH farklı büyüme koşulları için zaman içindeki pH değişimi …….37

3.5. Zamanla amonyum ve nitrat dönüşümü ……...39

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge Sayfa

3.1. Doğal deniz suyundaki ve farklı Walne kültür ortamının azot bileşimi……...39

KISALTMALAR

AFDW	Kuru Kül Ağırlık
AMO	Amonyak Monooksigenaz
AOA	Arkeler
AOB	Amonyum Oksitleyici Bakteriler
BFT	Biyoflok Teknolojisi
Chl-a	Klorofil a
COD	Kimyasal Oksijen Ihtiyacı
DO	Çözünmüş Oksijen
DOC	Çözünmüş Oksijen Konsantrasyonu
DW	Kuru Ağırlık
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FVI	Flok Hacim Endeksi
HAO	Hidroksilamin Oksidoredüktaz
NH_2OH	Hidroksilamin
NH_3^-	Amonyum
NOB	Nitrit Oksitleyici Bakteriler
NO_3^-	Nitrat
OD	Optik Yoğunluk
PHB	Polihidroksibutirat
RAS	Su Sirkülasyon Sistemleri
SBR	Ardışık Seri Reaktör
SVI	Çamur Hacim Indeksi
TAN	Toplam Amonyum Azotu

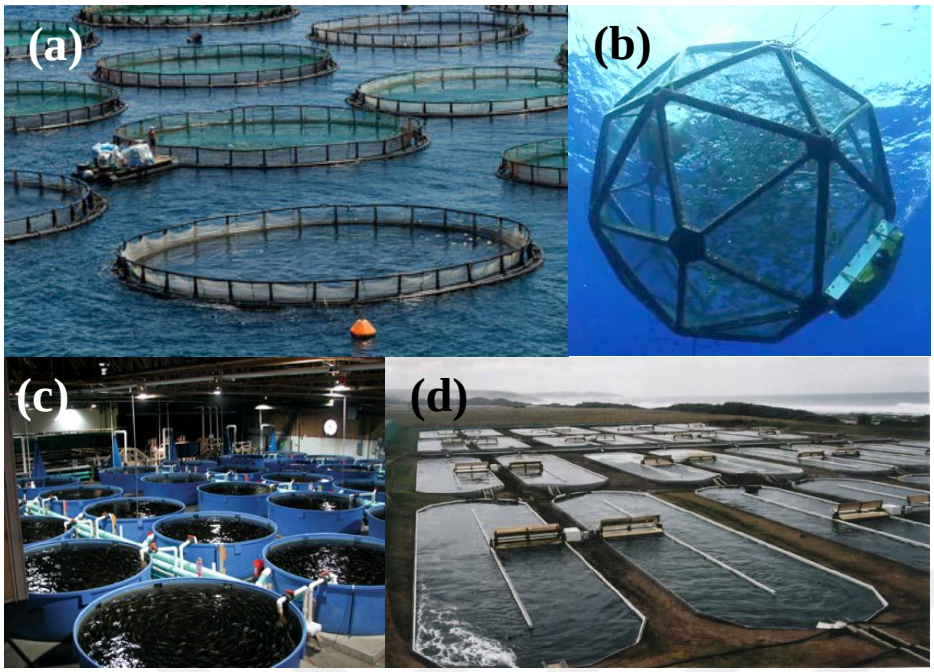
1. GİRİŞ

1.1. Su Ürünleri Yetiştiriciliği

Su ürünleri yetiştiriciliği, balık veya kabuklu deniz hayvanları yetiştiriciliği olarak da bilinmekle birlikte; havuzlar, nehirler, göller ve okyanus gibi her türlü su ortamında kontrollü koşullar altında bitki ve hayvanların yetiştirilmesi ve hasat edilmesi anlamına gelir.

2016 yılına gelindiğinde, bu yıl öncesinde yetiştirilenler de dahil olmak üzere dünyanın her yerinde çiftliklerde üretimi yapılan toplam 598 canlı grubu vardır (FAO, 2016). Bu türler; 369'u balık (melezler dahil), 109'u yumuşakça, 64'ü kabuklu hayvanı, 7'si kurbağa ve sürüngen, 9'u sucul omurgasız ve 40'ı su bitkisini içermektedir. Tatlı suda üretim; sazan, alabalık, tatlı su çipurası, levrek ve yayın balığından oluşmaktadır (Bostock et al., 2010). Kıyılarda yapılan yetiştiricilikte genellikle karides türleri ve az da olsa istiridyeler, deniz tarakları, midyeleri içermektedir. Dünyada Atlantik somonu en yoğun olarak üretimi yapılan deniz balıkları olarak bilinmektedir. Türkiye'de ise denizde yapılan su ürünleri yetiştiriciliği en çok çipura ve levrek olarak yapılmaktadır. 2017 yılında çipura yaklaşık 61 bin ton levrek ise yaklaşık 100 bin ton olarak kayıtlara geçmiştir (TÜİK, 2017). Besin olarak yapılan kültürün yanısıra, kuluçka balıklarının ve kabuklu deniz hayvanlarının, örneğin istiridye resifleri gibi nüfuslarını veya kıyı yaşam alanlarını yeniden inşa etmek için yaban hayatı içine bırakıldığı stok restorasyonunu da kapsar. Ayrıca, akvaryum ticareti için süs balıklarının üretimi, yem için kullanılan balık üretimi, algler, farmasötik alanlar, beslenme ve biyoteknoloji ürünlerinin geniş bir yelpazesinde kullanılmaktadır (Cirik ve Gökpınar, 2008).

Su ürünleri yetiştiriciliği doğal sistemlerde, okyanuslarda (Şekil 1.1. a & b), tatlı su sistemlerinde, karada, havuzlarda ve tanklar gibi insan yapımı sistemler tarafından gerçekleştirilir (Şekil 1.1. c & d).



Şekil 1.1. Su ürünleri yetiştirme sistemlerine ve çevrelerine genel bakış. a & b) Doğada gerçekleşen su ürünleri yetiştiriciliği. c & d) İnsan yapımı çevrelerde yetiştiricilik . a & b) kafes kullanımı. c) tanklar ve d) kara ve göletler. Kaynaklar: a: (pesceinrete.com); b: (google.com); c: (aquaculture210.blogspot.jp); d: (https://www.slideshare.net)

Küresel su ürünleri yetiştiriciliği, son 50 yılda yaklaşık %9 oranında belirgin bir şekilde büyümüştür (Subasinghe, 2005; Matos et al., 2006; Gutierrez-Zamora and Manefield, 2010). Küresel su ürünleri yetiştiriciliği (su bitkileri dahil) 2016 yılında 110,2 milyon ton olmuştur (FAO, 2016). Su ürünleri yetiştiriciliğinden yıllık dünya gıda amaçlı olarak kullanılan balık üretimi yaklaşık 80 milyon ton, su bitkileri (çoğunlukla deniz algleri) ise yaklaşık 30,1 milyon ton olarak hesaplanmıştır (FAO, 2016). 2016 yılında Asya nüfusunun yaklaşık %85'i balıkçılık ve su ürünleri yetiştiriciliği sektöründe faaliyet göstermektedir. Bunu; Afrika %10, Latin Amerika ve Karayipler %4 olarak takip etmektedir. Çin, yaklaşık 49,2 milyon ton balık ve 14,4 milyon ton çiftlik su bitkisi üretmiştir (FAO, 2016). Bu bölgelerde hızlı büyümenin nedenleri arasında, daha önce mevcut su ürünleri yetiştiriciliği uygulamaları, nüfus ve ekonomik büyüme, sıkı olmayan yasalar ve ihracat fırsatlarının genişletilmesi yer alıyor. Avrupa'da ve Kuzey Amerika'da, 1980'li-1990'lı yıllarda su ürünleri yetiştiriciliği gelişimi hızla gerçekleşmiştir. Muhtemelen yasalar üzerindeki kısıtlamalar ve diğer

rekabetçi faktörler nedeniyle yavaşlamışlardır ancak balık ve deniz ürünleri pazarında büyümeye devam etmişlerdir.

Türkiye toplam su ürünleri üretimi ile dünyada 30'lu sıralarda, AB ülkeleri içinde ilk beş sırada yer almaktadır. Su ürünleri yetiştiriciliği, avcılıktan elde edilen miktar yaklaşık 355 bin ton ile 1,5 milyar lira, yetiştiricilik ise yaklaşık 277 bin ton ile 4 milyar lira ekonomik girdi olarak kayıtlara geçmiştir (FAO, 2016).

İnsan nüfusunun 7,5 milyarı aştığı bir Dünya da, yetiştiricilik gibi gıda üretim endüstrileri, protein gıdası arzındaki sıkıntılarla başa çıkabilmek için daha da genişlemektedir. Bu büyüme hızının bir sonucu olarak, su ürünleri yetiştiriciliği çevresel bozulmaya ve kirliliğe sebep olmaya başlamıştır. Çevrenin ve doğal kaynakların korunması için bu genişlemenin sürdürülebilir bir şekilde çevreye duyarlı bir şekilde yapılması gerekmektedir. Su ürünleri yetiştiriciliğinin temel amacı; deniz, okyanus ve toprağın doğal kaynaklarını daha az kullanarak daha fazla su ürünleri yetiştirmektir (Avnimelech, 2009). İkinci amaç ise, çevreye ve ekosisteme zarar vermeyecek, sürdürülebilir su ürünleri yetiştirme sistemleri oluşturmaktır (Naylor et al, 2000). Üçüncü hedef ise, ekonomik ve sosyal sürdürülebilirlik sağlamak için adil bir maliyet/fayda oranı sağlayan sistemler geliştirmektir (Avnimelech, 2009). Bu tez sürdürülebilir su ürünleri kültürü gelişimi için bu üç ön şartı karşılamak üzere biyoflok teknolojisini sunmayı amaçlamıştır.

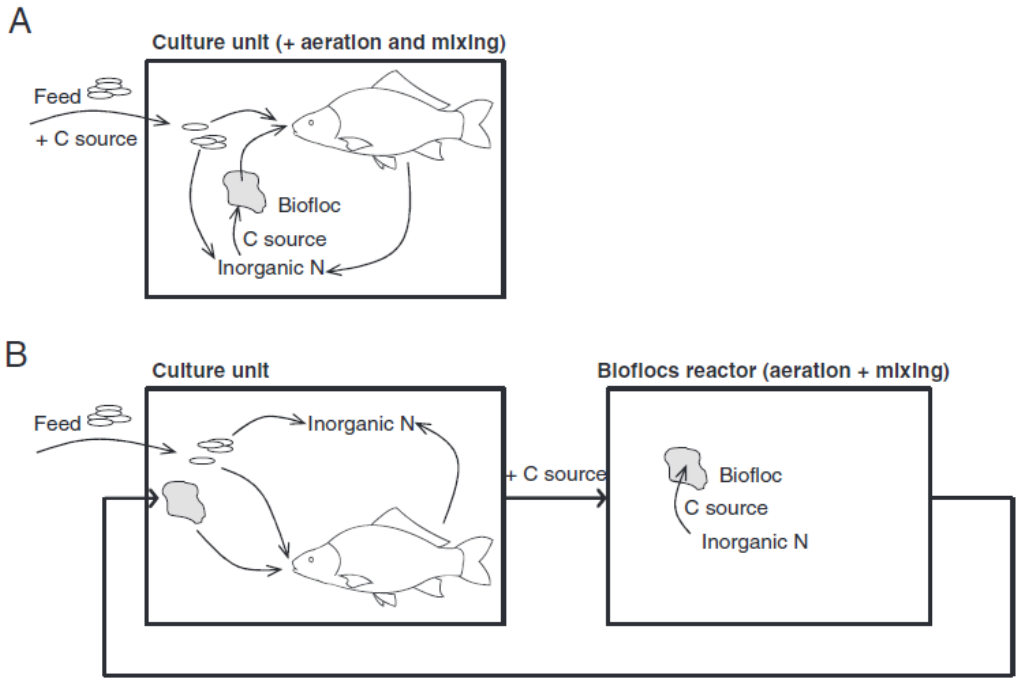
1.2. Biyoflok Teknolojisi

Yoğun su ürünleri yetiştiriciliği, fazla miktarda kültür ortamından çevreye sızan organik madde ve artık besin maddesi nedeniyle çevre için toksik etkilere neden olmaktadır (Piedrahita, 2003). Uzun zamandır kullanılan atık su ve kirlilik sorunuyla başa çıkmanın en yaygın yolu, sistemdeki kültür suyunun sürekli taze su ile değiştirilmesini sağlamaktır (Gutierrez-Wing and Malone, 2006). Örneğin; Penaeid karidesleri için su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılan sistemlere iyi koşullar sağlamak için ihtiyaç duyulan su hacmi her gün yüzlerce metreküpe

ulaşabilmektedir. Üretilen kg karides başına yaklaşık 20 m^3 temiz suya ihtiyaç duyarlar (Wang et al, 2008). Hacmi 140 m^3 olan alabalık yetiştirme sistemi için sahip olduğu su hacminin 100 katına kadar günlük bir değiştirme yapılması gerekmektedir (Maillard et al., 2005). Bir başka yaklaşım, suda bulunan kirleticilerin önemli bir bölümünü kaldırmaktır. Gutierrez-Wing and Malone (2006), farklı biyolojik temelli su arıtma sistemleri ile suda besleme sistemlerinin devir daimi (RAS – Su Sirkülasyon Sistemleri) için çalışmışlardır. Toplam su miktarı günlük olarak değiştirilmeli ve tüm su hacminin yaklaşık %10'u kadarı değiştirilmelidir (Twarowska et al., 1997). Ancak, bu teknik sermaye yatırımı açısından çok maliyetlidir. Normal havuz sistemlerinin maliyeti sermaye yatırımı açısından yaklaşık yıllık maaliyeti 1.3 € kg kadardır ve su sirkülasyonun yapıldığı sistemlerde maaliyet 5.9 € kg'a kadar yükselebilmektedir (Gutierrez-Wing and Malone, 2006). Ayrıca RAS'ın çalışması enerji ve iş gücü maliyetlerini artırır. Yatırımın tüm masrafları ve işletme maliyetleri hesaplanırsa, işletim sisteminin tüm maliyetinin neredeyse yarısından fazlası olduğu görülebilir (Gutierrez-Wing and Malone, 2006).

Su ürünleri yetiştiriciliğinde atık suyu ortamdan uzaklaştırmak için son zamanlarda birkaç yeni yöntem geliştirilmiş ve uygulanmıştır. Su ürünlerinde besin olarak kullanılan yemlerin yaklaşık %75'i tüketilmediği için suyun kalitesini düşürüp toksik etki yaratmaktadır. Akuakültürde su kalitesini arttıran bir teknik olan biyoflok teknolojisi (BFT); son zamanlarda su kalitesini kontrol altına almak için sürdürülebilir bir yöntem olarak dikkat çekmektedir (Avnimelech, 2009). Biyoflok teknolojisinin amacı esasen atık sudaki besin maddelerinin uzaklaştırılması ve bunları değerli mikrobik biyokütleye dönüştürülmesine dayanmaktadır. Ancak karbon ve azot çözeltide dengede olduğu sürece bu başarılı olabilmektedir; aksi taktirde biriken amonyum, belirli bir düzeyin üzerine çıktığında, üretimi yapılan canlılar üzerinde toksik etkiye sahip olurlar (Schneider et al., 2005). Havuza karbon kaynağı veya karbonca zenginleşmiş yemler eklenerek heterotrofik bakteri gelişimi uyarılır ve mikrobiyal proteinlerin üretimi yoluyla azot alımı gerçekleşir (Avnimelech, 2009). Biyoflok teknolojisi, harici bir karbon kaynağı veya karbon içeriği olan besin değeri yükseltilmiş besin eklenmesiyle su kalitesinin arttırılmasına yönelik kullanılan bir tekniktir (Şekil 1.2). Bakteriyel büyüme ile nitrojen alımını arttıran bu yöntem, nitrifikasyona

kıyasla amonyum konsantrasyonunu daha hızlı düşürmektedir (Hargreaves, 2006). Heterotrofların birim substrat başına büyüme oranı ve mikrobiyal biyokütle verimi, nitrifikasyon bakterilerinden 10 kat daha yüksektir ve bu heterotrofik bakterilerin daha hızlı bir oranda amonyağın ortamdan uzaklaşmasını sağlamaktadır (Hargreaves, 2006).



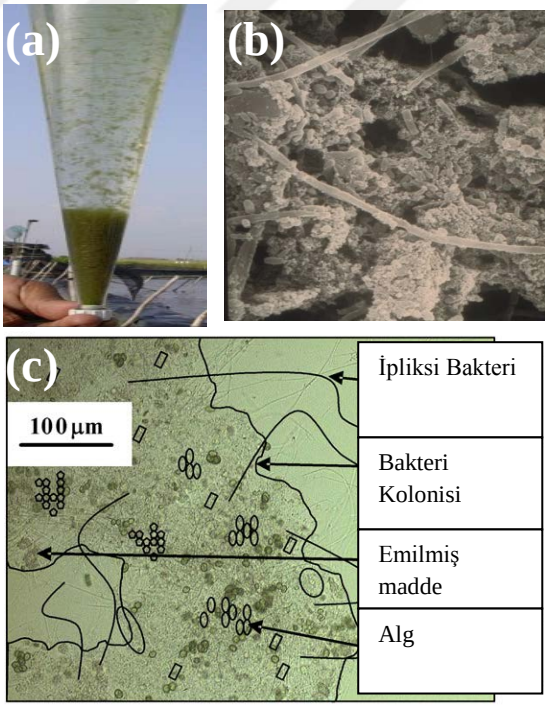
Şekil 1.2. Biyoflok teknolojisinin su ürünleri yetiştirme sistemlerinde nasıl uygulanabileceğinin şematik gösterimi. A) Nispeten düşük Azot içeriğine sahip yem ve/veya bir karbon kaynağı ilavesi ile biyolojik flokların kültür ünitesine entegrasyonu. Biyoflok inorganik azot atıklarını karbon kaynağı ile birlikte tüketir, böylece hayvanlar tarafından yem olarak kullanılabilecek mikrobik biyokütle üretilmiş olur. B) Ayrı bir biyoflok reaktörünün kullanılması. Kültür tankından çıkan atık su biyoflok reaktörüne getirilir, burada biyolojik flok büyümesini teşvik etmek için bir karbon kaynağı eklenir. Biyoflok reaktörünün suyu kültür tankına devir daim edilebilir ve/veya biyolojik floklar hasat edilebilir ve bir ilave besin maddesi olarak kullanılabilir (Crab et al., 2012).

1.3. Mikrobiyal Biyofloklar

Mikrobiyal flok boyutu 1000 µm'den büyük olabilir ve heterojen mikroorganizmalar (ipliksi bakteriler), organik polimerler, partiküller kolloidler, katyonlar ve ölü hücreler oluşturabilir (Jorand et al., 1995). Tipik flokların şekli küçüktür ve pürüzsüzdür, kolayca sıkılabilir, geniş bir parçacık boyut dağılımına sahiptir, gözeneklidir (%99'dan fazla porozite) ve floklar sıvılara karşı geçirgendir

(Chu and Lee, 2004). Flokların bir araya gelmesi aynı zamanda mikroorganizmalar için yerleşim alanı sağlamaktadır. Yerleşim sayesinde floklar; ışığın zararlı etkilerinden korunabileceği gibi üst tabakada beslenen yüksek organizmaların besin kaynağı olarak bir avantaj oluşturabilir. İyi oluşmuş floklar, kültürü yapılan canlılar için bir besin kaynağı olarak hemen ortamdan kaybolmaz, çünkü kültür havzalarında uygulanan yaklaşık 10 W/m^3'lük yoğunluklarda enerji girişi ile floklar dibe batmadan süspansiyon halinde kalırlar.

Flokları karakterize etmek için çeşitli parametreler kullanılabilir. Flokların fiziksel özelliklerini tanımlayan parametreler ile flokların kimyasal bileşimini tanımlayan parametreler arasında bir ayrım yapılabilir. Organik bölünmüş çamur flokları sadece %2-20 mikrobiyal hücreler olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, toplam organik madde %60-70 ve toplam inorganik madde yaklaşık %30-40 oranında olabilir (Wilén et al., 2003). Mikrobiyal biyokütle yoğunluğu, ortalama 1 g yaş ağırlık/mL flok birleşiminin biraz üzerinde; dolayısıyla oldukça yavaş batma eğilimindedirler (1-3mh) (Sears et al., 2006).



Şekil 1.3. Biyoflok yoğunluk ölçümü, yapısı ve bileşimi. a) Doğal sistemlerde biyolojik flokların izlenmesi için numune alma yöntemi ve yoğunluk ölçme prosedürü b) Filamentli bakterilerin, bakteri kolonilerinin ve emilen maddenin varlığını açıkça gösteren bir biyofloğun taranan elektron mikroskobu resmi. c) Bir Biyoflok sistemindeki flok yapısının şematik görüntüsü ve bileşimi (De Schryver et al., 2008).

1.3.1. Mikroalgler

Mikrofitler veya mikroalgler mikroskobik alglerdir. Tipik olarak tatlısu ve deniz sistemlerinde hem suda asılı olarak hem de substratlar üzerinde yaşarlar. Tek tek, bir zincir içinde veya grup içerisinde yaşayan tek hücreli canlılardır. Türe göre, algler tek hücreli türlerden, çok hücreli dev alg türlerine kadar değişkenlik gösterirler. Bitkilerin aksine, alglerin doku ve organ yapıları eksiktir (P. Raven, 1992; Cirik ve Gökpınar, 2008). Tek veya çok hücreli olabilen, basit yapıya sahip, hücrelerinde klorofil bulunan algler; çoğunlukla mikroskobik büyüklüklerde olmaktadır (Cirik ve Gökpınar, 2008). Ökaryotik algler, Chlorophyta, Cryptophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Glaucophyta, Haptophyta, Ochrophyta ve Rhodophyta'ya aittir. Tüm fotosentetik algler, fotosentetik pigment olan klorofil a (*Chl-a*) ya sahiptir (Richmond, 2003; Cirik ve Gökpınar, 2008). Bununla birlikte, her *Chl-a*'ya sahip, fotosentez yapma kabiliyeti olan tüm organizmaları alg kategorisine koymak doğru olmaz (Graham and Wilcox, 2000a). Bazı algler, fotosentezden farklı metabolik bir stratejiye sahiptirler. Bu tür heterotrofik algler, organik karbonları ya dış ortamdan, ya da parçacıkları absorbe edip organik bileşikleri çözerek elde ederler. Çok sayıda alg fakültatif miksotroflardır; ışık veya organik bileşiklerin varlığına bağlı olarak fototrofi veya heterotrofi özelliğini kullanarak büyüyebilir (Graham and Wilcox, 2000a; Cirik ve Gökpınar, 2008).

Mikroalgler, herhangi bir canlı organizma gibi farklı fiziko-kimyasal faktörlerden etkilenir. Bu faktörlerin her biri için en uygun olanı kullanılan mikroalg türüne göre değişmektedir. Işık kalitesi ve miktarı, çözünmüş oksijen konsantrasyonları, sıcaklık, karbon kaynağı, azot kaynağı ve konsantrasyonu, fosfor, diğer mikro ve makro besin maddeleri, inhibitör maddeler, pH, hücre yoğunluğu ve patojenler dikkate alınması gereken önemli faktörlerdir (Cirik ve Gökpınar, 2008).

Mikroalgler; dünya üzerindeki en büyük mikroorganizma grubundan biri olup deniz hayvanlarının besin zinciri ve akuakültür için önemli besleyici rol oynarlar. Akuatik ekosistemin temel besini olarak kullanıldıkları için bunları besin olarak kullanan canlılar da insanlar tarafından kullanılacağı için insan yaşamı için de önemlidir (Bardach et al., 1974; Cirik ve Gökpınar, 2008).

Hemaiswarya (2011), mikroalglerin sadece yumuşakçaların (örneğin; istiridye, tarak ve midye), deniz kulağı, kabuklular, bazı balık türleri için değil aynı zamanda su ürünleri yetiştiriciliği gıda zincirleri için besin sağlamak için bazı zooplankton türlerin kültürü için de kullanılırlar. Su ürünleri yetiştirme sisteminden başarılı bir sonuç almak için, süzerek beslenen canlılar için mikroalglerin boyutu 1 ila 15 µm arasında olmalıdır. Alglerle beslenen diğer canlılar da iyi sindirim için 10 ila 100 µm olmalıdır (Webb and Chu, 1983). Ayrıca mikroalgler, sıcaklık, ışık, pH vb. dalgalanmalara karşı yeterince güçlü, besin kompozisyonu yüksek ve hızlı büyüme oranlarına sahip olmalıdır.

Isochrysis galbana, *Isochrysis* sp. (T.ISO), *Pavlova lutheri*, *Tetraselmis suecica*, *Pseudoisochrysis paradoxa*, *Chaetoceros calcitrans* ve *Skeletonema costatum* çift kabuklu kültürü için iyi bir besin olarak tanımlanan en başarılı türlerdir (Persoone and Claus, 1980). İyi besin değeri olan mikroalgler, tek tür yada birden fazla tür bir arada olacak şekilde beslemede kullanılabilirler. Çift kabuklu yumuşakçaların larva ve anaçları için genellikle *Isochrysis* sp. (T.ISO), *P. lutheri* ve *C. calcitrans*, *C. muelleri*, *T. suecica*, *S. costatum* birlikte karışım yapılarak besin maddesi olarak kullanılırlar (Enright et al., 1986; Thompson et al., 1993; Brown et al., 1997; O'Connor and Heasman, 1997). Tanımlanmış bu türlerin birçoğu larva evrelerinde olan kabuklu kültürü için de kullanılırlar (*Skeletonema* sp. ve *Chaetoceros* sp.).

Ayrıca son zamanlarda kültür balıklarının beslenmesinin yanı sıra atık su arıtımı gibi çevresel problemleri de çözmek üzere yetiştiricilik faaliyetlerinde mikroalglerin önemi gün geçtikce artmaktadır (Oron, 1994; Hammouda et al., 1995). Yoğun mikroalg içeren havuzlarda; fotosentetik mikroalgler, heterotrofik bakterilere oksijen sağlar ve atık su bazlı besinler biyokütle proteinine dönüştürülür (Oron, 1994; Benemann and Oswald, 1996). Böylelikle görülebileceği üzere, çift kabuklu ve kültürü yapılan türlerin çoğunu besleyebilen ve daha iyi su kalitesi sağlamakla birlikte CO_2'i O_2'ne dönüştürerek su ürünleri kültür ortamlarında mikroalglerin önemi oldukça artmaktadır.

Stechele and Nevejan (2015)'nın ilk sonuçlarına göre, levrek havuzunda tüketilmemiş yemin olduğu suda yetiştirilen biyolojik flokların protein içeriğinin yüksek olmasına rağmen besin değeri düşük olmuştur. Bunun nedeni yüksek oranda doymamış yağ asitlerine sahip olmamasıdır. Çift kabukluların besin ihtiyacını karşılayan bir besin oluşturmak için uygun mikroalglerin eklenmesi gereklidir. Son tüketiciler olarak çift kabuklularla çalışırken yaşanan bir diğer zorluk ise, ideal yem boyutu olan 4 ila 30 µm arasında ölçülen biyolojik flokların üretilmesidir. Karbon kaynağının ve havalandırmanın uygun bir kombinasyonu oluşturulursa bu boyutla ilgili olan problemin çözüleceğine inanılmaktadır.

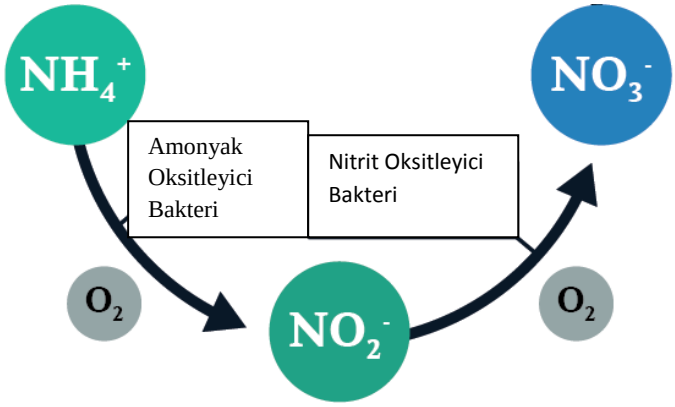
1.3.2. Bakteriler

Bakteriler prokaryotik mikroorganizmaların geniş bir alanını oluşturmaktadırlar. Tipik olarak birkaç mikrometre uzunluğundaki bakteri; kürelerden çubuklara ve sarmallara kadar çeşitli şekillere sahiplerdir. Dünya üzerinde yaklaşık 5×10^{30} bakteri vardır. Bu da tüm bitki ve hayvanlarınkini aşan bir biyokütle oluşturduğunu göstermektedir (Whitman et al., 1998). Toprak, su, asidik kaplıcalar, radyoaktif atıklar (Fredrickson et al., 2004) ve yerkabuğunun derinliklerinde (Marshall, 2010) dahi bulunan bakteriler kelimenin tam anlamıyla yeryüzündeki her yerde bulunurlar. Bakteriler, atmosferden azot tutma gibi ve besin maddelerini geri dönüştürerek besin döngüsünün birçok aşamasında hayati bir rol oynayarak canlılığın gezegenimizde var olmasını sağlayan kritik bir öneme sahiptir.

Bakteriler, dünyada görünen ilk canlılar arasında olduğu için, zamanla mikroalgler de dahil olmak üzere bitkiler ve hayvanlarla yakın ilişkiler içine girmiştir (Avnimelech, 2009).

Nitrifikasyon döngüsünde yer alan bazı bakteriler çalışmaların bir çoğunda özel ilgiyle karşılanmaktadırlar. Nitrifikasyon, azot döngüsünde önemli bir adımdır (Şekil 1.4). Amonyak veya amonyumun nitrite biyolojik olarak oksidasyonu, ardından nitritin nitrata yükseltilmesidir (Spieck and Bock, 2005; Koops et al., 2006). Bu nedenle, nitrifikasyon iki aşamalı bir sıralamalı olan bir

biyolojik oksidasyon işlemidir (Henze et al., 2009). Her iki aşamada da, ototrof mikroorganizmalardan olan iki birbirinden ilgisiz grup görev almaktadır. Amonyumu nitrite dönüştüren amonyum oksitleyici bakteriler (AOB), arkeler (AOA) ve nitriti nitrata dönüştüren nitrit oksitleyici bakterilerdir (NOB). Ancak bu tezde sadece bakterilere odaklanacağız, arkeler (AOA) daha fazla tartışılmayacaktır.



Şekil 1.4. Nitrifikasyon işlemi. Nitrifikasyon, filogenetik mikroorganizmaların yaptığı iki evrimsel olarak birbirinden ilgisiz gruplar tarafından gerçekleştirilmektedir. Amonyum oksitleyiciler, nitrifikasyon işleminde ilk adımdan sorumludurlar ve amonyumu nitrite (AOB) dönüştürürler. Bir sonraki aşamada, nitrit oksitleyiciler (NOB) daha sonra nitriti nitrata oksitleyeceklerdir. Kaynak: (http://www.marylandbiochemical.com)

AOB, hücre morfolojileri ve gram-negatif gibi çok tabakalı hücre duvarları ile ayırt edilebilir ve kamçıları sayesinde hareket edebilme yeteneğine sahiplerdir. AOB'nin 1890'da ilk izolasyonundan sonra, Proteobakterilerin b- ve c-alt sınıfı olmak üzere, kamçılı olarak iki farklı grupta beş türü olduğu saptanmıştır (Purkhold et al., 2000; Koops et al., 2006). Nitrosomonas (e.g., *Nitrosococcus mobilis*), Nitrosospira, Nitrosovibrio ve Nitrosolobus da dahil olmak üzere bu dört tür AOB'ler, b-alt sınıfta gruplandırılmışlardır (Woese et al., 1984) ve sadece bir tane Nitrosococcus kümesi, c-alt sınıfı içerisindedir (Junier et al., 2010). AOB yaygın olarak çevrede dağılmıştır. İzolasyon prosedürü zaman alıcı ve zahmetli olsa da çeşitli habitatlardan çok sayıda saf kültür izole edilebilmiştir (Koops et al., 2006). Şimdiye kadar, en yaygın olarak incelenen Nitrosomonas ve Nitrosospira türleri ile birlikte çeşitli ortamlardan toplam 25 AOB türünün kültürü yapılmıştır (Mobarry et al., 1996; Harms et al., 2003).

NH_4^+'un NO_2'e dönüştürülmesi; ara ürün olarak hidroksilamin (NH_20H) ile iki aşamadan oluşur. İlk aşamada, NH_4^+'un yerine NH_3^+ asıl substrattır ve NH_3^+; amonyak monooksigenaz (AMO) ile kataliz yoluyla NH_2OH'ye okside edilir (Suzuki et al., 1974). İkinci aşamada NH_2OH ayrıca hidroksilamin oksidoredüktaz (HAO) ile kataliz yoluyla NO_2'e yükseltgenir. NO_2'deki oksijen atomlarından biri sudan elde edilirken diğeri ise oksijen molekülünden elde edilir. İkinci aşamada dört elektron salınır. Bunlardan ikisi birinci basamağın elektron girişi için kullanılırken, diğerleri ise bir elektron nakil zinciri yoluyla terminal oksidaza geçirilerek bir proton güdü kuvveti üretilir (Sinha and Annachhatre, 2007).

NH_4^+, nitrifikasyon yapan bakteriler için enerji kaynağı olmasına rağmen, bakteri hücrelerindeki tüm NH_4^+'un nitrifikasyonda kullanılmadığı unutulmamalıdır. NH_4^+'un bir kısmı karbon dioksitin karbon kaynağı olarak görev yaptığı bir azot kaynağı olarak hücre büyümesi için kullanılır (Sinha and Annachhatre, 2007).

NOB, CO_2'i asıl karbon kaynağı olarak asimile eden ve nitriti tek enerji kaynağı olarak oksitleyen zorunlu veya fakültatif kemotitotrofik bakterilerdir. NOB nitrifikasyon işleminin ikinci adımını, nitritin nitrata dönüştürülmesini gerçekleştirmektedir. Böylece, toksik nitriti canlı organizmalar için zararlı ortamdan uzaklaştırırlar. Bu nedenle, toksik nitriti canlı organizmalar için zararlı çevre bölgesinden uzaklaştırmakta ve birçok organizma için önemli bir azot kaynağı olarak nitrat haline getirmektedirler (Philips et al., 2002). NOB yavaş büyüyen mikroorganizmalardır ve bu nedenle izolasyon ve yetiştirme işlemi zaman alıcı bir işlemdir. Sonuç olarak, yalnızca birkaç temsilcisi geçerli olarak tanımlanmıştır. Bunlar phylo-genetik olarak Alfa, Beta, Gama Proteo bakterileri ve derin dallanan filum Nitrospira ve Nitrosomonas'a bağlıdırlar (Ehrich et al., 1995; Spieck and Bock, 2005; Alawi et al., 2007; Lücker et al., 2013). Son zamanlarda, bu birliğe Chloroflexi yeni bir üye olarak eklenmiştir (Sorokin et al., 2012).

Suda bulunan azot, ötrofikasyona neden olan algler ve siyanobakterilerin oranının aşırı artmasına neden olan yaygın ve ciddi su problemidir (Conley et al., 2009; Andersen et al., 2017). Nitrifikasyon yapan bakteriler, atıksuyun azotlu bileşiklerini fizikokimyasal proseslerden daha etkili ve düşük maliyetli bir şekilde azaltılmasına yardımcı olurlar. Biyolojik floklarda nitrifikasyon bakterilerin bulunması beyaz karidesdeki bağışıklık sistemini uyaran probiyotik aktivitelere sahip oldukları ve bu floklardan beslenmeleri durumunda onları hastalıklara karşı daha güçlü kılma özelliğine sahip oldukları için daha ilgi çekicidirler. Ancak bu floklar aynı zamanda besin değeri olarak da yüksek olması gerekmektedir. İstiridye gibi çift kabuklular için ideal biyoflok yemi, yüksek protein içeriği ve yüksek bir besin değeri (örneğin; yüksek oranda doymamış yağ asitleri ihtiva etmelidir) içermelidir.

Yapılacak çalışmalarla, nitrifikasyon bakterilerin (nitrifiers) olduğu biyolojik flokların besin değeri, mikrobik topluluğu manipüle ederek değiştirilebileceği düşünülmektedir. Daha sonra, karbon kaynağı, azot kaynağı, ışık koşulları vb. değiştirilerek besin değeri üzerinde değişimler yapılabilinecektir. Bu nedenle, bu çalışmada, farklı inorganik azot bileşiklerinin ve kombinasyonlarının etkisi araştırılmıştır (i) algal büyümesi ve toplam biyokütle artışı (ii) ve zamanla amonyak giderme (ve nitrat artışı) izlenmesi ile değerlendirilmiştir (iii).

1.3.3. Alg-bakteri etkileşimleri

Doğal ortamda mikroalgler bakterilerle her zaman etkileşimde ve birlikte bulunmuşlardır. Bu ilişki alg büyümesini artırabilir veya azaltabilmektedir (Fukami et al., 1997). Eski ve ölü alg hücrelerinin bile bakterilerle simbiyotik ilişkiler sağlayabileceği ispatlanmıştır (Muñoz and Guieysse, 2006; Park et al., 2008; Kouzuma and Watanabe, 2015). Alg ve bakteriler, atık su arıtma sistemlerinde organik bileşikleri parçalamak, besin maddelerini almak ve kirleticileri azaltmak için birlikte çalışırlar (Muñoz and Guieysse, 2006).

En önemli işbirliğinden biri, aralarındaki gaz değişimi ile ilgilidir. Algler besin maddelerini alırlar ve fotosentezle üretilen O_2, bakterilerin elektron alıcısı

olarak görev yapar ve organik maddeyi CO_2'e indirgemek için kullananılırlar. CO_2'in salınması aynı zamanda, algler yüzünden düşen sudaki karbonat ve bikarbonat seviyelerinin pH'ı çok yüksek bir seviyeye yükseltmesini önlemeye yardımcı olur. Aynı zamanda algler, bakteriler tarafından üretilen CO_2'i tüketirler ve bu CO_2'i daha fazla O_2 üretmek için kullanabilirler. Buda basitçe fotosentez sürecini açıklamaktadır (Oswald and Gotaas, 1957; Muñoz and Guieysse, 2006; Abdel-Raouf et al., 2012). Su ürünleri yetiştiriciliğinde havalandırma işlemi oldukça pahalı olduğu için, suda olan bu doğal oksidasyon, atık su arıtımında oldukça önemli bir yere sahip olabilir. Algler O_2 sağladığı için mekanik havalandırmada toplam enerji tüketiminin yaklaşık %60'ı olduğu geleneksel aerobik atıksu arıtma sistemlerine kıyasla havalandırma gerekmeyecektir (Shi, 2011). Bakterilerin O_2 tüketimi aynı zamanda alg biyokütle üretimi için de faydalıdır. Çünkü yüksek O_2 konsantrasyonları fotosentezi engellemektedir (Christenson and Sims, 2011).

Simbiyotik alg-bakteri konsorsiyumun kimyasal oksijen ihtiyacı (COD) ve azotu uzaklaştırmak için kullanılması, geleneksel atık su arıtma prosesleriyle karşılaştırıldığında çevre için etkili ve iyi bir enerji dostu olabilir (Muñoz and Guieysse, 2006). Alg-bakteri süreci devam ederken, organik COD (diğer bir deyişle, atık sudaki mevcut COD) ancak bakteriler tarafından okside edilebilirler. Bununla birlikte, hem algler hem de bakteriler toksik koşullar altında azot uzaklaştırma özelliğine sahiptir (Kouzuma and Watanabe, 2015). Algler, biyokütlesini korumak için azot kaynağı olarak amonyum (NH_4^+-N) ve nitratı (NO_3^--N) alırlar (de Godos et al., 2009). Nitrifikasyon yapan bakteriler NH_4^+-N'yi NO_3-N'ye oksitleyebilir, bu daha sonraki denitrifikasyon işlemi için bir elektron alıcısı olarak kullanılabilir (Tang and Chen, 2015). Sonuç olarak, alg-bakteri ilişkisi, etkili azot uzaklaştırma işlemi için iyi bir çözüm olabilir.

Bir başka örnek ise mikroalg için önemli olan ve bakteriler tarafından yapılan B12 vitamini sentezidir (Croft et al., 2005). Croft et al. (2005), bazı alglerin B12 vitaminini sentezleyemediğini ve bunların bakterilerden alınması gerektiğini göstermiştir. Ayrıca genetik ve laboratuvarlar; B vitaminlerinin bakteri üretiminin fotobiyoreaktörlerde gözlendiğini belirtmişlerdir (Krohn-Molt et al., 2013). Reaktörde bakteri bulunan bir çok esterolitik ve lipolitik enzim

gözlemleyen bir başka araştırma var ve bu araştırma aynı zamanda bakterilerin, bir fotobioreaktörün biyoyakıt üretim yetenekleri üzerinde etkili olabileceği sonucuna varılabilecek alg ürünleriyle nasıl etkileşime geçtiğini göstermektedir (Kouzuma and Watanabe, 2015). Algler ve bakteriler arasında gen aktarımı yapıldığını iddia eden bazı raporlar da vardır, bu da genetik bilgilerin de değiş tokuş edildiği sonucuna varmamızı sağlayabilir (Moszczyński et al., 2012; Brembu et al., 2014).

Yukarıda bahsedilen avantajların yanı sıra, bazı araştırmalara göre alg-bakteri ilişkisi birbirine karşı düşmanca da olabilir. Algal metabolitleri bakteri gelişimini etkileyebilir, sucul ekolojiyi değiştirebilir ve bu atık su arıtım sürecinde olumsuz etkilere neden olabilir (Kouzuma and Watanabe, 2015). Mikroalgal büyüme genellikle yavaştır çünkü heterotrofik bakterilerden daha büyüklerdir (Fenchel, 1974). Mikroalgler, pH'ı (algal solunum nedeniyle 10.6'ya kadar), Çözünmüş oksijen konsantrasyonunu (DOC), sıcaklığı artırarak veya inhibitör hücre dışı toksik metabolitleri serbest bırakarak bakteri büyüme üzerinde tehlikeli etkilere neden olabilir (Green et al., 1996; Oswald, 2003; Schumacher et al., 2003; Muñoz and Guieysse, 2006). Alg metabolitlerinden bazıları (örn., Kawaguchipeptin, calothrixine ve 12-epi-hapalindole) nitrifikasyon bakterilerinin çalışmasını önlerken, bazı algisidal metabolitler üreten bakteriler de (örn., 2-hidroksi-12-oleanen-3, 28- OD-glikopiranosil, Listidin, o-tirosin, N-asetilhistamin ve ürokanik asit) algin çalışmasını önlemektedir (Luo et al., 2013; Zhao et al., 2014). Bunun diğer bir nedeni ise, konsorsiyum için önemli olan nitrojen dengesinde değişimlerden dolayı olabilir. Yukarıda belirtildiği gibi algler; nitrifikasyon bakterilerinin büyümesini inhibe edebilir ve bu da nitrojen alımına etki eder. Karya et al. (2013) amonyumun %81-85'inin atıksudan nitrifikasyon yoluyla uzaklaştırıldığını göstermişlerdir. Alglerin büyümesi üzerinde etki yapabilir. Çünkü algler genellikle nitrattansa amonyumu tercih ederler. Amonyumun hücrenin içine girmesi için harcanan enerji daha azdır (Dortch et al., 1991).

Yoğun heterotrofik mikrobik floklar geliştirip kontrol ettikten ve bakteriler ile fototrofik mikroalgler arasinda simbiyotik bir işbirliği/ilişki kurduktan sonra algler ile bakteriler arasında sağlanabilecek simbiyotik bir ilişki; su kirleten

organik ve inorganik etmenlerin biyolojik olarak giderilmesini hızlandırabilir (Safonova et al., 1999; Azim et al., 2003a, 2003b; Chaillan et al., 2006). Bu nedenle, alg-bakteri konsorsiyumu; hayvan tedavisi için sürdürülebilir ve uygun maliyetli olması için son birkaç yıldır büyük önem kazanmıştır (De-Bashan, 2002; Olguín, 2003; Muñoz et al., 2005; Aslan ve Kapdan, 2006; Muñoz and Guieysse, 2006; Zhang et al., 2009). Biyolojik flokların diğer bir avantajı daha sonra tüketilebilir ve yetiştiriciliği yapılan organizmalar tarafından bir besin kaynağı olarak kullanılabilirler (Azim et al., 2003a; Burford et al., 2003; Hari et al., 2004; Avnimelech, 2009).

1.4. Biyoflok Teknolojisinde Flok Oluşumunu ve Flok Yapısını Etkileyen Faktörler

Biyolojik flok teknolojisinin uygulanması, aktif çamur sistemlerinde flok oluşumunun nasıl gelişeceği bilgisi ile ancak geliştirilebilir. İyi bir kümelenme elde edebilmek için, uygun parametreler sağlanarak su ürünleri organizmaları için optimal büyüme koşulları elde edilmelidir. Bu parametreler sağlanırsa kaliteli floklar elde edilebilir. Bununla birlikte, birçok durumda, sonucun tahmin edilmesi kolay değildir. Çünkü bunların çoğu güçlü parametrelerle birbirine bağlıdır. Parametreler ile biyoflok teknoloji sistemlerinin arasındaki başarılı ilişkiyi kurabilmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Farklı parametreler ve bunların biyoflok teknolojisindeki rollerinin bir özeti aşağıda verilmiştir.

1.4.1. Karıştırma yoğunluğu

Karıştırma, mikroalgal büyümeyi birkaç önemli yoldan etkileyebilir. Birincisi, algal hücrelerin ışığa aralıklarla temas etmesini sağlar ve böylece mevcut ışık kullanım verimliliğini arttırır (Oswald and Gotaas, 1957). İkincisi, algal hücreler ve besin maddeleri arasındaki teması artırabilir ve arasındaki etkileşimi artırma şansını yükseltebilir (Azad and Borchardt, 1970; Muñoz et et al., 2005). Üçüncü olarak ise CO_2 transferine ve O_2'nin atmosfere salınmasına yardımcı olur. Son olarak, tüm mikroalgal hücreleri süspansiyon halinde tutar ve böylece anaerobik bölgelerin oluşumunu önler (Muñoz and Guieysse, 2006). Çok

fazla karıştırma, yıpranmadan dolayı strese ve hücre hasarına da neden olmaktadır. Yoğun enerji harcamalarına da sebep olmaktadır. Düşük karıştırma hızı da alglerin büyümesi üzerinde olumsuz etkilere neden olabilir (Muñoz and Guieysse, 2006). Bu yüzden karıştırma yoğunluğunun dengede tutulması oldukça önemlidir.

Floklarının boyutu, seçilen bir havalandırma cihazı tarafından sisteme sabit bir güç girişi ile belirlenir ve böylece flok boyutu ile flok birikme oranı arasındaki denge sağlanır (Spicer and Pratsinis, 1996; Chaignon et al., 2002). Su ürünleri yetiştirme sistemlerinde, enerji kullanımı genelde 0.1-10 W/m^{-3} arasındadır (Boyd, 1998). Bununla birlikte, yüksek yoğunluklu sistem değerlerinin enerji kullanımı 100 W/m^{-3}'e kadar çıkabilmektedir. Bu da flok kırılmalarına bağlı olarak flok boyutlarında küçülmelere neden olabilir. Biggs and Lant (2000), 19.4 s^{-1} ortalama hız gradyanı (veya G-değerinin) olan bir sistemde kararlı flok boyutu 130 µm iken, aktif çamurda 346 s^{-1} hız gradyanı için 20 µm olarak flok boyutunu saptamıştır. Parker ve diğerleri (1972), flok boyutu ve karıştırma yoğunluğu arasındaki ilişkiyi $d = CxG^{-x}$; burada d maksimum kararlı flok boyutu, G ortalama hız gradyanı, C flok, x ise kararlı flok boyut bileşeni olarak formüllendirmişlerdir (Parker et al., 1972). Akuakültür türleri için besin kalitesi gıda boyutuna bağlı olduğu için, BFT için kararlı durum flok boyutu önemli bir öneme sahip olduğu böylece ispatlanmıştır (Knights, 1983; Garantuntjeldsto et al., 2006). Bir beslenme kaynağı örneği olarak, *Macrobrachium rosenbergii* larvası için gıda boyutunun 250-1200 µm ebadında olması gerekmektedir (de Barros and Valenti, 2003).

1.4.2. Çözünmüş oksijen

Çözünmüş oksijen (DO) konsantrasyonu, alglerin fotosentez yaptığı sırada artar. Çünkü mikroalg hücrelerinin 1 grama kadar büyümesi, 1.587 g çözülmüş moleküler oksijenin serbest bırakılmasını sağlamış olur (Oswald and Gotaas, 1957). Üretilen oksijen, organik karbonun kullanılması için heterotrofik bakteriler veya heterotrofik mikroalgler tarafından derhal tüketilir. Son DO seviyesi oksijen üretimi ve tüketimi sonucu oluşur. Farklı havalandırma cihazı veya güç girişi karıştırma yoğunluğunu değiştirir. Böylece, bu durum doğrudan sistemdeki çözünmüş oksijen konsantrasyonunu etkiler. DO seviyesi, aerobik floklardaki hücrelerin metabolik aktivitesi için önemli rol oynamaktadır. DO seviyesinin flok

yapısı üzerinde bir etkisi olduğu da düşünülmektedir. Wilen and Balmér (1999), daha yüksek DO konsantrasyonlarında daha büyük ve daha yoğun floklar üzerinde çalıştılar. Ancak, ortalama flok çapı için net bir sonuç bulunamadı. Yerleşim kalitesi, ortalama 250 ml g^{-1} üzerinde düşük DO değerleri (0.5-2.0 mg L^{-1}) ve çamur hacim indeksi (SVI)'nin yüksek DO değerleri (2.0-5.0 mg L^{-1}) ile karşılaştırıldığında sonuç daha kötüydü. Bu, daha yüksek miktarda ipliksi bakterilerin, düşük DO aralığında neden zoogloea bakterilerinden daha yüksek olduğunun açıklaması olabilir. Çünkü ipliksi bakteriler oksijeni severler ve oksijen sınırlaması olduğunda zoogloea muadillerini yenme yeteneğine sahip olurlar ve böylece mikrobik floklara hakim olurlar (Martins et al., 2003). Önceki araştırmalardan görülebileceği gibi daha düşük DO seviyelerinde olan havuzlarda, daha yüksek flok hacim endeksine (FVI) sahip olan floklar üretilmektedir. Flokların çok hızlı tortulaşmasını önlemek için, düşük türbülansta 200 ml g^{-1} den fazla FIV olması beklenir. Dolayısıyla, bu, organizmaları sucul hayvanların süspansiyon halindeyken süzüp filtreleme şansı verir. Bu floklar havuzların dibine çökerse akuakültür organizmaları için bir besin kaynağı olma şansını kaybeder. Bununla birlikte, daha yüksek bir FVI'nin olumsuz etkileri vardır, örneğin balık solungaçlarının tıkanması gibi, bunun da hesaba katılması gerekir. Ayrıca su ürünleri yetiştiriciliği türlerinin büyüme özellikleri ve stres direnci, çoğunlukla sudaki mevcut çözünmüş oksijen miktarına bağlıdır (Colt, 2006; Huntingford et al., 2006). Örneğin; kanal yayın balığı, periyodik oksijen seviyelerinin 1.5 mg L^{-1}'den az olması durumunda, balık tarafından daha az gıda tüketimine, net üretim ve balık vücut ağırlığı azalmasına sebep olur (Torrans, 2005).

1.4.3. Organik karbon kaynağı

Biyoflok havuzlarında ortama bir organik karbon kaynağı eklenmesi, aerobik mikrobik metabolizmanın artmasına neden olur. Bu, biyoflok havuzlarında çözünmüş oksijenin azalmasına neden olur ve bu da bazı kültür türleri için öldürücü bir sonuç olabilir (Landman et al., 2005). Bu tür vakalarda heterotrofik biyokütleyi aynı havuzda kültürlemek yerine farklı biyoflok reaktörlerde büyütmek daha iyi olabilir. Dolayısıyla bu floklar, DO seviyesinin

değişiminden etkilenmeden ve stres olmadan, sadece gıda olarak kullanılabilecektir. Kültüre organik karbon sağlamak için ya havuzlara (örneğin, glikoz, asetat, gliserol, ...) verilir veya organik karbon içeriği değiştirilerek yem şeklinde verilir (Avnimelech, 1999). Depolama polimerlerinin türü ve miktarı, üretilen flokların bileşimini doğrudan etkiler (Hollender et al., 2002; Oehmen et al., 2004). Örneğin, ardışık seri reaktörlere (SBR) asetat doz olarak verildiğinde, baskın tip depolama polimerinin poly-β-hydroxybutyrate olduğu açık bir şekilde gösterildi. Ancak, propiyonatın SBR'ye dozajı yapılırken, depolama polimeri türü esas olarak; 3-hidroksi-2-metil valerat ve polihidroksivalerattır (Yagci vd., 2007). Ayrıca, tercih edilen bir diğer önemli faktör, farklı organik karbon kaynaklarının maliyetidir (Salehizadeh and Van Loosdrecht, 2004). Depolama polimerinin tipinin maliyetlere ve SBR'ye verilen karbon türüne bağlı olduğunun görülebileceği gibi aynı zamanda BFT'nin başarısı da, biyodizel üretimin yan ürünü olan gliserol gibi düşük değerli ürünler olarak düşünülebilecek doğru seçeneklere bağlıdır (Dubé et al., 2007).

1.4.4. Organiklerin eklenme oranı

Organiğin miktarı ve hangisinin suya eklenmesi gerektiğinin bilinmesi oldukça önemlidir. Bu, teknik faktör için önemli bir süreçtir. İpliksi bakteriler, filamentsiz bakterilere kıyasla daha yüksek yüzey-hacim oranına sahiptir. Bu, ipliksi bakterilere düşük substrat seviyelerinde daha fazla avantaj sağlar. Dahası, bir ipliksi bakterinin flokların dışına nüfuz edebilmesi ipliksi olmayan bakterilere kıyasla daha yüksektir ve bu yüzden ipliksi bakterilerin substrat konsantrasyonları, ipliksi olmayan bakterilerden daha yüksektir (Martins et al., 2003). Organik karbon besleme stratejisi BFT için de önemlidir. Organik karbon, sürekli veya daha büyük dozlarda ancak belirli bir zaman periyodunda (örneğin; günde 1 kere) küçük miktarlarda ilave edilebilir. Başka bir uygulama türü de tokluk ve açlık rejimi olarak bilinir (Salehizadeh and Van Loosdrecht, 2004) ve geçici substrat temini koşullarıyla sonuçlanır. Mikrobiyal biyokütle yeterli miktarda besin madde bulunduğunda poli-β-hidroksibutirat gibi rezervleri depolayabilir ve böylece mikroorganizmalar besin yetersizliği döneminde bunları kullanmaya başlayabilir. Görüldüğü gibi biyoflokların akuakültüre kattığı değer, depolama ürünleri

açısından büyük önem arz edebilir. Ancak, amaç yedek malzemeler üretmek ise, sürekli olarak organik karbon kaynaklarının uygulanmasını tercih etmemek daha iyidir. Yukarıda açıklanan bu parametrelerin hepsi, su ürünleri yetiştirme sistemlerinde ayarlanabilir. Fakat aynı zamanda flok özelliklerini etkileyen ancak değişmesi daha zor olan iki parametre daha bulunmaktadır.

1.4.5. Sıcaklık

Kültürü yapılan alg türleri farklı sıcaklık aralıklarını tolere edebilir, ancak mikroalg yetiştirme için optimum sıcaklık (18-20°C) genellikle türlere ve yaşadığı ortamlara göre değişir (Cho et al., 2007; Barsanti and Gualtieri, 2014). Antoniou et al. (1990) 15-25°C aralığındaki sıcaklığın nitrifikasyon bakterileri için iyi olduğunu saptamışlardır. Ancak, sıcaklığın etkisi karmaşıktır. Aktif çamur numuneleri üzerinde sıcaklığın flok morfolojisi ve mukavemeti üzerine etkisini araştırmak için araştırmalar yapılmıştır. Daha düşük (4°C) ve yüksek sıcaklıklarda (18-20°C) karşılaştırıldığında, flokların düşük sıcaklıktaki flokülasyonda çözülmeler ve bozulmalar meydana gelmiştir. Bu, mikrobik aktivitenin azalmasının bir açıklaması olabilir (Wilén et al., 2000). Yüksek sıcaklıklarda (30-35°C); aşırı miktarda hücre dışı polisakkaritlerin üretilmesi nedeniyle çamur hacmi artmıştır (Krishna and Van Loosdrecht, 1999). 20-25°C su sıcaklığının, yaklaşık 200 ml g^{-1} olan flok hacim endeksi olan dayanıklı flokları elde etmek için en iyi olabileceği düşünülmektedir. Mikrobik metabolizma ve belirtilen depolama polimerleri (organik ekleme oranı bölümünde belirtilmiştir) için görülebileceği gibi sıcaklık, su ürünleri yetiştiriciliği ve biyoflok teknolojisi için kritik bir role sahiptir. Krishna and Van Loosdrecht (1999); yüksek sıcaklıklarda (35°C) polihidroksibutirat (PHB) oluşumunun, düşük sıcaklıklara (15°C) kıyasla %75'den fazla olduğunu göstermişlerdir. Çözünmüş oksijenin sıcaklığı ve miktarı suda birbirine yakın bir ilişkiye sahiptir (Boyd, 1998). Görüldüğü gibi, kültür türleri sıcaklık ve çözünmüş oksijen seviyesinden etkilenir. Su sıcaklığını değiştirmek için BFT havuzlarında ekstra işletme maliyetleri olmaktadır. Özellikle açık hava havuzlar için işletme maliyetleri daha da yüksekdir. Bu problemlerden dolayı iklim koşulları genel olarak kültür sistemlerinin sıcaklığına karar vermektedir.

1.4.6. pH

Mikroalg türlerinin birçoğu için pH aralığı genellikle 7 ile 9 arasındadır. Optimum aralık ise 8.2-8.7 arasındadır, ancak daha fazla asit/bazik ortamlarda bulunabilen bazı türleri de vardır. PH değişimi, hücrenin proseslerini önemli ölçüde etkileyebilir. Bu da hücrenin bozulmasını veya daha fazla çöküşünü sağlayabilir. Ayrıca, pH yalnızca mikroalgları etkilemekle kalmaz, aynı zamanda $CO_2/HCO_3^-/CO3_2^-$,NH_3/NH_4^+ dengelerini, fosfor ve ağır metal kullanılabilirliğini de değiştirebilme yeteneğine sahiptir (Laliberte et al., 1994; Muñoz and Guieysse, 2006). Dahası, abiyotik besleyici uzaklaştırma işlemleri için pH değeri 9-11 arasındaki bir pH değerinde olduğu için, giriş nitrojeni ve fosforun bir kısmı amonyak sıyırma ve ortofosfat çökeltisi yoluyla giderilir (Nurdogan and Oswald, 1995; Muñoz et al., 2005; Zhang et al., 2012). PH seviyelerindeki değişiklikler alg-bakteri kültüründe bakteri aktivitesini etkiler.

Alg-bakteri esaslı sistemlerle atıksu arıtımı sırasında, pH'ı çeşitli faktörler etkileyebilir. Mikroalglerin CO_2 alımı ve nitrat alımı arada bir alkaliniteye neden olabilir (Gutzeit et al., 2005; Perez-Garcia et al., 2011). Nitrifikasyon işlemi ve amonyum tüketimi, H^+ salınmasına bağlı olarak pH'ın düşmesine neden olur (Gonzalez and Bashan, 2000; Xin et al., 2010). Ve nihai olarak pH seviyesi, sistemlerde yukarıdaki faktörlerin bir kombinasyonunun sonucu oluşur.

Arıtılmış atık suyun inorganik/organik karbon oranı da kültürdeki pH değişiklikleri ile ilgilidir. Yüksek bir inorganik/organik karbon oranı yüksek pH'ya yol açar ve bunun tersi de olabilir (Van Den Hende et al., 2011).

1.5. Su Ürünleri Yetiştiriciliği İçin Biyoflok Teknolojisinin Genel Katkısı

Biyoflokta, kültürü yapılan organizmaların dışkıları ve ortamda bulunan tüketilmemiş yem atık azota neden olur ve aynı organizmalar için proteinli yiyecek haline dönüşür. Biyofloklar geleneksel gıdaların tam olarak değiştirilmesine izin vermezler, ancak gıda üretim maliyetlerinin %40-50'sini

temsil ettiğinden işlem maliyetinin düşürülmesi için hala bir şans oluşturabilirler (Craig and Helfrich, 2002). Günümüzde araştırmacılar ağırlıklı olarak, yem ürünlerinin bileşimine odaklanmalı, enerji içeriklerini ve su kültür türlerine yönelik sindirilebilirliğini artırmaya çalışmalıdır. Teorik olarak hesaplama yaparak, yiyecek tasarrufları hakkında yaklaşık fikir sahibi olmak mümkündür. Örneğin, tilapia yaklaşık %30 protein içerikli gıdalarla ve ortalama bir gıda dönüşüm oranı olan 2:2 ile kültürü yapılabilir (Kang'ombe et al., 2007).

Dolayısıyla su değişimi, su kalitesini değiştirmeden başarılı bir şekilde yapılabiliyorsa, kültürü yapılan organizmalar tarafından tüketilmeyen besin maddelerinin miktarını azaltmak da mümkün olabilir (Lezama-Cervantes and Paniagua-Michel, 2010). Bu nedenle, su arıtımı için büyük miktarda maliyet düşürülebilir. Crab et al. (2007), biyolojik kontaktörlerin dönmesi durumunda 1.1 € kg yıllık balık üretiminden, akışkanlaştırılmış kum biyo-filtrelerinde 0.2 € kg yıllık balık üretimine kadar değişen farklı arıtma tekniklerinin maliyetlerinin bir özetini vermiştir. Biyoflok teknolojisi sağlam, ekonomik ve kullanımı kolay olan bir tekniktir.

Nihayetinde ve önceki ile bağlantılı olarak biyoflok teknolojisi, uygun su sıcaklığı, iyi su kalitesi ve düşük/hiç su alış verişinde yüksek balık sağ kalımı, kış aylarında daha düşük sıcaklık dönemlerinin üstesinden gelmek için sera havuzlarının muhafazası gibi özel durumlarda da kullanılabilir.

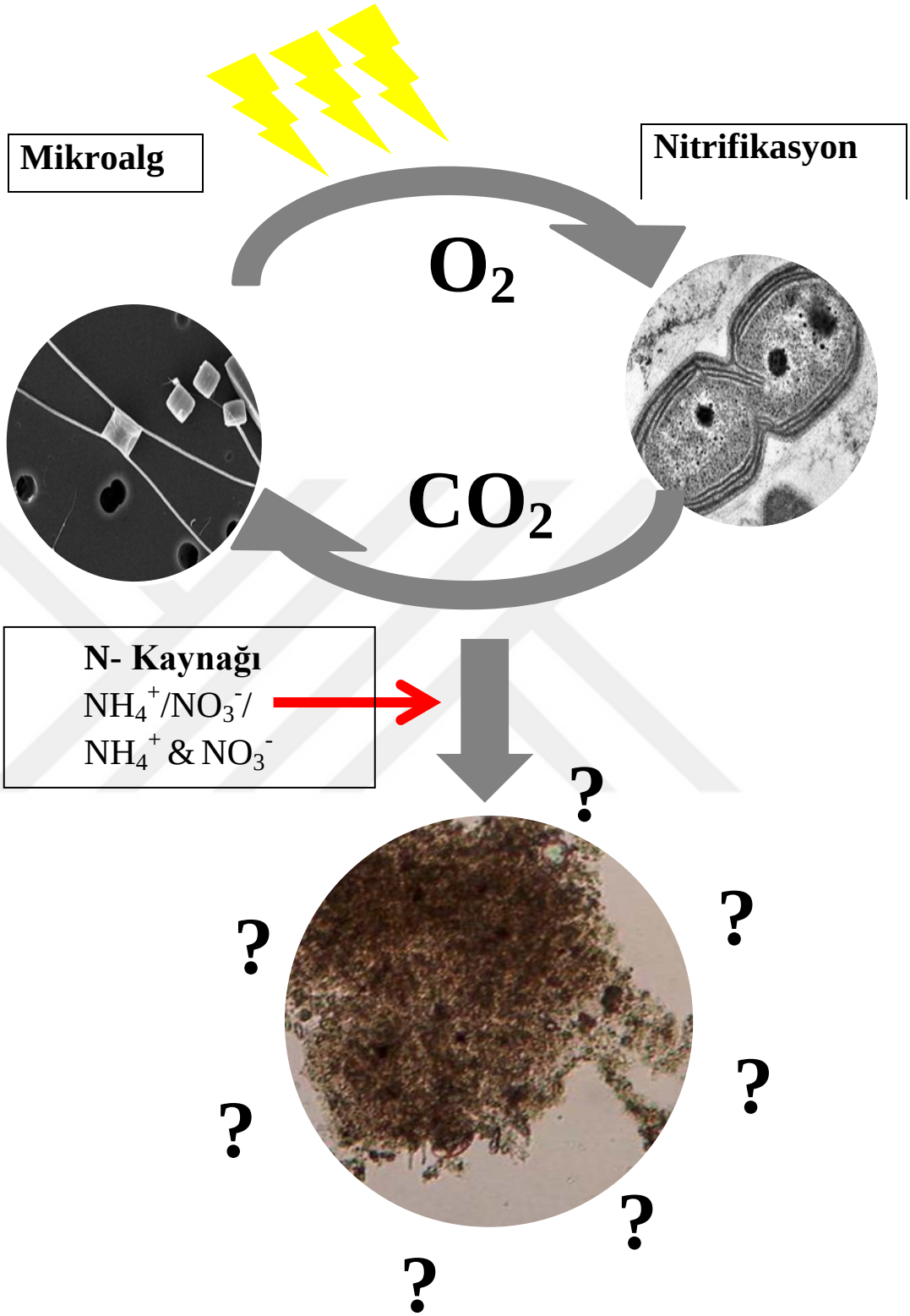
1.6. Tezin Kavramsal Çerçevesi

Su ürünleri yetiştiriciliğini daha sürdürülebilir kılmak için küresel olarak bu konu üzerinde durulmaktadır. Şu anda, biyoflok teknolojisinin kullanımı, su ürünleri yetiştiriciliği alanında giderek daha fazla yoğunlaşmış durumdadır ancak ağırlıklı olarak mühendislik-dışı bir yaklaşımla uygulanmaktadır. BFT'yi destekleyen biyolojik ve biyoteknolojik kavramları anlamak, üreticinin bu temiz teknoloji ürününün geri dönüşümünden kaynaklanan avantajları en üst düzeye çıkarmak için önemli bir ilerleme sağlayacak ve sahada BFT uygulamasının yaygınlaşmasına neden olacaktır. Bununla birlikte, mevcut operasyonel

parametreler çoğunlukla bir deneme yanılma temelinde olmakta ve daha bilimsel bir yaklaşıma doğru kaymaya ihtiyaç vardır.

Bu tezde esas olarak, mikroalg *Chaetoceros mülleri* (Lemmermann, 1898) ile *Nitrosomonas* sp. ve *Nitrobacter* sp. içeren karışık bir nitrifikasyon yapan bakteri topluluğu arasındaki etkileşimin anlaşılmasına odaklandık ve bu konsorsiyomun potansiyel olarak bir gıda maddesi olarak görev yapabileceğini düşündük. Aynı zamanda bu birliktelikle ortamdan amonyak (NH_3^-) ve nitrat (NO_3^-) gibi kirliliğin seçici olarak giderilmesi için müdahaleci olmayan bir teknik uyguladık. Daha önce yapılan çalışmalar (Effendy et al., 2016, Piérri et al., 2014) biyolojik floklardaki nitrifikasyon yapan bakterilerin özellikle ilgi çekici olduğunu belirttiler ve bu floklarla beslediklerinde beyaz karidesteki bağışıklık sistemini uyaran probiyotik aktivitelere ve onları hastalıklara karşı daha dirençli hale getirmiştir. Ancak, flok bileşiminin ve azot uzaklaştırma potansiyelinin yanında, oluşan topluluğun besin değeri de yüksek olmalıdır. İstiridyeler gibi çift kabuklular için ideal biyoflok yemi, yüksek bir protein içeriği olmalı ve yüksek besin değeri içermelidir (örneğin, yüksek oranda doymamış yağ asitleri ihtiva etmelidir).

Biyolojik flokların besin değeri mikrobik topluluğu manipüle ederek değiştirilebilir. Daha sonra karbon kaynağı, azot kaynağı, ışık koşulları vb. değiştirilerek kontrol edilebilir. Bu çalışmada özellikle farklı inorganik azot bileşiklerinin ve kombinasyonlarının etkisi araştırılmıştır (Şekil 1.5). Farklı koşulların başarısı, (i) algal büyümesi ve (ii) toplam biyokütle üretimi ve zamanla amonyak giderme (ve nitrat artışı) izlenmesi olmak üzere iki şekilde değerlendirildi.



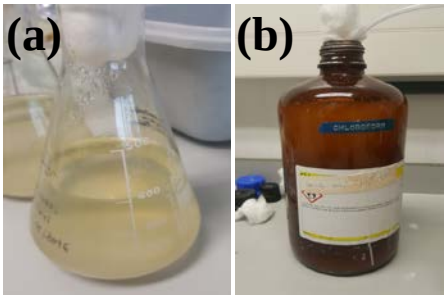
Şekil 1.5. Bu tezin amacı ve şemasının şematik taslağı.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Kültürler

Deniz mikroalgi *Chaetoceros mülleri*, Gent Üniversitesi, Akuakültür Laboratuvarı ve Artemia Referans Merkezi, Belçika'da elde edildi ve yetiştirildi. Mikroalgler, nitrat içeren, otoklavlanmış (121°C'de 20 dakika) Walne ortamı (Laing, 1991) ile zenginleştirilmiş doğal deniz suyu ortamında fototrofik olarak 3500 lux ışık şiddeti altında yetiştirildi. Hücreler, 400 mL ortam içeren 500 mL'lik Erlenmeyer şişeleri içinde büyütüldü ve daha sonra sürekli aydınlatma ile 20-21.5°C'de 4 L ortam içeren 4 L şişeye aktarıldı (Şekil 2.1). Günlük kültürler sedimantasyon ve şişelerin altındaki hücrelerin birikmesini önlemek için elle çalkalandı ve 4 L ana kültür şişesine aktarıldıktan sonra havalandırılmaya başlandı.

Tüm deneylerde kullanılan Nitrosomonas cinsine bağlı TAN (Toplam Amonyum Azot) oksitleyici bakterilerden ve Nitrobacter cinsine bağlı bir nitrit oksitleyici bakteriden oluşan nitrifikasyon bakterilerinin karışık kültürü, Akuakültür & Artemia Referans Merkezi Laboratuvarından elde edilmiş ve kemoterapötik formülasyonda büyütülmüşlerdir. Kültür 7.5 ila 8.5 arasındaki bir pH'da bir kalsiyum karbonat tamponlu ortamda oda sıcaklığında yetiştirildi ve sürekli havalandırıldı.



Şekil 2.1. Bu çalışmada kullanılan kültürler. a) *Chaetoceros mülleri* sıvı kültürü b) *Nitrosomonas* sp. ve *Nitrobacter* sp. içeren sıvı kültürü. Kültür devamlı olarak havalandırılmıştır.

2.2. Kültürlenme, Ortam ve Büyüme Koşulları

2.2.1. Mikroalg ve bakterilerin birlikte yetiştirilmesi

Alglerin büyümesi, Nitrat (Walne_NO3), Amonyum (Walne_NH4) ve her iki nitrojen bileşiği (Walne_NH4 & NO3) ile nitrifikasyon bakterilerinin ilavesi olsun veya olmasın üç farklı Walne ortamında test edildi. Her koşul için büyüme, 2 L taze hazırlanmış ortam ihtiva eden 2 L ortam şişelerinde üç örnekleme ile yapıldı. Alg ölçümleri için ışık mikroskobu kullanıldı ve ml başına başlangıç konsantrasyonu 5-7.10^5 olan alg hücresi eklemek için her bir şişe için 4 litrelik ana kültürden yaklaşık 400 mL alınıp sistemlere ekildi.

Deney için nitrifikasyon bakteri hücrelerinin başlangıç konsantrasyonu Kuru Ağırlık (DW) ve Kuru Kül Ağırlık (AFDW) yöntemleriyle ölçülmüştür (Ameel et al., 1998). Bakteriyel hücre sayısı AFDW'nin bir yüzdesi olarak ifade edildi. Benzer bir bakteri konsantrasyonunu elde etmek için 1:1 konsantrasyonda algal ve bakteri hücreleri ekildi ve şişelere 700 µL'lik nitrifikasyon bakteri karışımı kullanıldı (AFDW hesaplaması için detaylar biyokütle izleme bölümünde anlatılmaktadır). Denemeyi başlattıktan sonra, her gün aynı miktarda ışığı sağlamak için şişelerin konumu değiştirildi.

Kültür şişelerini oksijene doyurmak ve homojen tutmak için sürekli olarak havalandırma yapılmıştır. Havalandırma, şişelerin tabanında sedimantasyon ve hücrelerin birikmesini de önlemektedir. Kültürler, sürekli aydınlatma ile 20-21.5°C'de inkübe edildi (Şekil 2.2).

Şekil 2.2. Nitrifikasyon bakterileri ilaveli veya ilavesiz farklı azot ortamlarında algleri yetiştirme düzeneği.

2.2.2. Walne ortamı bileşimi

Walne ortamı, çoğu alg türü için uygun olan en yaygın kullanılan ortamlardan biridir.

Standart Walne aşağıdaki kompozisyona sahiptir:

Solüsyon 1:

Na_2EDTA	45.00 g
H_3BO_3	33.60 g
$NaNO_3$ or KNO_3	100.00 g veya 116.00 g
$NaH_2PO_4.H_2O$	20.00 g
$MnCl_2.4H_2O$	0.36 g
$FeCl_3.6H_2O$	1.30 g
Solüsyon 2	1.00 mL

Yukarıdaki kısım, damıtılmış su ile 1 L'ye getirilir.

Solüsyon 2:

$ZnCl_2$	2.1 g
$CoCl_2.6H_2O$	2.0 g
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	0.9 g
$CuSO_4.5H_2O$	2.0 g

Yukarıdaki örnek, damıtılmış su 100 mL'ye getirildi ve iyi bir çözünme elde edildi.

Solüsyon 3 (Vitamin karışımı):

Thiamine	10 mg
Cyanocobalamin	10 mg
Biotin	200 µg

Yukarıdaki madde, sterilize edilmiş damıtılmış su ile 100 mL'ye getirilir.

1 L Walne solüsyonu elde etmek için; 1 mL solüsyon 1 L deniz suyuna eklenmiştir. Ortam şimdi kullanıma hazırdır ve pH değeri yaklaşık 9 olmalıdır.

Azot kaynağı olarak sadece nitrat içeren standart Walne ortamının yanında, mevcut olan azot kaynağı açısından iki farklı modifiye Walne ortamı araştırıldı. Tek bir azot kaynağı olarak amonyum (solüsyonun 1 litresi başına 62.94 g NH4CI) ve bir diğer solüsyonun %50'si amonyum ve %50 nitrat olarak ihtiva eden bir

ortam (31.47 g NH4CI ve çözelti 1 litre başına 50 g NaN03). Ortam, N'nin toplam miktarı her üç ortamda (=16 mg/L) aynı olacak şekilde tasarlandı. Tanımı kolaylaştırmak için ortam ayrıca; Walne_NO3, Walne_NH4 ve Walne_NH4&NO3 ortamı olarak adlandırılacaktır. 11.9 mM (=1 g/L) nihai konsantrasyonda sodyum bikarbonat, deneyin başlangıcında pH 9 ortamını tamponlamak için kullanıldı. Sadece mikroalg içeren deney düzeneklerine karbon seviyesini hem algler hem de nitrifikasyon bakterilerin ilave edildiği deney düzeneğine benzer şekilde tutmak için 0,035 gr karbon eklenmiştir.

2.3. Analitik Metotlar

2.3.1. Amonyum ve nitrat hesaplaması

Farklı ortamda farklı azot kaynaklarının izlenmesi için kolorimetrik yöntemler kullanıldı. Amonyum Nessler metodu ile (HI-93715-01), nitrat ise Kadmiyum indirgeme metodu (HI-93728-01) ile belirlendi ve her ikisi de HANNA cihazlarından elde edilmiştir. Her iki azot bileşiği tayini için, 2 mL kültür örneklendi ve 10 dakika 10000 devir/dk hızında santrifüje tabi tutuldu. Daha sonra, 1 mL alındı ve 1:10 oranında doğal deniz suyu ile seyreltildi. Sonunda bu 10 mL, bir cam küvete aktarılmış ve bir çok parametreyi ölçebilen fotometreye yerleştirilmiştir (Hanna Instruments, HI-83099). Amonyak için 420 nm ve nitrat için 525 nm'de dar bantlı bir girişim filtresine sahip bir lamba, oda sıcaklığında reaksiyonu ölçmek için kullanıldı. Amonyum, Toplam Amonyum Azotu (TAN) olarak ileride yazılacaktır. TAN-N test aralığı 0,01 mg/L çözünürlük ve 0,05 mg/L doğruluk oranı ve 0.00 ila 10.00 mg/L arasındaydı. Nitrat test aralığı 0,1 mg/L'lik bir çözünürlükle 0,0-30,0 mg/L arasında ve ± 0,5 mg/L hassasiyetindeydi.

2.3.2. Algal büyüme ölçümü

Algal büyüme, önce bir Bürker hücre sayım odası vasıtasıyla hücre sayısının sayılması yapıldı (Şekil 2.3A). Bu tekniğin zaman alıcı özelliği nedeniyle spektrofotometre alternatif ve hızlı bir yöntem olarak değerlendirilmiştir.

Spektrofotometre, optik yoğunluğu (OD) belirli bir dalga boyunda kaydetmek için uygun bir yöntemdir. OD, Beer-Lambert Absorbans kuralı ile belirlenebilen, geçirgenlik açısından temsil edilmektedir (Adrien, 1998). Beer-Lambert kuralı, bir numunenin konsantrasyonunu, numuneyi ışık geçirgenliğindeki zayıflamayla ilişkilendirir. Böylece hücre yoğunluğu ([x], hücreler/mL) OD ile korelasyon gösterebilir (Myers, 2013).

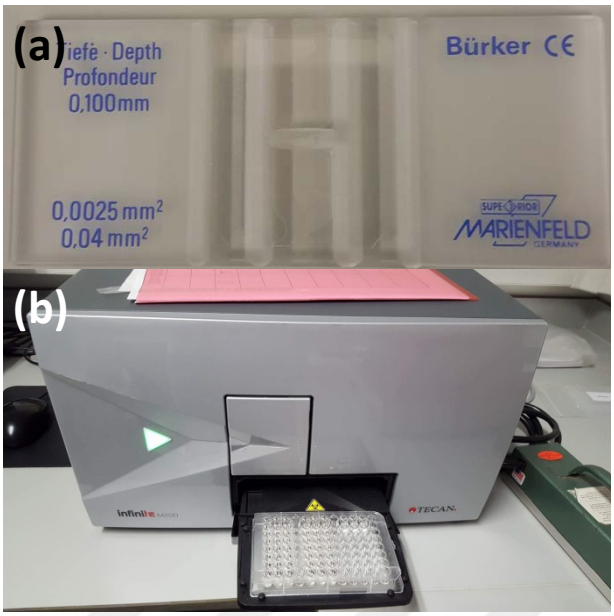
$$[X] = k \times OD$$

Belirli bir kültür örneği için iyi bir korelasyon, hücre sayısı ile spektrofotometrik absorbans arasında doğrusal bir ilişki ortaya koymalıdır. İlk adım olarak, alg hücre sayıları ile absorbans okuması arasındaki korelasyon araştırıldı. Maksimum absorbans, 600 ila 800 nm dalga boyu arasındaki bir kültür örneğinin taranmasıyla incelendi (Infinite M200 spektrofotometre (Tecan)). En yüksek absorbans değeri daha sonra alg yoğunluğu eğrisinin kalibre edilmesi için kullanılmıştır. Spektrofotometre absorbansı ile sayılan hücre sayısı arasındaki ilişki genel bir güç denklemini izler:

$$\text{Absorbans} = a.(\text{Hücre/mL})b$$

Burada a ve b, absorbans ve yoğunluk verilerinin log dönüşümünden sonra doğrusal regresyon için standart en küçük kareler prosedürleri kullanılarak tahmin edilen kalibrasyon katsayılarıdır.

Bunun için, sabit ışıkla aydınlatma büyüme koşulları altında olan aktif olarak büyüyen algal hücre süspansiyonları, hücre sayımları yaparak ve 650 nm'de hücre emilimini, Infinite M200 (Tecan) spektrofotometre kullanıp ölçüm yapılarak nicelleştirildi (Şekil 2.3). Algal kültürlerin ışık emiliminin ölçülmesi için aşağıdaki prosedür uygulandı. Numuneler, deniz suyuyla 5 kez seyreltildi. Numunelerin optik yoğunluğunu (üçlü ölçümler) ölçmek için numuneler başına 3 kez 300 µl'lik örnek 96 gözenekli bir mikroplakaya (düz şeffaf tip) aktarıldı. Sonuçlar Şekil 3.1.'de gösterilmektedir. Hücre sayısına göre çizildiğinde, hücrelerin ışık dağılımını yansıtan emilim ölçümleri, alg türü *Chaetoceros muelleri* için lineer bir ilişki olduğunu gösterir. Bu kalibrasyon eğrileri absorbans okumasına dayanan hücre sayısını belirlemek için kullanılabilir.



Şekil 2.3. Algal büyüme izlenimi. a) Bürker hücre sayım odası, hücre sayısını sayarak nicel biyokütle tayinine izin verir, b) Spektrofotometre, bir malzemenin dalga boyunun bir fonksiyonu olarak yansıma veya iletme özelliklerinin nicel bir ölçümüne izin verir.

2.3.3. Biyokütle izleme

Kültür başına toplam madde (organik ve inorganik) ve toplam organik madde artışı, Kuru Ağırlık (DW) ve Kuru Kül Ağırlık (AFDW) kullanılarak sırayla yapılmıştır. Oksidasyon üzerindeki kayıp, bu numunenin organik içeriğinin ağırlığıdır (AFDW) (Ameel et al., 1998).

Porselen krozeler 15-30 dakika boyunca 1:3 seyreltik hidroklorik asit çözeltisi içinde yıkandı ve daha sonra hidroklorik asit izlerini uzaklaştırmak için suda yoğun bir şekilde durulandı. Daha sonra krozeler, 30 dakika boyunca 150°C'lik yakma fırınına yerleştirildi. Tartım öncesi, krozeler desikatörlerde oda sıcaklığına soğutuldu. Soğuyan krozeler, kroze ağırlığını elde etmek için tartıldı (=A). 4 mL numune krozelere ilave edildi ve yaş ağırlığı elde edildi (=B). Krozeler daha sonra 103°C'ye yerleştirilip 4 saat boyunca bekletildikten sonra kuru ağırlığı elde edildi (=C). Son olarak, krozeler 600°C'de en az 6 saat bekletildi ve soğutulmuş krozelerin tartılmasından sonra kül kuru ağırlık (=C') elde edildi.

Kuru ağırlık, kuru ağırlık yüzdesi ve kül %'si aşağıdaki formüllerle hesaplandı:

Kuru Ağırlık Yüzdesi (DW %) = $\frac{(C-A) \times 100}{(B-A)}$

Kuru Ağırlık (DW) = $\frac{(B-A) \times DW\%}{100}$

Kuru Kül Ağırlık (AFDW %) = $\frac{(C-A) \times 100}{DW}$ (Ameel et al., 1998)

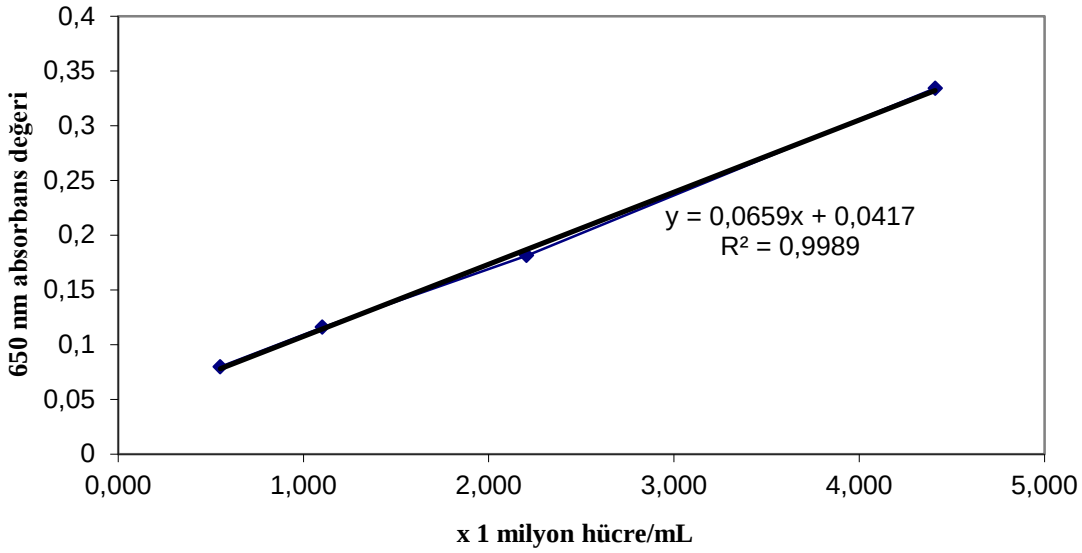
2.3.4. Fizikokimyasal parametreler

Kültür ortamının izlenmesi, 3-4 günde bir kültürlerin pH ve sıcaklığı izlenerek gerçekleştirildi.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Alg Hücre Sayıları ve Biyokütle Arasındaki Korelasyon

Algal hücre sayıları ile biyokütle arasındaki korelasyon Şekil 3.1'de çizilmiştir. Emme ölçümleri, hücreler tarafından ışık saçılımı derecesini yansıtan hücre sayısına karşı işaretlendiğinde alg suşu *Chaetoceros muelleri* için güzel doğrusal ilişkiyi ortaya koymaktadır. Bu çalışmanın geri kalan kısmı için, bu kalibrasyon eğrileri, absorbans okumasına dayanan hücre sayısını belirlemek için kullanıldı.



Şekil 3.1. Işık saçılması ile uyarılan alg hücre sayımları ve absorbans arasındaki korelasyon. Kalibrasyon eğrisi, Walne_N03 ortamında yetiştirilen mikroalg türü olan *Chaetoceros muelleri* için ışık saçılımı ile indüklenen absorbansın ölçülmesine dayanılarak elde edildi.

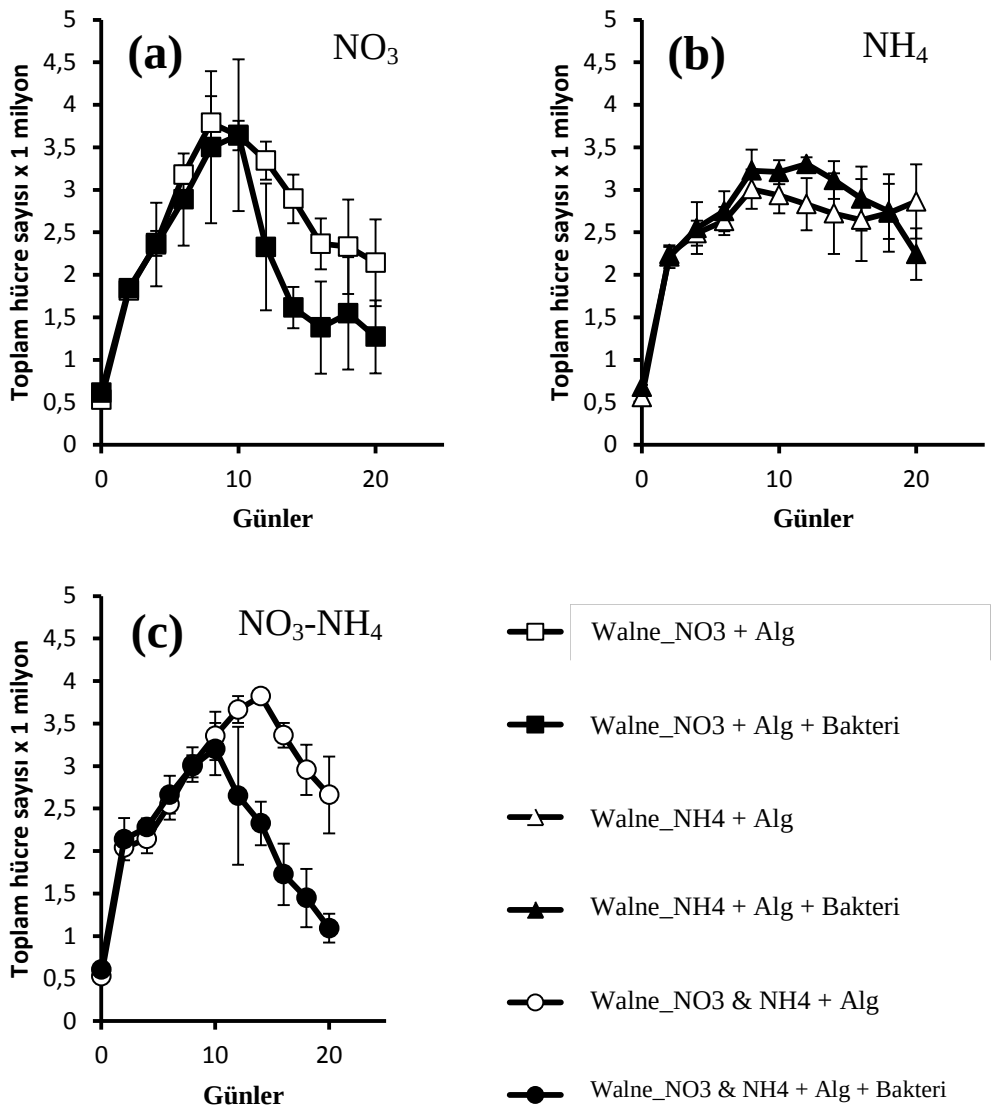
3.2. Farklı İnorganik Nitrojen Koşullarında Bakteri ve Alg Büyümesi

3.2.1. Algal büyüme

Üretilen *Chaetoceros muelleri*'nin hücre sayıları, bütün Walne ortamlarında 8 günden fazla inkübe edilinceye kadar hemen hemen katlanarak yükselmiştir

(Şekil 3.2, A-C). Algal hücre sayısının artmasının durağan faza geçmesi, yavaş yavaş düşmesi 10. günden başlamak üzere Walne_NO3 ve Walne_NH4 için ve 16. günden itibaren Walne_NO3&NH4 için gözlemlenmektedir. En fazla büyüme; Walne_NO3 ve Walne_NO3&NH4'de ve sırasıyla $3.79x10^6$ ($\pm0.32x10^6$) ve $3.82x10^6$ ($\pm0.07x10^6$) olmuştur. Walne_NH4 ortamı sadece maksimum hücre yoğunluğu $3.00x10^6$ ($\pm0.23x10^6$) ile sonuçlandı.

Chaetoceros muelleri ile *Nitrosomonas* sp. n *Nitrobacter* sp. den oluşan nitrifikasyon kültürü ile birlikte yetiştirilmesinin alg büyümesi üzerine ya etkisi olmamıştır (standart Walne ortamı (Walne_NO3)) ya da büyümeye katkısı olmuştur (nitrat yerine amonyumun olduğu ortam (Walne_NH4)) veya negatif etki etmiştir (nitrat ve amonyumun eşit oranda olduğu ortam Walne_NO3&NH4) (Şekil 3.2, A-C). Walne_NH4 ortamında kültür, yetiştirilmiş algal kültüre de olan $3.00x10^6$ ($\pm0.32x10^6$) hücreye kıyasla, $3.30x10^6$ ($\pm0.08x10^6$) hücreye sahip Walne_NH4 ortamı için daha yüksek bir hücre sayısına neden olan alg büyümeyi uyardığı görülmüştür (Şekil 3.2B). Walne_NO3'teki maksimum algal hücre sayıları $3.64x10^6$ ($\pm0.89x10^6$) ile ve algal kültürdeki $3.79x10^6$ ($\pm0.32\ x10^6$) karşılaştırıldığında çok büyük bir istatistiksel fark görülmedi (Şekil 3.2A). Walne_NO3&NH4 ortamında olan yetiştirmede 16 gün sonra algal kültürdeki 3.82x106 (±0.07x106) hücreye kıyasla, ko-kültürde 10 gün sonra en fazla 3.2x106 (±0.3x106) hücre ile algal büyümede olumsuz bir etkiye sahip olmuştur (Şekil 3.2C). Maksimum hücre yoğunluğuna ulaşıldıktan sonra algal hücrelerin hızlı düşüş/ölümü hem Walne_NO3 hem de Walne_NO3&NH4 ortamında gözlemlenmiştir (Şekil 3.2A&C).



Şekil 3.2. Farklı inorganik azot ortamında büyüme. Büyüme, zamanla hücre sayısındaki artış olarak ifade edilmiştir. a) Walne_NO3'yi belirtmekte (kare), b) Walne_NH4'yi belirtmekte (üçgen) ve c) WalneNO3&NH4'yi belirtmekte (daire). Kapalı simgeler, nitrifikasyona uğramış bakterilerin alglerle birlikte yetiştirilmesine atıfta bulunmaktadır ve açık semboller ise alglerin farklı ortamlardaki büyümesine atıfta bulunur. Hata çubukları standart sapmaları temsil eder (n=3).

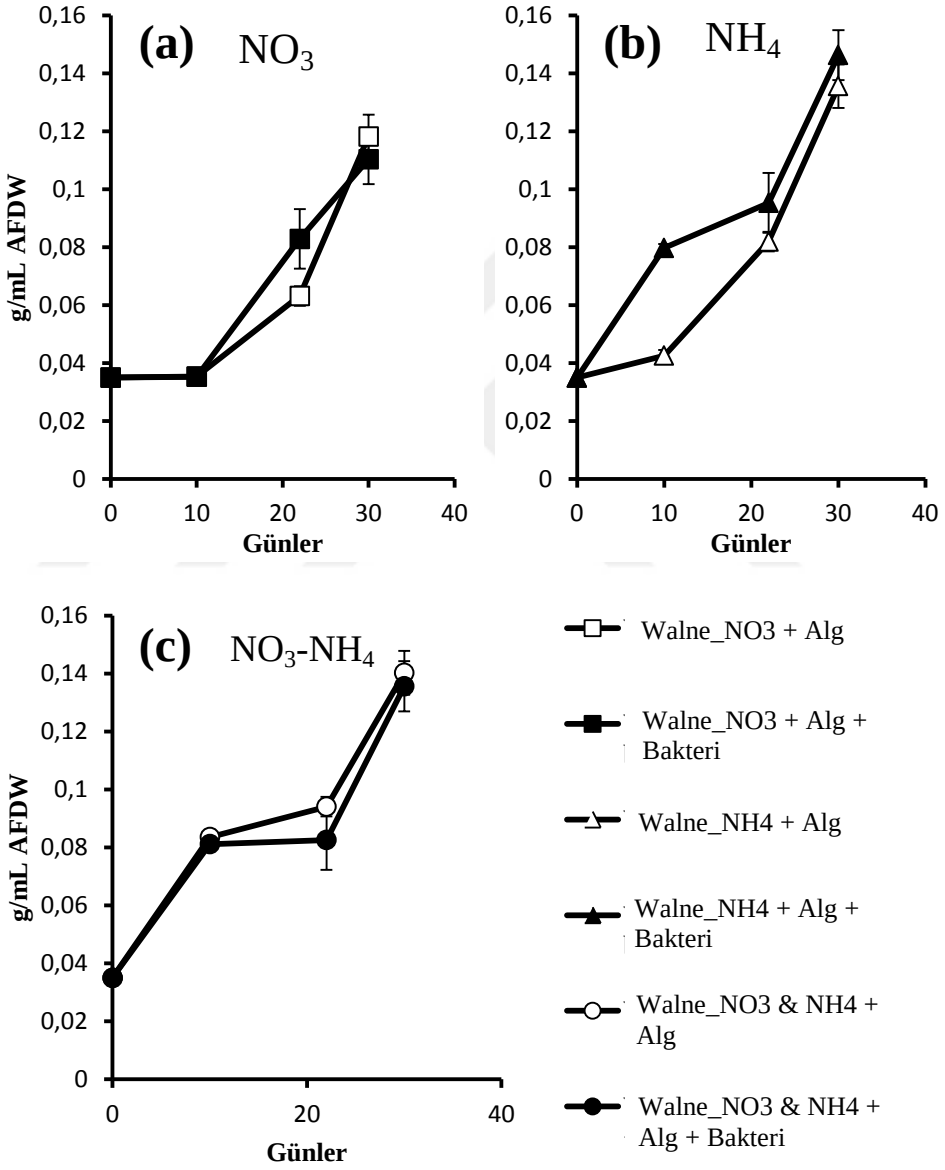
Büyüme ortamının unsurları yalnızca büyüme oranını değil aynı zamanda algal kültürlerin nihai hücre yoğunluğunu tanımlayan kritik bir değişkendir. Nispeten yüksek karbon içeriği içeren ortam formülasyonlarının, zayıf karbon ortam formülasyonlarına kıyasla hızlı ve yoğun alg hücresi büyümesini çok daha iyi destekleyebildiği iyi bilinmektedir. Bununla birlikte karbon içeriğinin yanında, azot kaynağı ve konsantrasyonu gibi diğer önemli unsurlar da önemlidir ve alglerin büyümesini etkileyebilir. Bu tür beslenme kısıtlamaları, kilit yapı taşı

bileşenlerinin eksikliğinden dolayı protein veya DNA sentezinde azalmalara neden olabilir. Mikroalglerin N içeriği %1 ila %10 arasında, bulunabilirliği ve kaynağına göre değişim göstermektedir (Markou and Georgakakis, 2011). Mikroalglerin; NH_4^+, NO_2^-, NO_3^-, N_2, üre ($CO(NH_2)_2$), NO, NO_2 ve organik nitrojen (e.g. amino acids) gibi çeşitli azot kaynaklarını kullanabilecekleri bilinmektedir (Graham and Wilcox, 2000b; Nagase et al., 2001; Becker, 2008). Çoğu alg, NH_4^+ ve NO_3^-'yi alabilir ancak NH_4^+'ü daha çok tercih ederler. Çünkü; N ihtiva eden organik bileşikler NO_3'den daha kolay bir şekilde doğrudan kullanılabilir. Ortamlara benzer miktarda N (=16 mg/L) ilave edildiği ve alglerin tercih ettiği azot kaynağı amonyum olduğu için, Walne_NH4 ortamının en düşük maksimum hücre yoğunluğuyla sonuçlandığı beklenmedik bir şekilde belirlendi. Ancak, bu çalışmada kullanılan mikroalg *Chaetoceros muelleri*'nin, nitrat için amonyumdan daha yüksek olması, nitratın daha düşük konsantrasyonlara kadar kullanılmasına izin vermediği görmezden gelinemez. Bu tür fizyolojik bilgiler, bu sonuçların açıklanmasında yardımcı olabilir.

Bakteriler ile mikroalgler arasındaki etkileşim konusunda birçok rapor mevcuttur (Grossart et al., 2006; Bilanovic et al., 2016). Bu çalışma raporlarının birçoğu, bakterilerin ve mikroalgelerin birbirleri üzerinde olabilecek olumlu etkilerinden bahsetmektedir. Bir yandan, mikroalglerin eksüdat ürünlerinden bakteriler faydalanabilir (Bell et al., 1974; Cole, 1982) ve diğer yandan mikroalgler, bakterilerden elde edilen ürünlerden faydalanabilir. Örneğin; remineralize besinler (Golterman, 1972), vitaminler (Fuentes et al., 2016) ve diğer büyüten faktörler (Paerl and Pinckney, 1996). Alglerin nitrifikasyon bakterileri ile birlikte daha fazla birlikte işlenmesi, oksijen inhibisyonunu ortadan kaldırabilir. Böylece fotosentez ile daha yüksek CO_2 sabitleme seviyelerine olanak tanır. Nitrifikasyon bakteri ve mikroalgelerin karışık kültürü, kontrollü mikroalg kültüründen daha yüksek bir biyokütle üretimine neden olabilir (aksenik yetiştirilen Chlorella'ya oranla %23 oranında daha yüksek biyokütle üretimi rapor edilmiştir) (Bilanovic et al., 2016). Alglerin ve bakterilerin birlikte kültürünün benzer bir pozitif etkisi Walne_NH4 ortamı için de gözlendi. Bununla birlikte, bakteri besin maddeleri için alglerle rekabet edebilir ve bazı koşullar altında alglerin büyümesini engelleyebilir. Walne_NO3 ve Walne_NO3&NH4 ortamlarındaki hücre yoğunluğu az olan alglerin; nitrifikasyon bakterileri ile

sinerjik olarak işbirliği yapmadığını ve bunun yerine mevcut besin maddeleri için rekabet ettiğini gösterebilir.

3.2.2. Biyokütle üretimi



Şekil 3.3. Farklı büyüme koşullarında zamanla toplam organik biyokütle üretimi. Biyokütle, zamanla kül kuru ağırlıktaki (AFDW) artış olarak ifade edilir. a) Walne_NO3 (kare), b) Walne_NH4 (üçgen) ve c) Walne_NO3&NH4 (daire)'yi ifade eder. Kapalı semboller, alglerin; farklı ortamlardaki büyümesine atıfta bulunan açık sembollerle karşılaştırıldığında, nitrifikasyon bakterilerin alglerle birlikte işlenişine işaret eder. Hata çubukları standart sapmaları temsil eder (n=3).

Zamanla biyokütle artımı AFDW ile ölçülmüştür. Walne_NO3 ortamı, diğer kültür ortam kompozisyonlarına kıyasla ve bakterilerin varlığı veya yokluğu göz önüne alınmaksızın, en düşük biyokütle üretimine sahip olduğu saptandı (Şekil 3.3A). Walne_NO3 veya Walne_NO3&NH4 için, zamanla biyokütle artışında veya bakteri eklensin yada eklenmesin bu konuda son biyokütle konsantrasyonunda açık farklar tespit edilemedi (Şekil 3.3A&C). Öte yandan Walne_NH4 ortamı için algler ve bakteriler birlikte yetiştirildiklerinde daha katı bir biyokütle artışı gözlemlenir ancak bakteri içermeyen algler büyümesine kıyasla nihai biyo kütle konsantrasyonunda belirgin bir fark ortaya çıkmadı (Şekil 3.3B).

Bu veriler, zamanla algal hücre büyümesi verileriyle çok tutarsız görünmektedir (Şekil 3.2). Algal büyümesinin 8-16 gün arasında maksimuma ulaştığı gözlemlendiğinde (Şekil 3.2), biyokütle birikimi, zaman içinde 30 güne kadar katlanarak artmaktadır. Bunu, bakteri gelişiminin algal hücrelerin azalmasını telafi edebileceği ya da algal hücrelerin sayısının azaldığı açıklayabilir (Şekil 3.2'de görüldüğü gibi), ancak algal hücre başına büyüklük artmaktadır (örneğin, depolama/hayatta kalma materyalinin birikimi ile). Bu, algal hücrelerin sayısı azalırken, zamanla biyokütlenin artmasına neden olur.

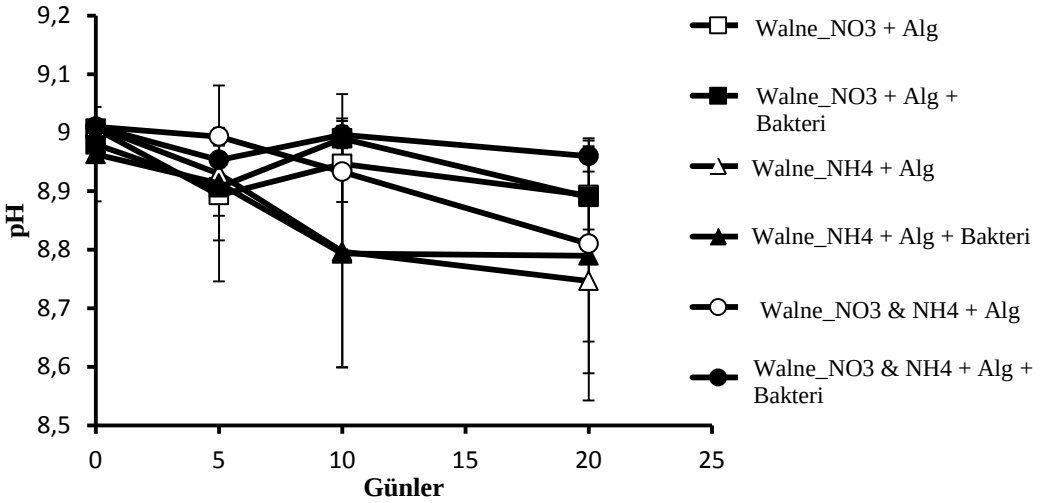
3.2.3. Fizikokimyasal parametreler

Sıcaklık

Kültürlerin sıcaklığı 3-4 günde bir izlendi. Algler, kullandıkları ışığın büyük bir bölümünü dönüştürdükçe, yüksek ışık miktarı ve yüksek biyokütle yoğunluklarında aşırı sıcaklıklar oluşabilir (Richmond, 2004). Bu sıcaklık artışları, suyun iyonik dengesini ve gaz çözünürlüğünü değiştirebilir (Jensen, 2003) ve besin madde kullanılabilirliğini ve mikroalgler tarafından alınımını etkilemektedir (Markou and Georgakakis, 2011). Daha fazla sıcaklık, alglerin protein, lipid, karbonhidrat ve pigment içeriğini etkileyebilir. Kültürlerde sıcaklıklar, kültürler daha yüksek hücre yoğunluklarına eriştiğinde bile 21°C sıcaklıkta sabit kaldı. Kültürler, 21°C sıcaklığı olan kontrollü bir odada ekimi yapıldığından, büyüme sırasında üretilen aşırı ısının odaya boşaldığını varsayabiliriz.

pH

PH, alg-bakteri konsorsiyumunda da önemli bir rol oynamaktadır. Bir yandan pH, amonyum oksitleyici bakterilerin substratı olan amonyak oluşması için yeterince yüksek olmalıdır, öte yandan ise buharlaşma yoluyla azot kaybı yüzünden alglerin büyümesini baskılayacak derecede yüksek olmamalıdır (Muñoz and Guieysse, 2006). Çoğu mikroalg türü 7-9 arasında bir pH seviyesi tercih eder (Kong et al., 2010). Daha yüksek pH toleransına sahip bazı türler de vardır (Örn. *Spirulina platensis* pH 9'da) (Qiang et al., 1998) veya daha düşük pH (Örn. pH 4'te *Chlorococcum littorale*) (Salih, 2011).



Şekil 3.4. pH Farklı büyüme koşulları için zaman içindeki pH değişimi. Hata çubukları standart sapmaları temsil eder.

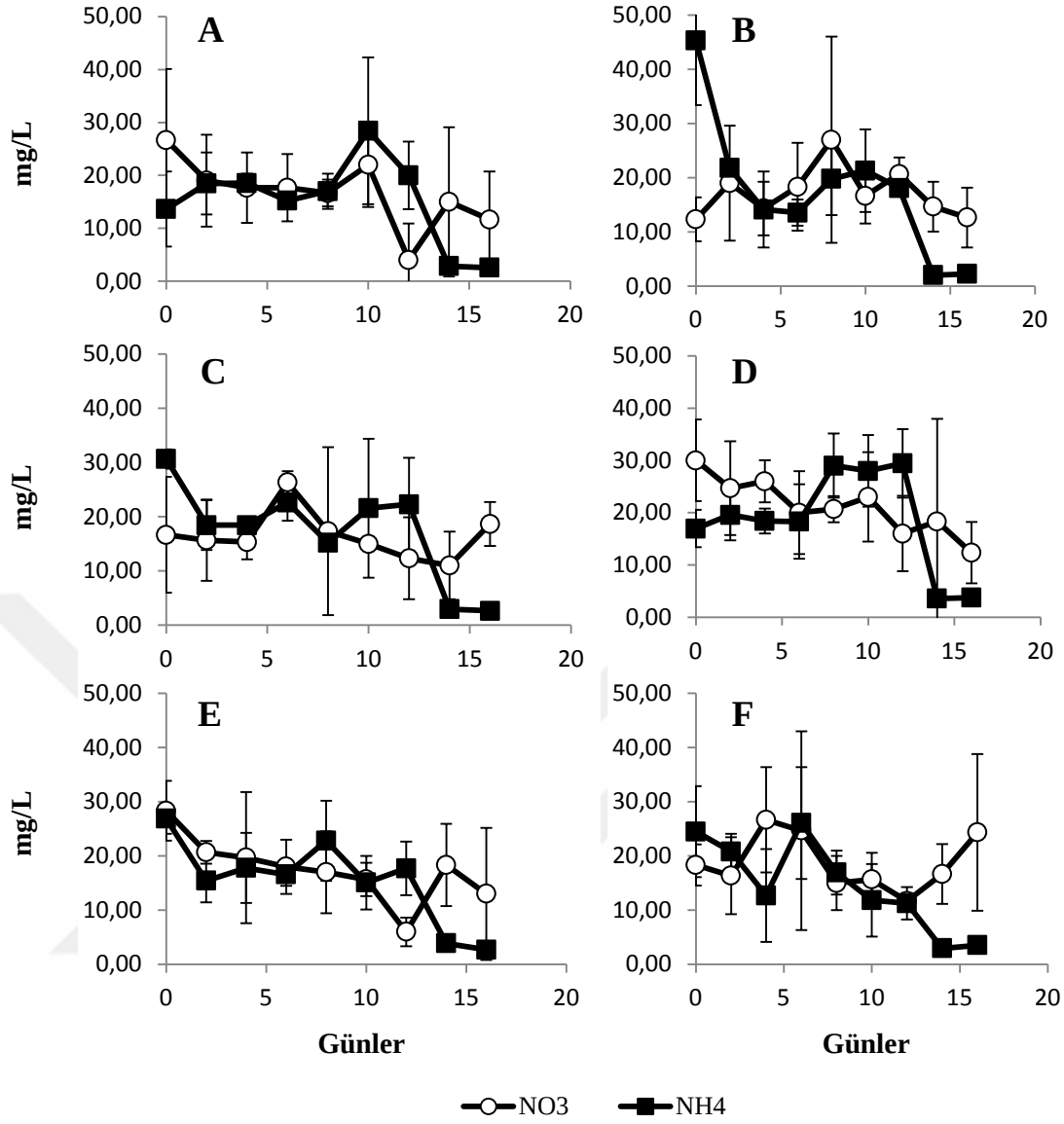
Fotosentez ile pH değerinin 9.5'in üzerine çıkması, amonyumdan amonyağa geçişe neden olur. Bu, mikroalg toksisitesi ve buharlaşma sonucu N kaybına neden olur (Muñoz and Guieysse, 2006). 10.5'in üstündeki daha yüksek pH bikarbonatı karbonata çevirir, bu da algler tarafından alınıp kullanılamaz (Graham and Wilcox, 2000a). Üstelik yüksek bir pH, fosfat çökelmesine yol açar ve ağır metalin kullanılabilirliğini etkiler (Park et al., 2011). Denememizdeki farklı kültür şişelerinin pH'ları bu nedenle 0, 5, 10 ve 20. günlerde ölçülerek izlenmiştir (Şekil 3.4). Tüm kültür şişeleri için ortalama pH; deney başlangıcında ortalama 8.99 (± 0.03) idi ve 20 günlük inkübasyondan sonra ortalama 8.85'e (± 0.14) düştü. Walne_NH4 ortamını sadece algler ve alg-bakteri konsorsiyomunu içeren

ortamlarda zaman içinde pH'da daha dik bir düşüş gösterdi. Walne_NH4 durumundaki düşüş, bu kültürlerde, amonyum oksitleyici bakterilerin oksitlenmesi için var olan N-NH4'ün Walne_NO3 ve Walne_NO3&NH4'e kıyasla daha fazla olmasından dolayı ortamın daha fazla asidifikasyonuna neden olduğu açıklanabilir ve burada sadece 8 mg/L N-NH4 mevcuttur. Alg ve bakteri içeren Walne_NH4 ortamında amonyumda net bir azalma ve nitratta artış gözlemlenebilir (Şekil 3.5 F).

3.3. Farklı İnorganik Azot Koşullarında Amonyum ve Nitrat Dönüşümü

Zamanla *Chaetoceros muelleri* yetiştirilen ortamlarda amonyum ve nitrat konsantrasyonları düşüş gösterdi (Şekil A, C, E). Çoğu alg, çeşitli azot kaynakları kullanabilme yeteneğine sahiptir. Bu sonuç, *Chaetoceros muelleri*'nin NH_4^+ ve NO_3'ü alıp büyümeyi desteklemek için kullanabileceğini açıkça göstermektedir. Algler NH_4^+ tercih etmiştir, çünkü N içeren organik bileşikler üretmek için NO_3, daha doğrudan kullanılabilir. Daha yüksek konsantrasyonlarda NH_4^+, NH_3^+ alımını inhibe edebilir, çünkü NH_4^+, nitrat redüktazın sentezini (nitrat almak için gerekli olan enzimi) sağlar (Dortch et al., 1991). Bununla birlikte, nitrojen kaynaklarının eşit konsantrasyonlarını içeren Walne_NO3&NH4 (Şekil 3.5E)'de, benzer bir düşüş eğilimi gözlemlenmiştir.

Nitrifikasyon yapan *Nitrosomonas* sp. ve *Nitrobacter* sp. içeren karışık kültür ortamı ile birlikte üretilen *Chaetoceros muelleri*'ye olan etki; ortama bağlı olmuştur. Walne_NO3 ortamında, yalnız mikroalgin olduğu ve karışık büyüme (Alg-bakteri) arasında net bir fark gözlenmemiştir. Walne_NH4 (Şekil 3.5D) ve Walne_NO3&NH4 (Şekil 3.5F)'de; alglerin büyümesine kıyasla başlangıçta benzer bir amonyum ve nitrat trendi izlemekle birlikte nitrifikasyonun sonucu olarak nitrat artışı gözlemlenmektedir. Bu açıkça, nitrifikasyon bakterilerinin kültürlerde amonyumdan nitrite ve daha sonra nitrata dönüştürülmesinde aktif olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.5. Zamanla amonyum ve nitrat dönüşümü. Amonyak ($N\text{-}NH_3$, ■) ve Nitrat (NO_3, ○), zamanla mg-N/L cinsinden değişimi gösterilmiştir. Walne_NO3 (A&B), Walne_NH4 (C&D) ve Walne_NO3&NH4 (E&F), yalnız algin olduğu (A,C,E) ve alg-bakteri konsorsiyomunun olduğu (B,D,F). Hata çubukları standart sapmaları temsil eder (n = 3).

Çizelge 3.1. Doğal deniz suyundaki ve farklı Walne kültür ortamlarındaki azot bileşimi.

Örnekleme/ortam	Nitrat (mg/L)	TAN (mg/L)
Doğal deniz suyu	0.2	1.5
Walne_NO3	16.3	3.5
Walne_NH4	6.5	21.5
Walne_NO3&NH4	8.7	10.6

Üç farklı ortam sadece nitrat, amonyum veya her iki azot kaynağının bir kombinasyonu içeren şekilde tasarlanmasına rağmen yeni hazırlanan ortamdaki bu azot kaynaklarının doğru başlangıç konsantrasyonları deneylerin başlangıcında tüm nihai nitrat ve amonyum konsantrasyonları yükselmiş gibi gözüküyordu (Çizelge 3.1, Şekil 3.5). Nitrat ve amonyumdaki artışa ilişkin olası bir açıklama, Walne_NO3 ortamında yetiştirilen, yıkanmamış alg *Chaetoceros muelleri* kültürünün ekilmesi (buda yeni kurulan ortamın %20'sini oluşturmakta (2 L 'de 400 mL kültür)) ve aynı zamanda yıkanmamış nitrifikasyon bakterilerinin eklenmesi buda yeni kültür ortamının %0.035'i (2L'de 700µL kültür) olması gerçeğidir. Deneylere başlamak için düzenli olarak nitrat ile beslenen kültür kullanıldı.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Genel olarak, bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre kültür ortamının bileşimi (azot kaynağı); bakteri eklenmesi, algal büyüme, biyokütle üretimi ve azot giderimi üzerinde önemli bir rol oynamaktadır. Test edilen tüm koşullar altında besin maddelerinden biri olan amonyum kaldırıldı ancak nitratla karşılaştırıldığında daha yüksek bir amonyum konsantrasyonu içeren ortamlarda, karışık nitrifikasyon topluluğunun eklenmesiyle uyarılan algal büyüme oldu.

Bu çalışma, mikroalg *Chaetoceros muelleri* ile *Nitrosomonas* sp. ve *Nitrobacter* sp.'den oluşan karışık nitrifikasyon topluluğunun birlikte yetiştirilmesiyle ilgili bazı ön sonuçlar ortaya çıkardı:

- Aynı miktarda NO_3^- ve NH_4^+ sağlayan Walne_NO3&NH4, Walne_NO3 ve Walne_NH4 ortamı (nitratla karşılaştırıldığında daha yüksek NH_4^+ konsantrasyonları içerir) karşılaştırıldığında algal büyüme ve biyokütle genel olarak sadece Walne_NH4 ortamında artmaktadır. *Chaetoceros muelleri* hem nitrat hem de amonyum kullanabilirse, alglerin nitratı kullanmaya geçiş yapması ve bakterinin ise amonyumu kullanıp okside etmesi rekabeti en aza indirgeyebilir. Ancak, sonuçlara dayanarak hem algin hem de bakterilerin aynı azot kaynağı için rekabet ettiği söylenebilir. Bu nedenle, her iki ortaktan da sinerjik bir birlikteliği desteklemek için daha yüksek bir amonyum/nitrat konsantrasyonuna ihtiyaç duyulacağı sonucuna varılabilir.

Bununla birlikte, bu konudaki çalışmayı tamamlamak ve yapılan gözlemlerin daha iyi anlaşılması ve temellerini sağlamak için uygulanabilecek çeşitli gelişmeler vardır. Önerilerin bazıları aşağıda belirtilmiştir:

- Bu çalışmayı geliştirmek için yapılması gereken adımlardan ilki ve belki de en önemlisi; iyi tanımlanmış kültürlerin kullanılması olacaktır. Bu tür bir modelleme araştırması yaparken, burada denediğinizi bildiğiniz bir sistemi anlamak istediğinizde ve kimin ne yaptığını anlamak için bir ön koşuldur. Basit bir model kurulduktan sonra ve iyi anlaşıldığında, daha karmaşık kurulumlar araştırılabilir. Ancak bu çalışmada *Chaetoceros*

muelleri ve nitrifikasyon bakterilerinin kültürdeki kompozisyonu tam olarak bilinmiyordu. Testlerimizin sonucu, bir kara kutu olarak tanımlayabileceğimiz bir dizi bilinmeyen olaydan kaynaklanmaktadır.

- İkincisi, deneylerin farklı azot kaynaklarının başlangıç konsantrasyonlarının tanımlandığı şekilde tekrarlanması gerekir. Ancak ondan sonra azot kaldırma için birlikte yetiştirme kültürlerini değerlendirebileceğiz. Ayrıca, alg-bakteri konsorsiyomunun farklı başlatma azot konsantrasyonları ve farklı azot kaynakları varlığında test edilmesi gerekir. Nitrifikasyon sırasında oluşan bir ara azot bileşiği olan NO_2^-, belirli mikroalgler için toksiktir (Becker, 2008) ve mevcut deneyde ölçülmemiştir.

- Mikrobiyolojik yönlerini, özellikle bakteri gelişme modellerini, alg-bakteri etkileşimlerinin karakterizasyonunu anlamanın açık bir gereksinimi vardır. Ayrıca, mikrobiyal ve alg toplulukları arasındaki etkileşim, algal-bakteriyel biyokütlenin dağılımını ve kompozisyonunu araştırmak için yapılan bir çalışma da dahil olmak üzere daha derinlemesine incelenmelidir.

- Alg ve bakteri arasındaki diğer etkileşimler, suş ve türe bağımlı olabilir. Laboratuvarda farklı alglerle çeşitli mikrobiyal kombinasyonların araştırılması ve etkili besin/kirlilik giderme verimliliğinin değerlendirilmesi gereklidir. Ayrıca canlı alglerin mikroskop altında sayılması güvenilirlik açısından daha uygun olacaktır.

- Daha sonra, sürecin kararlılığı daha doğal ve karmaşık durumlarda değerlendirilmelidir. Su ürünleri; atıksuları, pH'daki dalgalanmalar, sıcaklık farklılıkları gibi etkenlerden de etkilenmektedir. PH değerleri 9.3'ün üstündeki alg reaktörlerin de yüksek NH_4^+ konsantrasyonları stabil değildir, çünkü serbest amonyak (NH_3) amonyuma hakim olmaya başlar. Serbest amonyak, çoğu mikroalg için toksiktir (Abeliovich and Azov, 1976). Artan sıcaklıklar, serbest amonyak oluşumunu destekler (Markou

and Georgakakis, 2011). Aksi halde, yüksek konsantrasyonda nitrat NH_4^+ alımını da inhibe edebilir (Morel, 2004; Markou and Georgakakis, 2011).

- Sonuç olarak daha ideal, basit ve iyi tanımlanmış bir model sistemini anladığınızda sistem, ayrıca açık ve steril olmayan bir kurulumda test edilmelidir. Zamanla istikrarlı ve karmaşık bir işbirliği topluluğu gelişebilir. Sistemdeki evrimleşmiş mikrobik türün tanımlanmasına yardımcı olacağı için, yüksek reaktörlerde mikrobiyomu yüksek verimli sıralama kullanarak karakterize etmek de yararlı olacaktır. Doğal tatlı su ve acı su biyoflok bazlı sistemlerin, biyolojik katkılarından oluşan komple mikrobik, tanımlama ve atık suya doğal alglerin eklenmesiyle tam ölçekli sistemlerde kontrol için yeni olanaklar yaratabilir. Ayrıca Türkiye'de ekonomik değeri oldukça yüksek olan çipura ve levrek yetiştirme sistemlerine uyarlanabilirse ekonomik olarak girdisi yüksek olup, maaliyeti oldukça düşürecektir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., and Ibraheem, I. B. M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi J. Biol. Sci.* 19, 257–275. doi:10.1016/j.sjbs.2012.04.005.

Abeliovich, A., and Azov, Y. (1976). Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds. *Appl. Env. Microbiol.* 31, 801–806.

Alawi, M., Lipski, A., Sanders, T., Pfeiffer, E. M., and Spieck, E. (2007). Cultivation of a novel cold-adapted nitrite oxidizing betaproteobacterium from the Siberian Arctic. *ISME J.* 1, 256–264. doi:10.1038/ismej.2007.34.

Ameel, J., E., R., and R.P., A. (1998). *Analytical chemistry and quality assurance procedures for natural water samplesitle*. 6th ed. Natural Resources Research Institute, University of Minnesota, Duluth, MN.

Andersen, J. H., Carstensen, J., Conley, D. J., Dromph, K., Fleming-Lehtinen, V., Gustafsson, B. G., et al. (2017). Long-term temporal and spatial trends in eutrophication status of the Baltic Sea. *Biol. Rev.* 92, 135–149. doi:10.1111/brv.12221.

Aslan, S., and Kapdan, I. K. (2006). Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecol. Eng.* 28, 64–70. doi:10.1016/j.ecoleng.2006.04.003.

Avnimelech, Y. (1999). Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* 176, 227–235. doi:10.1016/S0044-8486(99)00085-X.

Avnimelech, Y. (2009). *Biofloc technology - A Practical Guide Book*. Baton Rouge, Louisiana, United States: The World Aquaculture Society.

Azad, H. S., and Borchardt, J. A. (1970). Variations in phosphorus uptake by algae. *Environ. Sci. Technol.* 4, 737–743. doi:10.1021/es60044a008.

Azim, M. E., Milstein, A., Wahab, M. A., and Verdegam, M. C. J. (2003a). Periphyton–water quality relationships in fertilized fishponds with artificial substrates. *Aquaculture* 228, 169–187. doi:10.1016/S0044-8486(03)00319-3.

Azim, M. E., Verdegem, M. C. J., Mantingh, I., van Dam, A. A., and Beveridge, M. C. M. (2003b). Ingestion and utilization of periphyton grown

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

on artificial substrates by Nile tilapia, Oreochromis niloticus L. *Aquac. Res.* 34, 85–92. doi:10.1046/j.1365-2109.2003.00802.x.

Baileygreen, F., Bernstone, L., Lundquistl, T., and Oswald, W. (1996). Advanced integrated wastewater pond systems for nitrogen removal. *Water Sci. Technol.* 33, 207–217. doi:10.1016/0273-1223(96)00356-3.

Bardach, J. E., Ryther, J. H., and McLarney, W. O. (1974). *Aquaculture: The Farming and Husbandry of Freshwater and Marine Organisms*.

Barsanti, L., and Gualtieri, P. (2014). *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. CRC Press.

Becker, E. W. (2008). *Microalgae: biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge UK.

Bell, W. H., Lang, J. M., and Mitchell, R. (1974). Selective stimulation of marine bacteria by algal extracellular products1. *Limnol. Oceanogr.* 19, 833–839. doi:10.4319/lo.1974.19.5.0833.

Benemann, J. R., and Oswald, W. J. (1996). Systems and economic analysis of microalgae ponds for conversion of CO{sub 2} to biomass. Final report. Pittsburgh, PA, and Morgantown, WV doi:10.2172/493389.

Bilanovic, D., Holland, M., Starosvetsky, J., and Armon, R. (2016). Co-cultivation of microalgae and nitrifiers for higher biomass production and better carbon capture. *Bioresour. Technol.* 220, 282–288. doi:10.1016/j.biortech.2016.08.083.

Bostock, J., McAndrew, B., Richards, R., Jauncey, K., Telfer, T., Lorenzen, K., et al. (2010). Aquaculture: global status and trends. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365, 2897–2912. doi:10.1098/rstb.2010.0170.

Boyd, C. E. (1998). Pond water aeration systems. *Aquac. Eng.* 18, 9–40. doi:10.1016/S0144-8609(98)00019-3.

Brembu, T., Winge, P., Tooming-Klunderud, A., Nederbragt, A. J., Jakobsen, K. S., and Bones, A. M. (2014). The chloroplast genome of the diatom

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Seminavis robusta: New features introduced through multiple mechanisms of horizontal gene transfer. *Mar. Genomics* 16, 17–27. doi:10.1016/j.margen.2013.12.002.

Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K., and Dunstan, G. (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151, 315–331. doi:10.1016/S0044-8486(96)01501-3.

Burford, M. A., Thompson, P. J., McIntosh, R. P., Bauman, R. H., and Pearson, D. C. (2003). Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. *Aquaculture* 219, 393–411. doi:10.1016/S0044-8486(02)00575-6.

Chaignon, V., Lartiges, B. S., El Samrani, A., and Mustin, C. (2002). Evolution of size distribution and transfer of mineral particles between flocs in activated sludges: an insight into floc exchange dynamics. *Water Res.* 36, 676–684. doi:10.1016/S0043-1354(01)00266-4.

Chaillan, F., Gugger, M., Saliot, A., Couté, A., and Oudot, J. (2006). Role of cyanobacteria in the biodegradation of crude oil by a tropical cyanobacterial mat. *Chemosphere* 62, 1574–1582. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.06.050.

Cho, S. H., Ji, S.-C., Hur, S. B., Bae, J., Park, I.-S., and Song, Y.-C. (2007). Optimum temperature and salinity conditions for growth of green algae Chlorella ellipsoidea and Nannochloris oculata. *Fish. Sci.* 73, 1050–1056. doi:10.1111/j.1444-2906.2007.01435.x.

Christenson, L., and Sims, R. (2011). Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnol. Adv.* 29, 686–702. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.05.015.

Chu, C. P., and Lee, D. J. (2004). Multiscale structures of biological flocs. *Chem. Eng. Sci.* 59, 1875–1883. doi:10.1016/j.ces.2004.01.040.

Cirik, S., and Gökpınar, Ş. (2008). *Plankton Bilgisi ve Kültürü*. 5th ed. Bornova / İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Cole, J. J. (1982). Interactions Between Bacteria and Algae in Aquatic Ecosystems. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 13, 291–314. doi:10.1146/annurev.es.13.110182.001451.

Colt, J. (2006). Water quality requirements for reuse systems. *Aquac. Eng.* 34, 143–156. doi:10.1016/j.aquaeng.2005.08.011.

Conley, D. J., Paerl, H. W., Howarth, R. W., Boesch, D. F., Seitzinger, S. P., Havens, K. E., et al. (2009). ECOLOGY: Controlling Eutrophication: Nitrogen and Phosphorus. *Science (80-.).* 323, 1014–1015. doi:10.1126/science.1167755.

Crab, R., Defoirdt, T., Bossier, P., and Verstraete, W. (2012). Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture* 356–357, 351–356. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.04.046.

Craig, S., and Helfrich, L. A. (2002). Understanding Fish Nutrition, Feeds, and Feeding.

Croft, M. T., Lawrence, A. D., Raux-Deery, E., Warren, M. J., and Smith, A. G. (2005). Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature* 438, 90–93. doi:10.1038/nature04056.

de-Bashan, L. (2002). Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae Chlorella vulgaris coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium Azospirillum brasilense. *Water Res.* 36, 2941–2948. doi:10.1016/S0043-1354(01)00522-X.

de Barros, H. P., and Valenti, W. C. (2003). Food intake of Macrobrachium rosenbergii during larval development. *Aquaculture* 216, 165–176. doi:10.1016/S0044-8486(02)00505-7.

de Godos, I., González, C., Becares, E., García-Encina, P. A., and Muñoz, R. (2009). Simultaneous nutrients and carbon removal during pretreated swine slurry degradation in a tubular biofilm photobioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 187–194. doi:10.1007/s00253-008-1825-3.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

De Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., and Verstraete, W. (2008). The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture* 277, 125–137. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.02.019.

Dortch, Q., Thompson, P. A., and Harrison, P. J. (1991). VARIABILITY IN NITRATE UPTAKE KINETICS IN THALASSIOSIRA PSEUDONANA (BACILLARIOPHYCEAE)1. *J. Phycol.* 27, 35–39. doi:10.1111/j.0022-3646.1991.00035.x.

Dubé, M. A., Tremblay, A. Y., and Liu, J. (2007). Biodiesel production using a membrane reactor. *Bioresour. Technol.* 98, 639–647. doi:10.1016/j.biortech.2006.02.019.

Ehrich, S., Behrens, D., Lebedeva, E., Ludwig, W., and Bock, E. (1995). A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, Nitrospira moscoviensis sp. nov. and its phylogenetic relationship. *Arch. Microbiol.* 164, 16–23. doi:10.1007/s002030050230.

Enright, C. T., Newkirk, G. F., Craigie, J. S., and Castell, J. D. (1986). Evaluation of phytoplankton as diets for juvenile Ostrea edulis L. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 96, 1–13. doi:10.1016/0022-0981(86)90009-2.

Fenchel, T. (1974). Intrinsic rate of natural increase: The relationship with body size. *Oecologia* 14, 317–326. doi:10.1007/BF00384576.

Fuentes, J., Garbayo, I., Cuaresma, M., Montero, Z., González-del-Valle, M., and Vílchez, C. (2016). Impact of Microalgae-Bacteria Interactions on the Production of Algal Biomass and Associated Compounds. *Mar. Drugs* 14, 100. doi:10.3390/md14050100.

Fukami, K., Nishijima, T., and Ishida, Y. (1997). No Title. *Hydrobiologia* 358, 185–191. doi:10.1023/A:1003139402315.

Garatuntjeldsto, O., Ottera, H., Julshamn, K., and Austrenga, E. (2006). Food ingestion in juvenile cod estimated by inert lanthanide markers – effects of food particle size. *ICES J. Mar. Sci.* 63, 311–319. doi:10.1016/j.icesjms.2005.11.008.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Golterman, H. L. (1972). The role of phytoplankton in detritus formation.

Gonzalez, L. E., and Bashan, Y. (2000). Increased Growth of the Microalga Chlorella vulgaris when Coimmobilized and Cocultured in Alginate Beads with the Plant-Growth-Promoting Bacterium Azospirillum brasilense. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1527–1531. doi:10.1128/AEM.66.4.1527-1531.2000.

Graham, L., and Wilcox (2000a). "Algae," in (Upper Saddle River New Jersey, USA: Prentice Hall), 640.

Graham, L. E., and Wilcox, L. W. (2000b). *Algae*. Prentice Hall, USA, Upper Saddle River New Jersey.

Grossart, H., Kiørboe, T., Tang, K., Allgaier, M., Yam, E., and Ploug, H. (2006). Interactions between marine snow and heterotrophic bacteria: aggregate formation and microbial dynamics. *Aquat. Microb. Ecol.* 42, 19–26. doi:10.3354/ame042019.

Gutierrez-Wing, M. T., and Malone, R. F. (2006). Biological filters in aquaculture: Trends and research directions for freshwater and marine applications. *Aquac. Eng.* 34, 163–171. doi:10.1016/j.aquaeng.2005.08.003.

Gutierrez-Zamora, M. L., and Manefield, M. (2010). An appraisal of methods for linking environmental processes to specific microbial taxa. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 9, 153–185. doi:10.1007/s11157-010-9205-8.

Gutzeit, G., Lorch, D., Weber, A., Engels, M., and Neis, U. (2005). Bioflocculent algal-bacterial biomass improves low-cost wastewater treatment. *Water Sci. Technol.* 52, 9–18. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16477966.

Hammouda, O., Gaber, A., and Abdelraouf, N. (1995). Microalgae and Wastewater Treatment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 31, 205–210. doi:10.1006/eesa.1995.1064.

Hargreaves, J. A. (2006). Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquac. Eng.* 34, 344–363. doi:10.1016/j.aquaeng.2005.08.009.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Hari, B., Madhusoodana Kurup, B., Varghese, J. T., Schrama, J. W., and Verdegem, M. C. (2004). Effects of carbohydrate addition on production in extensive shrimp culture systems. *Aquaculture* 241, 179–194. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.07.002.

Harms, G., Layton, A. C., Dionisi, H. M., Gregory, I. R., Garrett, V. M., Hawkins, S. A., et al. (2003). Real-Time PCR Quantification of Nitrifying Bacteria in a Municipal Wastewater Treatment Plant. *Environ. Sci. Technol.* 37, 343–351. doi:10.1021/es0257164.

Henze, M., Loosdrecht, M. C. M. van, Ekama, G. A., and Brdjanovic, D. (2008) *Biological Wastewater Treatment*. 12 Caxton Street London W1H 0QS, UK: IWA Publishing.

Hollender, J., van der Krol, D., Kornberger, L., Gierden, E., and Dott, W. (2002). No Title. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 359–364. doi:10.1023/A:1015258308460.

http://aquaculture210.blogspot.jp Available at: http://aquaculture210.blogspot.jp/2010/12/fish-farm-on-land.html.

http://www.marylandbiochemical.com Available at: http://www.marylandbiochemical.com/products/bioremove-5805/.

Http://www.pesceinrete.com Available at: http://www.pesceinrete.com/php/news/9579-acquacoltura-la-regione-emilia-romagna-stanzia-500mila-euro-per-le-imprese-del-settore.html.

https://sites.google.com Available at: https://sites.google.com/site/ernestogmsite/articulos-y-ensayos/offshore-aquculture.

https://www.slideshare.net Available at: https://www.slideshare.net/drobertsonandersson/seaweed-paddle-pond-systems-presentation.

Huntingford, F. A., Adams, C., Braithwaite, V. A., Kadri, S., Pottinger, T. G.,

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Sandoe, P., et al. (2006). Current issues in fish welfare. *J. Fish Biol.* 68, 332–372. doi:10.1111/j.0022-1112.2006.001046.x.

Jensen (2003). *A problem solving approach to aquatic chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd, USA, New York.

Jorand, F., Zartarian, F., Thomas, F., Block, J. C., Bottero, J. Y., Villemin, G., et al. (1995). Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs. *Water Res.* 29, 1639–1647. doi:10.1016/0043-1354(94)00350-G.

Junier, P., Molina, V., Dorador, C., Hadas, O., Kim, O.-S., Junier, T., et al. (2010). Phylogenetic and functional marker genes to study ammonia-oxidizing microorganisms (AOM) in the environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 425–440. doi:10.1007/s00253-009-2228-9.

Kang'ombe, J., Likongwe, J. S., Eda, H., and Mtimuni, J. P. (2007). Effect of varying dietary energy level on feed intake, feed conversion, whole-body composition and growth of Malawian tilapia, Oreochromis shiranus ? Boulenger. *Aquac. Res.* 38, 373–380. doi:10.1111/j.1365-2109.2007.01676.x.

Knights, B. (1983). Food particle-size preferences and feeding behaviour in warmwater aquaculture of European eel, Anguilla anguilla (L.). *Aquaculture* 30, 173–190. doi:10.1016/0044-8486(83)90160-6.

Kong, Q., Li, L., Martinez, B., Chen, P., and Ruan, R. (2010). Culture of Microalgae Chlamydomonas reinhardtii in Wastewater for Biomass Feedstock Production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160, 9–18. doi:10.1007/s12010-009-8670-4.

Koops, H., Purkhold, U., Pommerening-Roeser, A., Timmermann, G., and Wagner, M. (2006). The lithoautotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *The prokaryotes*, 778–811. doi:10.1007/0-387-30745-1_36.

Kouzuma, A., and Watanabe, K. (2015). Exploring the potential of algae/bacteria interactions. *Curr. Opin. Biotechnol.* 33, 125–129. doi:10.1016/j.copbio.2015.02.007.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Krishna, C., and Van Loosdrecht, M. C. M. (1999). Effect of temperature on storage polymers and settleability of activated sludge. *Water Res.* 33, 2374–2382. doi:10.1016/S0043-1354(98)00445-X.

Krohn-Molt, I., Wemheuer, B., Alawi, M., Poehlein, A., Gullert, S., Schmeisser, C., et al. (2013). Metagenome Survey of a Multispecies and Alga-Associated Biofilm Revealed Key Elements of Bacterial-Algal Interactions in Photobioreactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 6196–6206. doi:10.1128/AEM.01641-13.

Laliberte, G., Proulx, D., Pauw, N., and De la Noue, J. (1994). *Algal technology in wastewater treatment*. Ergenisse Limnologie.

Landman, M. J., Van Den Heuvel, M. R., and Ling, N. (2005). Relative sensitivities of common freshwater fish and invertebrates to acute hypoxia. *New Zeal. J. Mar. Freshw. Res.* 39, 1061–1067. doi:10.1080/00288330.2005.9517375.

Lezama-Cervantes, C., and Paniagua-Michel, J. (2010). Effects of constructed microbial mats on water quality and performance of Litopenaeus vannamei post-larvae. *Aquac. Eng.* 42, 75–81. doi:10.1016/j.aquaeng.2009.12.002.

Lücker, S., Nowka, B., Rattei, T., Spieck, E., and Daims, H. (2013). The genome of Nitrospina gracilis illuminates the metabolism and evolution of the major marine nitrite oxidizer. *Front. Microbiol.* 4, 1–19. doi:10.3389/fmicb.2013.00027.

Luo, J., Wang, Y., Tang, S., Liang, J., Lin, W., and Luo, L. (2013). Isolation and Identification of Algicidal Compound from Streptomyces and Algicidal Mechanism to Microcystis aeruginosa. *PLoS One* 8, e76444. doi:10.1371/journal.pone.0076444.

Maillard, V. M., Boardman, G. D., Nyland, J. E., and Kuhn, D. D. (2005). Water quality and sludge characterization at raceway-system trout farms. *Aquac. Eng.* 33, 271–284. doi:10.1016/j.aquaeng.2005.02.006.

Markou, G., and Georgakakis, D. (2011). Cultivation of filamentous

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Appl. Energy* 88, 3389–3401. doi:10.1016/j.apenergy.2010.12.042.

Martins, A. M. P., Heijnen, J. J., and van Loosdrecht, M. C. M. (2003). Effect of dissolved oxygen concentration on sludge settleability. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62, 586–593. doi:10.1007/s00253-003-1384-6.

Matos, J., Costa, S., Rodrigues, A., Pereira, R., and Sousa Pinto, I. (2006). Experimental integrated aquaculture of fish and red seaweeds in Northern Portugal. *Aquaculture* 252, 31–42. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.11.047.

Mobarry, B. K., Wagner, M., Urbain, V., Rittmann, B. E., and Stahl, D. A. (1996). Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2156–62.

Morel, F. M. M. (2004). KINETICS OF NUTRIENT UPTAKE AND GROWTH IN PHYTOPLANKTON1. *J. Phycol.* 23, 137–150. doi:10.1111/j.0022-3646.1987.00137.x.

Moszczyński, K., Mackiewicz, P., and Bodył, A. (2012). Evidence for Horizontal Gene Transfer from Bacteroidetes Bacteria to Dinoflagellate Minicircles. *Mol. Biol. Evol.* 29, 887–892. doi:10.1093/molbev/msr276.

Muñoz, R., and Guieysse, B. (2006). Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Res.* 40, 2799–2815. doi:10.1016/j.watres.2006.06.011.

Muñoz, R., Jacinto, M., Guieysse, B., and Mattiasson, B. (2005). Combined carbon and nitrogen removal from acetonitrile using algal–bacterial bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, 699–707. doi:10.1007/s00253-004-1811-3.

Nagase, H., Yoshihara, K., Eguchi, K., Okamoto, Y., Murasaki, S., Yamashita, R., et al. (2001). Uptake pathway and continuous removal of nitric oxide from flue gas using microalgae. *Biochem. Eng. J.* 7, 241–246. doi:10.1016/S1369-703X(00)00122-4.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Naylor, R. L., Goldburg, R. J., Primavera, J. H., Kautsky, N., Beveridge, M. C. M., Clay, J., et al. (2000). No Title. *Nature* 405, 1017–1024. doi:10.1038/35016500.

Nurdogan, Y., and Oswald, W. (1995). Enhanced nutrient removal in high-rate ponds. *Water Sci. Technol.* 31, 33–43. doi:10.1016/0273-1223(95)00490-E.

O'Connor, W. A., and Heasman, M. P. (1997). Diet and feeding regimens for larval doughboy scallops, Mimachlamys asperrima. *Aquaculture* 158, 289–303. doi:10.1016/S0044-8486(97)00194-4.

Oehmen, A., Yuan, Z., Blackall, L. L., and Keller, J. (2004). Short-term effects of carbon source on the competition of polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Water Sci. Technol.* 50, 139–44.

Olguín, E. J. (2003). Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnol. Adv.* 22, 81–91. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14623045.

Oron, G. (1994). Duckweed culture for wastewater renovation and biomass production. *Agric. Water Manag.* 26, 27–40. doi:10.1016/0378-3774(94)90022-1.

Oswald, W. J. (2003). My sixty years in applied algology. *J. Appl. Phycol.* 15, 99–106. doi:10.1023/A:1023871903434.

Oswald, W. J., and Gotaas, H. B. (1957). Photosynthesis in Sewage treatment. *Trans. Am. Soc. Civ. Eng.* 122, 73–105.

P.H. Raven, R. F. E. and S. E. E. (1992). "Biology of plants," in (New York, USA: Worth Publishers).

Paerl, H. W., and Pinckney, J. L. (1996). A mini-review of microbial consortia: Their roles in aquatic production and biogeochemical cycling. *Microb. Ecol.* 31. doi:10.1007/BF00171569.

Park, J. B. K., Craggs, R. J., and Shilton, A. N. (2011). Wastewater treatment

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresour. Technol.* 102, 35–42. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.158.

Park, Y., Je, K.-W., Lee, K., Jung, S.-E., and Choi, T.-J. (2008). Growth promotion of Chlorella ellipsoidea by co-inoculation with Brevundimonas sp. isolated from the microalga. *Hydrobiologia* 598, 219–228. doi:10.1007/s10750-007-9152-8.

Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., De-Bashan, L. E., and Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Res.* 45, 11–36. doi:10.1016/j.watres.2010.08.037.

Persoone, G., and Claus, C. (1980). Mass culture of algae: a bottleneck in the nursery culturing of molluscs.

Philips, S., Laanbroek, H. J., and Verstraete, W. (2002). Origin, causes and effects of increased nitrite concentrations in aquatic environments. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology* 1, 115–141. doi:10.1023/A:1020892826575.

Piedrahita, R. H. (2003). Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. *Aquaculture* 226, 35–44. doi:10.1016/S0044-8486(03)00465-4.

Purkhold, U., Pommerening-Roser, A., Juretschko, S., Schmid, M. C., Koops, H.-P., and Wagner, M. (2000). Phylogeny of All Recognized Species of Ammonia Oxidizers Based on Comparative 16S rRNA and amoA Sequence Analysis: Implications for Molecular Diversity Surveys. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5368–5382. doi:10.1128/AEM.66.12.5368-5382.2000.

Qiang, H., Zarmi, Y., and Richmond, A. (1998). Combined effects of light intensity, light-path and culture density on output rate of Spirulina platensis (Cyanobacteria). *Eur. J. Phycol.* 33, 165–171. doi:10.1080/09670269810001736663.

Richmond (2003). *Handbook of Microalgal Culture.* , ed. A. Richmond Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd doi:10.1002/9780470995280.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Richmond, A. (2004). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Publishing Ltd, UK, Oxford.

Safonova, E. T., Dmitrieva, I. ., and Kvitko, K. (1999). The interaction of algae with alcanotrophic bacteria in black oil decomposition. *Resour. Conserv. Recycl.* 27, 193–201. doi:10.1016/S0921-3449(99)00014-2.

Salehizadeh, H., and Van Loosdrecht, M. C. M. (2004). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnol. Adv.* 22, 261–279. doi:10.1016/j.biotechadv.2003.09.003.

Salih, F. M. (2011). Microalgae Tolerance to High Concentrations of Carbon Dioxide: A Review. *J. Environ. Prot. (Irvine,. Calif).* 02, 648–654. doi:10.4236/jep.2011.25074.

Schneider, O., Sereti, V., Eding, E. H., and Verreth, J. A. J. (2005). Analysis of nutrient flows in integrated intensive aquaculture systems. *Aquac. Eng.* 32, 379–401. doi:10.1016/j.aquaeng.2004.09.001.

Schumacher, G., Blume, T., and Sekoulov, I. (2003). Bacteria reduction and nutrient removal in small wastewater treatment plants by an algal biofilm. *Water Sci. Technol.* 47, 195–202. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12906290.

Sears, K., Alleman, J. E., Barnard, J. L., and Oleszkiewicz, J. A. (2006). Density and Activity Characterization of Activated Sludge Flocs. *J. Environ. Eng.* 132, 1235–1242. doi:10.1061/(ASCE)0733-9372(2006)132:10(1235).

Shi, C. Y. (2011). *Mass Flow and Energy Efficiency of Municipal Wastewater Treatment Plants*. IWA Publishing.

Sinha, B., and Annachhatre, A. P. (2007). Partial nitrification—operational parameters and microorganisms involved. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology* 6, 285–313. doi:10.1007/s11157-006-9116-x.

Sorokin, D. Y., Lücker, S., Vejmelkova, D., Kostrikina, N. a, Kleerebezem, R.,

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Rijpstra, W. I. C., et al. (2012). Nitrification expanded: discovery, physiology and genomics of a nitrite-oxidizing bacterium from the phylum Chloroflexi. *ISME J.*, 2245–2256. doi:10.1038/ismej.2012.70.

Spicer, P. T., and Pratsinis, S. E. (1996). Shear-induced flocculation: The evolution of floc structure and the shape of the size distribution at steady state. *Water Res.* 30, 1049–1056. doi:10.1016/0043-1354(95)00253-7.

Spieck, E., and Bock, E. (2005). The lithoautotrophic nitrite-oxidizing bacteria. *Bergey's Manual® Syst. Bacteriol.*, 149–153. doi:10.1007/0-387-28021-9_19.

Subasinghe, R. P. (2005). Epidemiological approach to aquatic animal health management: opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through aquaculture. *Prev. Vet. Med.* 67, 117–124. doi:10.1016/j.prevetmed.2004.11.004.

Suzuki, I., Dular, U., and Kwok, C. S. (1974). Ammonia or Ammonium Ion as Substrate for Oxidation by Nitrosomonas europaea Cells and Extracts. *J. Bacteriol* 120, 556–558.

Tang, H. L., and Chen, H. (2015). Nitrification at full-scale municipal wastewater treatment plants: Evaluation of inhibition and bioaugmentation of nitrifiers. *Bioresour. Technol.* 190, 76–81. doi:10.1016/j.biortech.2015.04.063.

Thompson, P. A., Guo, M., and Harrison, P. J. (1993). The influence of irradiance on the biochemical composition of three phytoplankton species and their nutritional value for larvae of the Pacific Oyster (Crassostrea gigas). *Mar. Biol.* 117, 259–268. doi:10.1007/BF00345671.

Torrans, E. (2005). Effect of Oxygen Management on Culture Performance of Channel Catfish in Earthen Ponds. *N. Am. J. Aquac.* 67, 275–288. doi:10.1577/A04-071.1.

Twarowska, J. G., Westerman, P. W., and Losordo, T. M. (1997). Water treatment and waste characterization evaluation of an intensive recirculating

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

fish production system. *Aquac. Eng.* 16, 133–147. doi:10.1016/S0144-8609(96)01022-9.

Van Den Hende, S., Vervaeren, H., Saveyn, H., Maes, G., and Boon, N. (2011). Microalgal bacterial floc properties are improved by a balanced inorganic/organic carbon ratio. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 549–558. doi:10.1002/bit.22985.

Wang, Y.-C., Chang, P.-S., and Chen, H.-Y. (2008). Differential time-series expression of immune-related genes of Pacific white shrimp Litopenaeus vannamei in response to dietary inclusion of β-1,3-glucan. *Fish Shellfish Immunol.* 24, 113–121. doi:10.1016/j.fsi.2007.09.008.

Webb, K. L., and Chu, F. E. (1983). Phytoplankton as a food source for bivalve larvae.

Whitman, W. B., Coleman, D. C., and Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6578–83.

Wilén, B.-M., Jin, B., and Lant, P. (2003). The influence of key chemical constituents in activated sludge on surface and flocculating properties. *Water Res.* 37, 2127–2139. doi:10.1016/S0043-1354(02)00629-2.

Wilén, B.-M., Lund Nielsen, J., Keiding, K., and Nielsen, P. H. (2000). Influence of microbial activity on the stability of activated sludge flocs. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 18, 145–156. doi:10.1016/S0927-7765(99)00138-1.

Woese, C. R., Weisburg, W. G., Paster, B. J., Hahn, C. M., Tanner, R. S., Krieg, N. R., et al. (1984). The phylogeny of purple bacteria: The beta subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.* 5, 327–336. doi:10.1016/S0723-2020(84)80035-1.

Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., and Jia, Y. (2010). Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalga Scenedesmus sp. LX1 under different kinds of nitrogen sources. *Ecol. Eng.* 36, 379–381. doi:10.1016/j.ecoleng.2009.11.003.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Yagci, N., Cokgor, E. U., Artan, N., Randall, C., and Orhon, D. (2007). The effect of substrate on the composition of polyhydroxyalkanoates in enhanced biological phosphorus removal. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82, 295–303. doi:10.1002/jctb.1672.

Zhang, L., Lee, Y.-W., and Jahng, D. (2012). Ammonia stripping for enhanced biomethanization of piggery wastewater. *J. Hazard. Mater.* 199–200, 36–42. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.10.049.

Zhang, Y., Min, B., Huang, L., and Angelidaki, I. (2009). Generation of Electricity and Analysis of Microbial Communities in Wheat Straw Biomass-Powered Microbial Fuel Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3389–3395. doi:10.1128/AEM.02240-08.

Zhao, L., Chen, L., and Yin, P. (2014). Algicidal metabolites produced by Bacillus sp. strain B1 against Phaeocystis globosa. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41, 593–599. doi:10.1007/s10295-013-1393-0.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad: Saygın Yıldırım

Doğum Tarihi: 05.04.1991

Eğitim ve Öğretim:

Derece	**Bölüm/Program**	**Yer**	**Yıl**
İlköğretim	Mustafa Uygur İlköğretim Okulu	İzmir	1997
Lise	Dr. Behçet Uz Anadolu Lisesi	İzmir	2005
Üniversite	Ege Üniversitesi Su Ürünleri Müh.	İzmir	2009
.Erasmus	Szent Istvan University	Macaristan	2013
.Bitirme Tezi: Türkiye'de Algal Biyoteknoloji Çalışmaları			
Yüksek Lisans	Ege Üni. Fen Bilimleri Enstitüsü	İzmir	2014-2018
.Erasmus	Gent Univesity	Belçika	2016
	(Yüksek Lisans Tezi için çalışma yapıldı.)		
.Değişim Programı	Work and Travel Programı	Amerika	2016/2017
.Bitirme Tezi	Biyoflok İçinde Mikroalg-Bakteriyel Konsorsiyomlar Üretimi		