

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

***CHLORELLA SP.*' NİN İZOLASYONU, AKSENİK VE
HETEROTROFİK ÜRETİMİ**

Döndü YALÇIN

Tez danışmanı: Prof. Dr. Meltem CONK DALAY

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 614.02.07

Sunuş Tarihi: 24.01.2011

Bornova-İZMİR

2011

Döndü Yalçın tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “*Chorella sp.*’ nin İzolasyonu, Aksenik ve Heterotrofik Üretimi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 24.01.2011 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı: Prof Dr. Meltem CONK DALAY

Raportör Üye: Prof. Dr. Murat ELİBOL

Üye: Prof. Dr. Atakan SUKATAR

ÖZET***CHLORELLA SP.*' NİN İZOLASYONU, AKSENİK VE
HETEROTROFİK ÜRETİMİ**

YALÇIN, Döndü

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Meltem CONK DALAY

24 Ocak 2011, 68 sayfa

Bu çalışmanın amacı, *Chlorella sp.*' nin aksenik hale getirildikten sonra heterotrofik üretim potansiyelinin araştırılmasıdır.

İzmir'in Gümüldür bölgesinden alınan örnek seyreltme ve dökme plaka yöntemleriyle izole edilmiştir. Bu örnek, hem morfolojik hem de moleküler yöntemlerle incelendiğinde *Chlorella sp.* olduğu saptanmıştır. Aksenik kültür; biyokimyasal, fizyolojik, genetik ve taksonomik çalışmalar açısından oldukça önemlidir. Aksenik izolasyon prosedürü için santrifüj ile yıkama, antibiyotik ile muamele, agar ortamında büyütme, tek hücre izolasyonu gibi yöntemler kullanılarak başarılı sonuçlar elde edilmiştir. 250 mL' lik erlenlerde 11 günlük üretim yapılmıştır. Fototrofik *Chlorella sp.*' den elde edilen biyomas ($0,19 \text{ g L}^{-1}$) ve spesifik büyüme hızı ($0,78 \text{ gün}^{-1}$), miksotrofik *Chlorella sp.*' den elde edilen biyomas ($0,31 \text{ g L}^{-1}$) ve ve spesifik büyüme hızı ($1,3 \text{ gün}^{-1}$), heterotrofik *Chlorella sp.*' den elde edilen biyomas ($0,6 \text{ g L}^{-1}$) ve ve spesifik büyüme hızı ($2,52 \text{ gün}^{-1}$) olarak belirlenmiştir. Bu araştırma sonuçlarına göre *Chlorella sp.* heterotrofik üretim potansiyeline sahiptir.

Anahtar sözcükler: Mikroalgler, heterotrofik üretim, aksenik mikroalg kültürü,

ABSTRACT**ISOLATION OF *CHLORELLA SP.*, AXENIC AND
HETEROTROPHIC PRODUCTION**

YALÇIN, Döndü

MSc. in Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Meltem CONK DALAY

24 January 2011, 68 pages

The aim of this study is to search the potential of heterotrophic production after making axenic species of *Chlorella sp.*

The cells were isolated by dilution and pour plate techniques from the sample taken from Gumuldur region of Izmir. When this sample was examined by both morphological and molecular methods it was determined that the strain was closely *Chlorella sp.* Strains of axenic microalgae are very important for biochemical, physiological, genetic and taxonomic studies. The axenic isolation procedure was successfully done by methods like washing to centrifuge, treating with antibiotic, growing on agar medium, isolating single cell. The study was conducted in 250 mL flasks for 11 days. Phototrophic growth of *Chlorella sp.* was exhibited specific growth rate ($0,78 \text{ d}^{-1}$) and dry biomass ($0,19 \text{ g L}^{-1}$), mixotrophic growth of *Chlorella sp.* was demonstrated specific growth rate ($1,3 \text{ d}^{-1}$) and dry biomass ($0,31 \text{ g L}^{-1}$), heterotrophic growth of *Chlorella sp.* was exhibited high specific growth rate ($2,52 \text{ d}^{-1}$) and high dry biomass ($0,6 \text{ g L}^{-1}$). According to this searching results *Chlorella sp.* has been capable of heterotrophic production.

Keywords: Microalgae, heterotrophic production, axenic microalgal culture,

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında bana her anlamda destek olan Prof. Dr. Meltem CONK DALAY'a, Aalborg Üniversitesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Niels T. Eriksen'e, Araş. Gör. Müge İŞLETEN'e, Uzman Dr. Biyolog Zeliha DEMİREL'e, İzmir İleri Teknoloji Enstitüsü Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Merkezi Araştırma Laboratuvarı personeline, sorularımı hiç yanıtızsız bırakmayan Algoloji Laboratuvar ekibine (Uzman Biyolog Sevde Uslu HATİPOĞLU'na, Yüksek Mühendis Tuğba ÖNAL'a), Biyomühendis İdil Gültepe'ye, maddi ve manevi desteklerini hep hissettiğim aileme özellikle annem Elif YALÇIN, babam Ahmet YALÇIN'a, ablam Dilek YALÇIN'a ve sevgili eşim Niyazi BİNGÜL'e bana inandıkları için teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	3
2.1. Mikroalgal Biyoteknoloji	3
2.2. Aksenik Kültürlerin Tarihçesi	4
2.3. Heterotrofik Mikroalg Üretiminin Tarihçesi	4
2.4. Mikroalg Kültüründe Temel Aşamalar	6
2.4.1. Örnek toplama.....	6
2.4.2. Ortam hazırlanması.....	7
2.4.3. Sterilizasyon.....	7
2.4.4. İzolasyon.....	7
2.4.4.1. Genel izolasyon	9

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.4.4.2. Tür izolasyonu	12
2.4.4.3. Akselik kültür elde etmek	14
2.5. Mikro Alg Üretim Sistemleri	19
2.5.1. Kapalı sistemler.....	19
2.5.1.1. Mikroalglerin heterotrofik üretim potansiyeli	20
3. KULLANILAN YÖNTEM	22
3.1. Materyal	22
3.1.1. Biyolojik materyal.....	22
3.1.2. Moleküler tanılanması.....	23
3.1.3. Kültür ortamı	25
3.1.4. İzolasyon yöntemi	27
3.1.5. Işık kaynağı	27
3.1.6. Ekipmanlar	27
3.1.7. Akselik kültür elde etmede kullanılan antibiyotikler	28
3.2. Metot.....	28
3.2.1. Stok kültür hazırlanması	28
3.2.2. İnokulum hazırlanması.....	29

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.3. Hücre konsantrasyonunun belirlenmesi.....	29
3.2.4. Aksenik kültür elde edilmesi	31
3.2.4.1. Hücrelerin santrifüj edilmesi	32
3.2.4.2. Antibiyotikle muamele	32
3.2.4.3. Akseniklik testi	32
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	35
5. ÖNERİLER.....	42
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	43
ÖZGEÇMİŞ	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Tek hücreli algleri saflaştırma basamakları	8
2.2 Santrifüj sonunda oluşan katmanlaşma	9
2.3 Seyreltme yönteminin uygulanışı.....	11
2.4 Filtrasyon yöntemi	11
2.5 Plak yönteminde çizgi ekim yöntemleri.....	14
3.1 <i>Chlorella sp.</i> ' nin ışık mikroskobu görüntüleri.....	23
3.2 Stok kültür hazırlanması	29
3.3 <i>Chlorella sp.</i> ' nin stok kültürü	29
3.4 Aksenik mikroalg elde etme prosedürü.....	31
3.5 Aksenik olmayan örnekler	33
3.6 Aksenik olan <i>Chlorella sp.</i> örnekleri	33
4.1 <i>Chlorella sp.</i> ' nin ZRFungal/Bacterial DNA Kiti ile DNA izolasyonu.....	36
4.2 PCR sonuçları.....	37
4.3 1, <i>Auxenochlorella protothecoides</i> ; 2, <i>Chlorella sorokiniana</i> ; 3, <i>Chlorella sp.</i> fotoğrafları	38
4.4. Fototrofik üretimi yapılan <i>Chlorella sp.</i> ve akseniklik kontrolü.....	39

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.5 Miksotrofik üretimi yapılan <i>Chlorella sp.</i> ve akseniklik kontrolü	39
4.6 Heterotrofik üretimi yapılan <i>Chlorella sp.</i> ve akseniklik kontrolü	39
4.7 <i>Chlorella sp.</i> için 25°C' de ve 600 nm' deki optik yoğunluk sonuçları	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Yoğun heterotrofik mikroalg kültürlerinde hacimsel verimlilik ve maximum hücre yoğunluğu.....	5
2.2 Antibiyotik karışımı.	16
3.1 Siyanobakteri primer çiftleri	24
3.2 ESW kültür ortamının hazırlanışı.....	26
4.1 359F-781R için dizi analizi sonuçları	37
4.2 Fototrofik, miksotrofik ve heterotrofik üretimi yapılan <i>Chlorella sp.</i> ' nin spesifik büyüme hızı ve ikilenme süreleri.....	40

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
kb	Kilobaz
M	Marker
<u>Kısaltmalar</u>	
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ESW	Enriched Seawater Medium
OD	Optik Yoğunluk
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat

1. GİRİŞ

Günümüzde kullanım alanlarının artışına paralel olarak, denizin önemli canlı kaynaklarından biri olan alglerle ilgili çalışmalar hızla artmaktadır. Alglerin kullanımına ilişkin ilk bilgilerin Uzakdoğu ülkeleri tarafından verildiği ve aynı zamanda ilk kez bu ülkeler tarafından değerlendirildiği bildirilmektedir (Kaba ve Çağlak; 2006).

Makroalglerin kullanımı çok eskilere dayanmaktaysa da, mikroalglerin kullanımı oldukça yenidir. İnsanoğlu mikroalglerden yararlanmak için yaklaşık 100 yıldan bu yana çalışmaktadır. İlk saf kültürün (bakteri içermeyen) ne zaman yapıldığı açık değildir. İlk kültür çalışmaları 1890 yılında Beijerinck tarafından yapılmıştır. Bunu takiben 1910'da Allen ve Nelson, bir diyatome olan *Phaeodactylum tricornutum* türünü izole ederek kültürlerini yapmışlardır (Cirik ve Gökpinar 1993).

Alg üretim sistemlerinin yetersiz kalması, sucul yetiştiricilik sektörünün daha hızlı gelişmesini engellemektedir. Çünkü mikroalgler sucul sistemlerin biyolojik CO₂/O₂ dönüştürücüleri ve birincil biyokütle üreticileridir. Diğer taraftan mikroalgler biyoteknolojinin gelecekteki en önemli kaynaklarından. Bu hususlar göz önüne alındığında mikroalg üretiminde güvenli ve ekonomik üretim sistemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Mikroalgler, fotobiyoreaktör veya açık havuzlarda üretilebilirler (Becker, 1995).

Kapalı sistemlerdeki algler ototrofik yetiştirilebileceği gibi, miksotrofik ve heterotrofik de üretilebilmektedir. Mikroalgler doğal olarak toplandıktan sonra bunlardan monoalgal ve aksenik kültürler elde edilebilir (Sukatar, 2002).

Çoğu mikroalg fototrofik olarak büyümede, bazı mikroalgler de enerji ve karbon kaynağı olarak organik substratları kullanarak heterotrofik büyüme yeteneğine sahiptirler (Chen, 1996; Lee, 2001). Heterotrofik kültürler ışığa gereksinimi ve sürekli proses kontrolünü ortadan kaldırır. Dünyada mikroalglerin heterotrofik üretimi için endüstriyel ölçekte proses geliştirmeye yönelik önemli

alışmalar yapılmaktadır. Japonya da ticari olarak üretilen *Chlorella* biyomasının %50'si fermentrlerde heterotrofik olarak üretilmektedir (Lee, 1997).

Yapılan bu çalışmada, İzmir' in Gümüldür bölgesinden alınan örnek monoalgal hale geldikten sonra akselik koşullar sağlandığında heterotrofik üreme potansiyelinin olup olmadığına değinilmiştir. Bu veriler dahilinde heterotrofik üretim potansiyeli olan *Chlorella sp.*' nin değerli kimyasalları açısından rehber olabilecek sonuçlar elde edilmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Mikroalgal Biyoteknoloji

Dünyanın bitki biyokütlesinin üçte birini algler oluşturmaktadır. Dünyada 30.000' den fazla mikroalg türü vardır ve bunlardan sadece 100' e yakını ekonomik açıdan değerlendirilmektedir. Mikroalgler, tüm fotosentetik prokaryotik ve ökaryotik mikroorganizmaları temsil eder. Önceleri mavi-yeşil algler olarak bilinen siyanobakteriler, diğer algal gruplar gibi ökaryot değil, prokaryottur. Fotosentetik olmaları nedeni ile üretim sistemleri mikroalglerle aynıdır. Mikroalg ve siyanobakteriler fitoplanktonu oluşturur. Balıklar ile diğer sucul organizmalar için besin maddesi olarak kullanılmalarından dolayı doğadaki besin zincirinin başlangıç noktasını oluştururlar. Mikroalgal biyoteknolojiyi konu alan pek çok kaynakta siyanobakteriler, mikroalglerle birlikte değerlendirilir (Sasson, 1997; Borowitzka, 1992)

Birçok mikroalg sucul ortamda yaşamaktadır. Bazı mikroalg türleri, çeşitli sucul bitkiler ve hayvanların yüzeylerinde büyümeye adapte olmuştur. Diğerleri toprak ve kaya yüzeylerini de kapsayan karasal habitatlarda yaşayabilirler. Algler, çevre problemlerine neden olabilir; boruları kirleterek su kaynaklarını kontamine edebilirler; suların özellikle azot ve fosforca yüksek oranda fertilizasyonu sonucu ani alg çoğalması oluşabilir (ötrofikasyon) ve diğer canlı organizmaların büyümesini inhibe edebilirler. Bazı deniz türleri (dinofilagellat) kabuklu deniz canlılarını kontamine edebilir ve oldukça kuvvetli ekzotoksinleri nedeniyle besin zehirlenmelerine yol açabilirler. Bunun yanında tatlısu, acısu ve deniz ortamlarında yaşayan mikro ve makroalgler, yararlı da olabilmektedir. Mikroalgler, endüstriyel ülkelerde, pigmentler gibi yüksek katma değerli bileşiklerin elde edilmesinde, gıda endüstrisi ve sağlık amaçlı gıda üretiminde; gelişmekte olan ülkelerde ise atık arıtımı ve proteince zengin gıda ve yem katkısı üretimini birleştiren küçük ölçekli projeler ile büyük ölçekli atık su arıtımında kullanılırlar (Sasson, 1997).

2.2. Aksenik Kùltürlerin Tarihçesi

Aksenik alg kùltür çalışmaları Beijerinck (1890, 1893) ile başlamıştır. Klebs (1896) ve Pringsheim (1946) bu konuyu tekrar ele alırken, Miquel (1892d) ise fungus, protozoa ve bakteri kontaminasyonu ile ilgili olan problemleri değerlendirerek, bakteri giderimi için çalkalamalı bir aparat geliştirmiş ve diatomların aksenik kùltürlerini elde ettiğini açıklamıştır. Chodat 1904 yılında aksenik kùltürün nasıl elde edilebileceğini tarif etmiştir. 1960' ların ortasında antibiyotiklerin keşfinden sonra, hızlı bir şekilde alg türlerini saflaştırma yöntemleri geliştirilmiştir. Godzwiz-Shelubsky (1951), Provasoli et al. (1951) ve Reich and Kahn (1951) alg kùltürlerini saflaştırmak için kullandıkları çeşitli antibiyotiklerin sonuçlarını yayınlamışlardır. Spenser (1952), Droop (1967) ve diğerleri antibiyotik kullanımı ile ilgili ilk makalelerini yayınlamışlardır. Lewin (1959) antibiyotiklerle aksenik hale getirilebilen çoğu türün geleneksel metodlar kullanılarak da saflaştırılabileceğini ifade etmiştir (<http://ccmp.bigelow.org>).

2.3. Heterotrofik Mikroalg Üretiminin Tarihçesi

Japonya ve Tayvan' da 1970' lerin sonunda iki *Chlorella* türü, karbon ve enerji kaynağı olarak glukoz ve asetik asit kullanılarak heterotrofik olarak kùltüre edilmiştir (Kawaguchi, 1980). Hücre Sistemleri (Cambridge, UK) adlı şirket 5 L' lik fermentörde *Tetraselmis suecica* CSL161 suşundan bir yumuşakça yemi üretimi için glukozu kullanarak heterotrofik bir kùltivasyon prosesi geliştirmiştir. Prosesi 50.000 L' ye kadar arttırdıklarında da başarılı olmuşlardır (Day et al., 1991). Japonya' da *Cryptocodinium cohnii*' den docosaheptaenoic asid (DHA) üretimi için geliştirdiği bazı heterotrofik proseslerin patenti alınmıştır (Borowitzka, 1995). Martek Biosciences (Columbia, MD, USA) adlı şirket *Cryptocodinium cohnii*' den DHA içerikli yağ üretimi için genel fermantasyon yöntemlerini kullanarak bir heterotrofik kùltivasyon prosesi (150.000 L) geliştirmiştir (Radmer et al., 1996). Bu heterotrofik kesikli prosesleri takiben, Coors Biotech Products (Fort Collins, CO, USA) şirketi tarafından *Spongiococcum exetriccium* suşunun kesikli-beslemeli heterotrofik üretimi için 450 L' lik fermentör kullanılmıştır (Hilaly et al., 1994).

Heterotrofik kültürlerde, optimal büyüme ve üretim koşulları kolaylıkla sağlanabilir ve kontaminasyona neden olan türler aseptik işlemlerle ve ortam sterilizasyonu ile elemine edilebilir. Bu büyüme şekli özellikle değerlikli kimyasalların ve farmasötiklerin üretimi için uygundur.

Heterotrofik mikroalgere olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Heterotrofik mikroalgler genellikle ışıktan bağımsız olarak karıştırmalı tank reaktörlerinde üretilirler. Yüksek yüzey/hacim oranı gerekli değilse hacim artırmak reaktör hacmine, karıştırmaya, gaz transferine ve üretime göre daha basittir. Chlorophyta' dan *Chlorella spp.* (Wu et al. 2007, Xiong et al. 2008), the Euglenophyta' dan *Euglena gracilis* (Ogbonna et al. 1998), Bacillariophyta' dan *Nitzschia laevis* (Wen and Chen 2001, 2003), the Dinophyta' dan *Cryptocodinium cohnii* (De Swaaf et al. 2003a, b), ve Rhodophyta' dan *Galdieria sulphuraria* (Schmidt et al. 2005, Graverholt and Eriksen 2007) gibi türlerin biyomas verimlilikleri ve hücre yoğunlukları karşılaştırıldığında heterotrofik üretimleri fototrofik üretimlerinden daha avantajlı olduğu Çizelge 2.1' de gösterilmektedir.

Çizelge 2.1: Yoğun heterotrofik mikroalg kültürlerinde hacimsel verimlilik (P_{volume}) ve maximum hücre yoğunluğu (X_{max}) (Eriksen, 2008)

Türler	Ürün	Kültür tipi	X_{max} (g l ⁻¹)	P_{volume} (g l ⁻¹ day ⁻¹)	Ref.
<i>Euglena gracilis</i>	α -tokoferol	Kesikli-beslemeli	48	7.7 ^a	A
<i>Nitzschia laevis</i>	Eicosapentaenoic asid	Perfüzyon	ca. 30	6,75	B
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	Docosahexaenoic asid	Kesikli-beslemeli	83	10.0 ^a	C
<i>Chlorella protothecoides</i>	Biodizel	Kesikli-beslemeli	51.2	7.7 ^a	D
<i>Galdieria sulphuraria</i>	C-fikosiyenin	Sürekli	83.3	50.0	E

^a Grafikten hazırlanan değerlere göre hesaplanmıştır.

2.4. Mikroalg Kùltüründe Temel Aşamalar

Laboratuvar koşullarında amaca uygun izole edilmiş uygun bir biçimde besleyerek çoğaltıp üreme imkanı sağlanan bilimsel veya ekonomik amaçlı sürdürülebilir populasyonlara kùltür denir. Eğer kùltür tek tür içeriyorsa saf kùltür, saf kùltür bakterisiz ise akselik kùltür olarak adlandırılmaktadır. (Sukatar, 2002; Guillard, 2004).

Mikroalg kùltüründe temel adımlar örnek toplama, ortam hazırlanması, sterilizasyon, izolasyon ve kùltüre alma şeklindedir (Sukatar, 2002).

2.4.1. Örnek toplama

Doğal habitatlardan alınan materyaller daima karışık topluluklar halindedir. Örnek toplama işlemi, plankton için farklı çapta plankton ağı, bentik, epilitik veya epifitik organizmalar için bıçak kullanılır. Toplanan örnekler kavanozlarda laboratuvara taşınır (Sukatar, 2002).

Toplanan örnekler, en geç iki gün içinde kùltür ortamına alınmalıdır. Eğer toplanan materyal bekletilmek zorundaysa, karanlık veya az ışıklı ortamda korunmalıdır (Guillard, 2004).

Toplanan materyalin çoğaltılması arzulanıyorsa, zenginleştirme ortamı hazırlanıp yaklaşık iki hafta kùltüre alınmalıdır. Zenginleştirme ortamının amacı, hem birey sayısını arttırmak hem de zenginleştirmeyi farklı autekolojik ortamlarda gerçekleştirerek, izole edilecek türün ekolojik gereksinimleri hakkında ön bilgiler elde etmektir (Örneğın; karanlık ortamın hakimiyeti, oda sıcaklığından biraz daha fazla sıcaklık isteğı, hafif asidik ortam, vs.). Zenginleştirme ortamı belli ekolojik koşullarda tutulabilir. Bu şekilde, tek türe indirgenme mümkün olmasa da, birçok türün eliminasyonu mümkün olacaktır. Fakat izole edilecek türün autekolojik istekleri hakkında fazla bilgi sahibi değılsek, zenginleştirmeyi farklı ortamlarda gerçekleştirerek, izole edilecek türün ekolojik gereksinimleri hakkında ön bilgiler elde edilebilmektedir (Sukatar, 2002; Guillard, 2004).

Zenginleştirme ortamı, birçok alg için gelişmeye uygun olmalıdır; bu, özel hazırlanmış yapay ortamlar olabileceği gibi, toprak ekstresi gibi doğal ortamlar da olabilmektedir. Toprak ekstraktının avantajı, kolay ve masrafsız olmasıdır. Her türlü zenginleştirme ortamı; azot kaynağı, mineraller, iz elementleri, karbon kaynağı ve bazı durumlarda vitaminleri içermelidir (Sukatar, 2002; Guillard, 2004).

2.4.2. Ortam hazırlanması

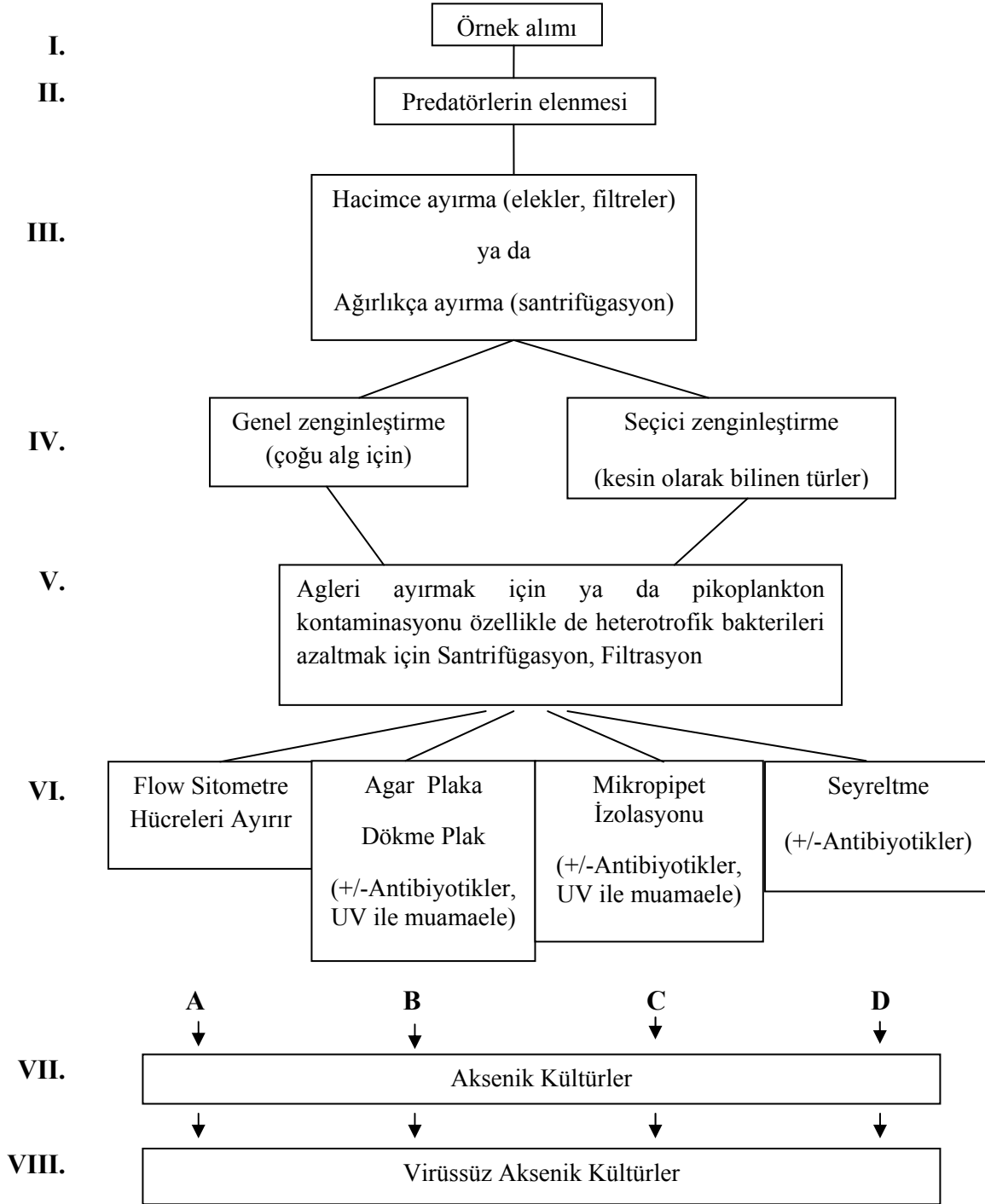
İzole edilecek türün ekolojik istemlerine uygun besi ortamları hazırlanmalıdır. Her türün ihtiyaç duyduğu autoekolojik ortamlar (aydınlatma, sıcaklık, pH, tuzluluk, havalandırma, oksijen seviyesi, su seviyesinin yüksekliği) farklı olduğundan ideal koşullar hazırlanmalıdır (Watanabe, 2004).

2.4.3. Sterilizasyon

Kullanılacak bütün malzemeler ve besleyici ortamlar kesinlikle sterilize edilmelidir.

2.4.4. İzolasyon

Hazırlanan kültürler sadece bir tür içermelidir (monoalgal). İlk genel izolasyona, zenginleştirme ortamında başlatılabilir. Bunun için, izole edilecek türün autokolojik özellikleri bilinmelidir. Böylece, zenginleştirme ortamı, arzu edilen ekolojik ortamda (aydınlatma, sıcaklık, pH, tuzluluk, su seviyesi, organik madde ilavesi, inorganik besleyici içeriği, demir konsantrasyonu, azot kaynağı, değişik toprak ekstreleri vs.) bulundurulmalıdır. İzolasyon farklı yöntemlerle gerçekleştirilebilmektedir (Sukatar, 2002). Tek hücreli algleri saflaştırma basamakları Şekil 2.1' de verilmiştir (Guillard and Morton, 2003).



Şekil 2.1: Tek hücreli algleri saflaştırma basamakları (Guillard and Morton, 2003)

İzolasyon yöntemlerini, genel izolasyon ve tür izolasyonu olmak üzere ikiye ayırmamız mümkündür (Sukatar, 2002).

2.4.4.1. Genel izolasyon

Genel izolasyonda, doğal ortamdan toplanan örneklerin, takson sayısı açısından seyrekleştirilmesi arzu edilmektedir. Bu amaca uygun iki yöntem vardır (Sukatar, 2002).

- **Santrifüj yöntemi**

Toplanılan doğal materyal, 500× hızda 10-20dk boyunca santrifüjlenmektedir. Yüksek devirde veya uzun süreli santrifüjler, bireyleri parçalayacağından veya yaralayacağından, santrifüj devri ve süresi iyi ayarlanmalıdır. Santrifüj sonunda, en dipte zooplanktonlar birikecek, diğer tabakalanmalar sırasıyla ipliksi ve tallus yapısındaki algler, diatomeler, koloni veya topluluk oluşturan algler, sönobiyum oluşturan algler, tek hücreli algler ve en üstte de bakteriler şeklinde olacaktır (Şekil 2.2) Santrifüj sonunda, izole edilecek örneğin bulunduğu katmandan pipet yardımıyla alınıp, zenginleştirme veya izolasyon ortamına aktarılmalıdır (Sukatar, 2002; Guillard, 2004).



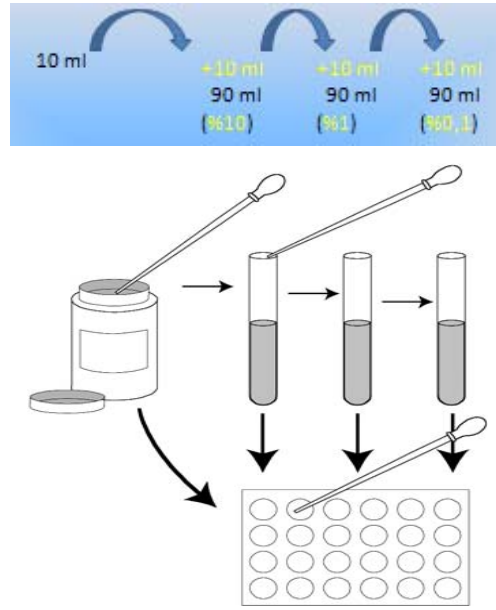
Şekil 2.2: Santrifüj sonunda oluşan katmanlaşma

- **Biyolojik izolasyon yöntemi**

Saf kültür elde etmek için en uygun materyal zoospordur. Özellikle Euglenophyta ve kamçılı Chlorophyta üyelerinde zoospordan başlanan kültürler başarılı olmuştur. Alglerin zoospor oluşturma süresi ve yoğunluğu türe göre değişmektedir. Zoosporlar, su yüzeyine yakın bölgelerde yeşil bir hat şeklinde belirmektedir; bu evrede zoosporlar toplanmalıdır, aksi halde cama yapışacak olan zoosporlar kültür çalışmalarında değerlendirilemez. Yöntemin dezavantajları; sürekli takip ve izole edilmesi amaçlanan belli bir türün zoosporlarını elde etmedeki düşük orandır. Bu yöneme diğer izolasyon yöntemlerinin ardından başvurulması büyük avantajlar sağlamaktadır. (Guillard, 2004; Sukatar, 2002).

- **Seyreltme yöntemi**

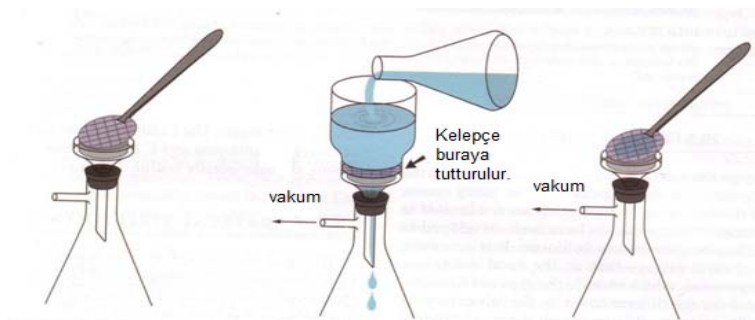
Seyreltme yönteminde, 10 mL' lik örnek sıvıdan alınıp içinde 90 mL besin çözeltisi bulunan tüpe aktarılmaktadır; bu şekilde, %10 seyreltilmiş örnek sıvıya sahip olunmaktadır. Aynı şekilde, %10 seyreltilmiş örnek sıvıdan tekrar 10 mL alınıp başka bir 90 mL besin çözeltisi bulunan tüpe aktarıldığında %1; aynı şekilde, bu sürecin tekrarlanmasıyla, sırasıyla %0.1, %0.01, %0.001 vs. oranında seyreltilmiş örnek elde edilmektedir (Şekil 2.3). Örnek materyaldeki canlıların yoğunluğuna göre %1- 0.01 oranında seyreltilmiş örnek sıvıları gelişmeye bırakıldığında, içinde bir veya birkaç tür gelişecektir. Yöntemin uygulanmasında, bireylerin sıcaklık farkı şokuna uğramamaları için, besinli çözeltinin aynı sıcaklıklarda olmasına özen gösterilmelidir. Yöntemin avantajı kısa sürede ve az uğraşla gerçekleşmesi, dezavantajı ise belli türe göre izolasyon yapılamamasıdır (Guillard, 2004; Sukatar, 2002).



Şekil 2.3: Seyreltme yönteminin uygulanışı

- **Filtre yöntemi**

İzole edilecek örneği, boyutları farklı diğer örneklerden ayırmak için başvurulan bir yöntemdir. Buna göre, örnek materyal, izole edilecek örneğin çapından biraz daha büyük ve biraz daha küçük çaplı filtrelerden geçirilmektedir. Bu şekilde boyutça farklı algler ortamdan uzaklaştırılmaktadır (Sukatar, 2002; Guillard, 2004).



Şekil 2.4: Filtrasyon yöntemi

- **Kılcal sistem**

Kılcal sistem için yatay bir kılcal borudan, kılcal borunun iki yanından dikey yükselen farklı uzunlukta iki kılcal borudan ve dikey kılcal boruların ucunda yer alan behere bağlı kaplardan oluşmaktadır. Daha yüksek düzeyde yer alan behere örnek materyalin bulunduğu sıvı yavaşça aktarılmaktadır; kılcal borunun tıkanmasını engellemek için, örnek sıvı süzgeçten geçirilmelidir. Kılcal borudan geçen örnek sıvı, daha alçakta yer alan behere dolacak ve taşacaktır; beherin dip kısmında, kılcal borunun hemen çevresinde Bacillariophyceae üyeleri gibi ağır planktonlar birikmektedir (Sukatar, 2002).

2.4.4.2. Tür izolasyonu

Tür izolasyonunda, doğal ortamdan, zenginleştirme ortamından veya genel izolasyon yöntemiyle seyreltilmiş solüsyondan alınan karışımın tek türe indirgenmesi amaçlanmaktadır. Bu amaçla aşağıdaki yöntemlere başvurulmaktadır:

- **Mekanik izolasyon**

En sık kullanılan yöntemlerden biri olan mekanik izolasyon yönteminde kılcal pipet kullanılmaktadır. İzolasyona başlamadan önce, kılcal uçlu pipetlerin hazırlanması gerekmektedir. Bu amaca yönelik olarak, genellikle 0,4 cm çaplı cam boru kullanılmaktadır. Cam boru, alev üzerinde ısıtılarak iki yana doğru çekilmektedir. Borunun ayrılacağı bölge eşit olarak ısınması için kendi ekseninde etrafında döndürülmektedir. Boru iki tarafından çekildiğinden, ısıtılarak yerinden uzayan cam boru ikiye ayrılıp, kılcal uçlu (çapı 0.08-0.016 cm' dir) iki cam pipet elde edilmektedir; çekme işlemi ne kadar hızlı gerçekleşirse, kılcal uç o kadar ince ve uzun olacaktır. Cam pipetlerin geniş uçlarına, çalışma sırasında izole edilecek türün kılcal pipete emilmesini kolaylaştırmak amacıyla, lastik geçirilmektedir. Hazırlanmış veya satın alınmış pipetler, santrifüj tüplerinin içine yerleştirilip çevresi pamukla çevrelenip otoklavlanmaktadır. Kılcal pipetle izolasyon, ya alg

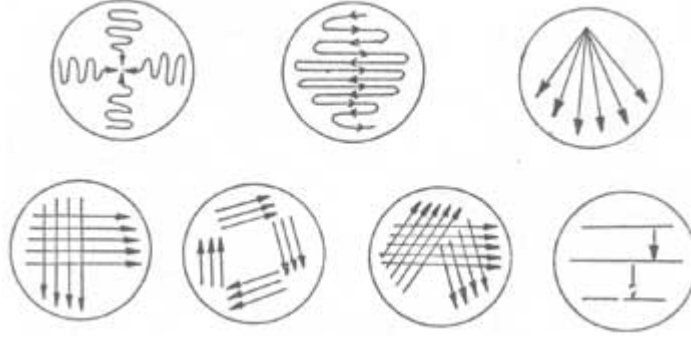
türlerini izole etmek için ya da bakterilerle birlik oluşturmuş alglerden ayıklamak için kullanılmaktadır (Sukatar, 2002; Guillard, 2004).

Yöntemin dezavantajları; sabırla örnekleri kılcal pipete alınması, örneklerin ciddi hasarlar görebilmesi (gerek pipete girerken, gerekse çevre koşullarındaki ani değişiklik), hareketli organizmaların pipetle yakalanmasının zor olması, çok küçük bireylerin yakalanamaması ve cama yapışmış bireylerin değerlendirilmesiyle izolasyondan sonra çoğu zaman gelişme gösterememesidir. Avantajları ise, diğer yöntemlere oranla daha verimli ve daha çabuk sonuç alınmasıdır (Sukatar, 2002).

- **Dökme plaka yöntemi**

Eğer tür, mekanik izolasyonla izole edilemeyecek kadar küçükse veya yüzeye tutunmuşsa ve sıvı ortamda gelişmiyorsa dökme plaka yöntemine başvurulmaktadır. En sık kullanılan yöntemlerden biri olan dökme plaka yönteminde besin maddeleri ilave edilmiş katı ortam kullanılmaktadır. Katı ortam olarak en sık olarak %1.5' lik agar kullanılmaktadır. Aynı bakteriyolojik yöntemlerde olduğu gibi, agarda yetiştirilecek örnek, ya dökülmekte ya da aşılansaktadır (çizgi ekim yöntemi). Yöntemin dezavantajlarından biri, agara gömülen bireylerin gelişmemesi, diğeri oluşacak kolonilerin birbirine çok yakın olmasıdır. Avantajı ise mantar, bakteri, amip ve diyatomelerin gelişmesini azaltmış olmasıdır. Çizgi ekimde; örnek, agara öze ile aşağıda gösterildiği şekillerde aşılansaktadır (Şekil 2.5). Agar üzerinde gelişecek kolonilerin seyrek olması, aşılama yönteminin hem avantajı hem de dezavantajıdır. Bireylerin çoğalması için, petri kapları uygun sıcaklık ve aydınlatmada iki hafta gelişmeye bırakılmalıdır. Plak yönteminin dezavantajları; hazırlığının uzun sürmesi, sonuçların geç alınması, agar üzerinde yetişmeyen taksonların (örneğin; *Isochrysis*) izolasyonuna imkan vermemesi ve kontaminasyona açık olmasıdır. Avantajları; kolay bir yöntem olması ve hidrofob bireylerin izolasyonuna imkan tanınmasıdır. Bir koloniden, bakteriden arındırılmış bireyler izole edilmek istiyorsa, örneklerin sürünerek hareket etme özelliği bulunması gerekir. Şayet örnek sürünerek hareket edebiliyorsa, aşılama bölgesinden en uzağa sürünmüş

olan bireyin izolasyonu yapılmaktadır (Sukatar, 2002, Guillard, 2004, <http://www.marine.csiro.au>).



Şekil 2.5: Plak yönteminde çizgi ekim yöntemleri

Antibiyotik ilave edilecekse, otoklavdan önce besiyerine karıştırılmamalıdır, aksine, steril bir suda çözülüp kültür geliştikten sonra ortama ilave edilmelidir. Antibiyotik uygulaması her zaman olumlu sonuç vermemektedir. Bazı besi ortamlarında, antibiyotik ilavesi agarın katılığını bozmakta, sıvı hale getirmektedir. Bu durumda kültür başarısız olmaktadır. Bunun yanında, bazı alg türleri antibiyotikten olumsuz etkilenmektedir. Bu sonuçlar, deneme-yanılma yöntemiyle bulunmalıdır (Sukatar, 2002).

2.4.4.3. Aksenik kültür elde etmek

- **Antibiyotikle muamele**

Antibiyotik kullanımındaki amaç alglere zarar vermeden bakterileri elemine etmektir ancak bu uygulama her zaman başarılı olmaz. Antibiyotik kullanımıyla bakteri sayısının azaltılması yoğunluk-zaman ilişkisine bağlıdır. Bakterilerin kontrolü bağımsız olarak yapılır. Antibiyotik kullanımı konusundaki tercihler hangi antibiyotiklerden hangi konsantrasyonda ve ne kadar süre için kullanılması gerektiği esasına dayanır. Çünkü bir antibiyotik karışımı bütün bakteriyel kontaminasyonlardan kurtulmak için yeterli değilse, seçilen diğer antibiyotiklerle tekrarlamak bu sorunu çözebilir (antibiyotik karışımlarının etkisi genellikle

bireysel etkileriyle aynı değildir). Bu konuda belirlenmiş üç farklı yaklaşım vardır (Guillard 2004). Bunlar;

➤ **Yöntem 1**

Bu yöntem mikro pipet izolasyonuna ek olarak antibiyotiklerle yapılır (Guillard 1973, Hoshaw and Rosowski 1973). Temel değişken olarak hücrelerin antibiyotiğe maruz kalma süresi kullanılır. Çünkü görünür bakteri sayısı ilk antibiyotik muamelesinden sonra minimum 18-48 saat içinde azalır ve sonra hızlı bir şekilde artar (Oppenheimer 1955). Minimum zaman; sıcaklığa, bakteri çeşidine ve antibiyotik seçimine bağlıdır. Sağlıklı bir inokulumu yeterli miktarda antibiyotik içeren ortama aktardıktan sonra 18-72 saat arasındaki uygun bir zamanda çok az hücre taze ortam (antibiyotiksiz) içeren tüplere mikro pipetle aktarılır. Oppenheimer deneyini karışık doğal bakteri popülasyonu ile yapmıştır. Bazı bakteriler ölürken küçük bir kısmı da direnç kazanmıştır. Monoalgal kültürler genellikle daha az bakteri çeşidi içerir bu yüzden doğru zamanlama çok da önemli olmayabilir. Temel antibiyotik çözeltisi: 100 mg penicillin G (sodyum ya da potasyum tuzu), 25 mg dihydrostreptomycin sülfat ve 25 mg gentamycin sülfat 10 mL distile (deiyonize) su içinde çözülür ve membran filtresiyle steril edilir. Kullanılana kadar dondurulmuş olarak saklanır (Polikarbonat tüpler en iyisidir). Eriyen solüsyonlar örneğin, 4°C de birkaç hafta (37°C’ de beş gün) muhafaza edilirler. “Standart” doz 50 mL alg ortamına 0.5 mL antibiyotik karışımı ilave etmektir. Çoğu alg tarafından 100/25/25 mg. L⁻¹ penisilin, streptomisin ve gentamisin tolere edilir. Gentamisin ve penisilin’ in oldukça yüksek konsantrasyonları tolere edilebilirken, streptomisin bazı türler için toksik olabilir. Algler genellikle 20-25 °C’ de büyürler, 125 mL’ lik beş tane erlenin her birine 50 mL taze ortam koyulur ve 0.5-5 mL inokulum transfer edilir. Erlenlere 0, 0.25, 0.5, 1 ve 2 mL antibiyotik karışımı ilave edilir. Bakteriyel test ortamının çok az miktarı (50 µL) bakteriyel büyümeyi canlandırmak için eklenebilir. Bu yöntemin avantajı antibiyotik kullanımı alglere çok zarar vermeyebilir. Dezavantajı ise hücrelerin, özellikle antibiyotik kullanımından sonra tekrar tekrar yıkanması gerekir. Ayrıca hücrelerin canlanması için zaman ve emek harcamak gerekir. Bu metot koloni oluşturan formlar, dinoflagellatlar, diatomlar ve çoğu flajellalı hücreler için uygundur (Guillard, 2004).

➤ Yöntem 2

Bu metot Droop (1967) tarafından geliştirilmiş, çok fazla manipulasyon gerektirmeyen rutin bir prosedürdür. Özellikle çok yoğun kültürler, flajellaya sahip ve küçük hücreler için uygundur. Yöntemin dezavantajı algler çok yüksek antibiyotik konsantrasyonlarına maruz kalırlar. Droop (1967)' un yöntemine göre yoğun bir antibiyotik karışımı (Çizelge 2.2) seyreltilir bunun yanında çok az miktarda organik madde ilave ederek alg kültürünün hızlı bir şekilde büyümesi sağlanabilir. Bunun anlamı ardı ardına iki kat seyreltme demektir böylece alg konsantrasyonu artmaya devam ederken antibiyotik konsantrasyonu her seferinde ikiye bölünür. Droop (1967) altı seyreltme uygulamıştır, böylece antibiyotik konsantrasyonu 1/32 oranına kadar seyreltilmiştir. Böylece antibiyotik konsantrasyonu azalırken bakteriler ölmesine rağmen algler hala canlı kalacaktır. Droop' a göre transfer işlemi 24-48 saat arasındaki bir saatte yapılmalı.

Çizelge 2.2: Antibiyotik karışımı (Droop, 1967).

Antibiyotik	Konsantrasyon (mg. L ⁻¹)
Benzil penisilin G sülfat	2500
Chloramphenicol	200
Neomycin	200
Actidione (funguslar için)	400

Actidione (cycloheximide) genellikle sadece fungus gelişimini engellemek için eklenir ancak amaç bir siyanobakteriyi saflaştırmak ise bu kimyasal madde ökaryotik alglerin gelişimini engellemek için kullanılmış olur (Guillard 1973). Nystatin ve amphotericin B alternatif antifungal ajanlardır. Chloramphenicol, bakterilere karşı çok etkili olmasına rağmen, aynı zamanda algler için oldukça toksiktir. Örneğin, 10-50 mg. mL⁻¹ 16-17 günlük inkübasyon periyodunda *Alexandrium*' un dört türünü inhibe etmiş ya da öldürmüştür (Divan and Schnoes 1982) ve 50 mg. mL⁻¹ *Micromonas pusilla* (Butcher)' nın gelişimini inhibe etmiştir (Cottrell and Suttle 1993). İncelenen beş diatom türünden sadece biri altı gün için 80 mg. L⁻¹ chloramphenicolü tolere edebilmiştir; dört tür 13 mg. L⁻¹ veya

daha az miktardaki antibiyotik konsantrasyonuna maruz bırakıldığında ölmüştür (Berland and Maestrini 1969). Beş diatom türünün hepsi $100-400 \text{ mg. L}^{-1}$ penisilin ve streptomisini kolaylıkla tolere edebilmiştir (büyüme >kontrolün %50). Kanamisin, hem gram (+) hem de gram (-) bakterilere karşı aktif bir aminoglikozittir (streptomisin gibi), diatomlar tarafından iyi bir şekilde tolere edilir. $1-5 \text{ g. L}^{-1}$ Cycloserine ile $10-30 \text{ mg. L}^{-1}$ cycloheximide (Actidione) deniz *Synechococcus*' un iki türünü saflaştırmak için birlikte kullanılmıştır (León et al. 1986). Ayrıca cycloserine (100 mg. L^{-1}) *Acetabularia* için de kullanılmıştır (Shephard 1970).

Repak et al. (1982) saflaştırma işlemlerinden önce deniz kokoid ultraplanktonlarının ve bakterilerinin duyarlılığını belirlemek için antibiyotik duyarlılık disklerini kullanmışlardır. Antibiyotik diskleri kullanımı faydalı olabilir çünkü hem algler hem de bakteriler agar üstünde büyür ve bu birçok başarılı çalışmada kaydedilmiştir (Guillard, 2004).

Lehman (1976) *Dinobryon sertularia* Ehr. türünü saflaştırmak için güçlü bir antibiyotik karışımı kullanmıştır. Alg kültürünü antibiyotik karışımına maruz bıraktıktan sonra antibiyotiksiz ortama transfer edilmiştir ve daha sonra da bakteriler için her alt kültür test edilmiştir. Dinobryon hücreleri $4,000 \text{ mg. L}^{-1}$ penisilin, 500 mg. L^{-1} streptomisin ve her birinden 10 mg. L^{-1} sülfanomitler: Sulfisoxazole (Gantrisin), sulfamerizine, homosulfamine, sulfisomidone ve sulfisoxazolium. Sülfanomitler mikrobiyal kaynaklı antibiyotikler bulunduktan sonra nadir olarak kullanılmaya başladı. Fakat akuakültürde antibakteriyel olarak kullanılmaya devam etmektedir. Penisilin, streptomisin, neomisin, tetrasiklin, chloramphenicol ve sephaloridine *Aureococcus* kültüründeki bakterileri baskılamıştır (Dzurica et al. 1989). Jones et al. (1973) bir antibiyotik karışımı içine cephalosporin içerikli cephaloridin (ceporin diye de adlandırılır) eklediğinde iki diatomu saflaştırabilmişlerdir (Guillard, 2004).

➤ Yöntem 3

Bu yöntem alglerin yaşamasına ve büyümesine, büyüme hızları azalsa bile, izin verecek seviyelerde her biri farklı antibiyotik içeren bir dizi erlen ortamına

alglerin transferini kapsar. Amaç aşındırma yoluyla bakterileri kaybetmektir. Bir kerede bütün kontaminantları öldürmek için yüksek doz kullanmak yerine ardı ardına antibiyotik kullanmak için üç neden vardır. İlk neden, algler için daha az toksik olabilir. İkinci neden, herhangi bir antibiyotik karışımı bakterilerin bazı metabolik tipleri için öldürücü olabilir fakat sadece diğerlerinin büyümesini baskılar. Sonuncu neden, bakteriyel mutasyonların çoğalması için içinde kalıntı bırakmaz. Bu metod alglerin yaşamasına ve yavaşca artmasına izin verirken, bakteri sayısını ve tipini önemli derecede azaltır (Guillard, 2004).

Bu yöntem genellikle bakterilerin duyarlılığı ve alglerin toleransını anlamak için kullanılır. Çok küçük bir flajellat olan *Micromonas pusilla*' yı saflaştırmak için Cottrell and Suttle (1993) tarafından kullanılmıştır. Sırasıyla antibiyotikler; penisilin (1 g. L⁻¹), neomisin (250 mg. L⁻¹), gentamisin (1 g. L⁻¹) ve kanamisin (0.5 veya 1 g. L⁻¹). %20 inokulum bir antibiyotik muamelesinden diğerine üçer gün arayla transfer edilmiştir (sonuncu için dört gün hariç). Transferler kanamisin uygulanmasından sonra bakterisiz hale gelmiştir. Penisilin gram (+) bakterileri elemine ederken, diğer üç çeşit antibiyotikte gram (-) bakterileri elemine etmiş olmalıdır (Guillard, 2004).

➤ Antibiyotik kullanımı ile ilgili yapılan çalışmalar

Vance (1966) en çok kullanılan dihidrostreptomisin ve neomisin ile birlikte 32 antibiyotiğin beş siyonabakteri -*Microcystis aureginosa* da dahil- üzerindeki duyarlılığını belirlemiştir. *Microcystis* antibiyotik kullanılmadan aksenik olarak kültüre edilebilmiştir (Watanabe et al. 1985, Shirai et al. 1989). Guillard ve Keller (1984) bazı dinofilagellat türlerini saflaştırmak için 17 farklı antibiyotik kullanmıştır (Guillard, 2004).

Hücre duvarı sentezini engelleyen antibiyotikler için çok az miktardaki organik materyal hücre bölünmesini teşvik edebilir. Çünkü hücre duvarı sentezini engelleyen antibiyotikler sadece hücreler büyürken bakterileri öldürür. Gereken organik materyal miktarı 10 mg. L⁻¹ olarak tahmin edilmektedir. Protein sentezini engelleyerek yavaş hücre büyümesine neden olan diğer antibiyotiklerle birlikte

hücre duvarı inhibitörlerini (örneğin, penisilin) eklemek doğru olmayabilir (Guillard, 2004).

- **Diğer antimikrobiyal ajanlar**

Aksenik kültür elde etmek için lizozim enzimi kullanılabilir. Örneğin; *Anabaena flos-aquae* ve *Aphanothece nidulans* kültürleri için. 1,2 g L⁻¹ lizozim konsantrasyonu heterotrofik bakteri gelişimini engellerken, siyanobakteri gelişimini engellemez. 0,8 g L⁻¹ lizozim+ampisilin heterotrofik bakteri sayısını azaltır. 1,0 g L⁻¹ lizozim (ampisilinsiz) enzimi kullanılarak aksenik kültür elde edilmiştir. Mikroskobik algler lizozim enzimine karşı heterotrofik bakterilerden daha dirençlidirler. Bu yöntem özellikle filamentli siyanobakteriler için uygundur (Guillard, 2004).

2.5. Mikro Alg Üretim Sistemleri

Üretim sistemleri genellikle kültür ortamı dış etkilere açık olduğunda açık sistemler, ortamın dış çevre ile ilişkisi kesildiğinde ise kapalı sistemler olarak adlandırılırlar. Üretim sisteminin tercihi, alglerin biyolojisine, arazi, laboratuvar, enerji, su ve beslenme maliyetlerine, iklime ve elde edilmek istenen son ürüne göre değişmektedir. Bu sistemlerin kendine özgü avantajları ve dezavantajları vardır (Vonshak and Torzillo, 2003; Sukatar, 2002).

2.5.1. Kapalı sistemler

Fotobiyoreaktörlerle üretimde, mikro alg kültürünün dış ortamla ve atmosferle ilişkisi kesilmiştir. Fotobiyoreaktörler özellikle gelişen endüstriyel pazarların ihtiyaç duyduğu pigmentler, polisakkaritler gibi değerli mikro alg ürünlerinin eldesinde kullanılmaktadırlar. Bunlar, tam kontrollü bir ortam sağladığı için kontaminasyon riski yok denecek kadar azdır. Ancak tam kontrollü fotobiyoreaktörler genellikle çok özel üretimlerde kullanılmaktadır, ticari üretimde amaç, tek hücre kültürü sağlayacak esnek bir sistemle çalışmaktır. Bu sistemlerin; temiz üretim, etkin ışık kullanımı, yüksek biyokütle ile çalışabilme,

sıcaklığın kontrol edilebilmesi ve ışığın ayarlanabilmesi gibi çok sayıda avantajı vardır. Bu avantajlar sonucu kaliteli bir üretim gerçekleştirilmektedir. Ancak bu sistemleri kurmak ve işletmek pahalı bir işlemdir. Bu sebeple, kapalı sistemlerde üretilen mikro alglerin fiyatı yüksek olup, piyasası sınırlıdır (Vonshak and Torzillo, 2003; Sukatar, 2002).

- **Ototrofik üretim**

İhtiyaçları olan enerjiyi ışıktan ve biyomas oluşumu için gereken karbonu da fotosentez sırasında karbondioksitten alarak yapılan bir üretim şeklidir.

- **Miksotrofik üretim**

Aynı anda hem organik karbon hem de ışık enerjisini kullanılması sonucu yapılan üretim şeklidir.

- **Heterotrofik Üretim**

Hem enerji ve hem de karbon ihtiyaçlarının şeker, yağlar ve organik asitler gibi organik bileşiklerden elde edilmesi sonucu yapılan üretim şeklidir.

2.5.1.1. Mikroalglerin heterotrofik üretim potansiyeli

Mikroalgler genelde fotosentetik organizmalar olarak değerlendirilir. Ancak yapılan çalışmalar çoğu türün heterotrofik ve miksotrofik büyüme yeteneği olduğunu göstermiştir (Droop, 1974) .Ayrıca bu heterotrofik türler neredeyse alglerin bütün taksonomik sınıflarında bulunurlar. Alglerdeki heterotrofiyi inceleyen çalışmaların çoğu soruna ekolojik bir bakış açısıyla yaklaşmıştır (Droop, 1974). İlk sorun algler tarafından akuatik ortamdan alınan organik karbon miktarı ve alglerin organik bileşikleri alarak fotosentez yapıp yapamayacağıdır. Alglerdeki büyümeyi test eden bu çalışmalar genellikle düşük konsantrasyonda organik materyalin bulunduğu ortamda yapılır. Bu koşullar altında, heterotrofik olarak büyüme yeteneği olmayan algler zorunlu fototroflar olarak sınıflandırılır. Ancak zorunlu fototrofiyi sadece testlerin gerçekleştirildiği belirli koşullarda,

algal davranışları tanımlamak için kullanmak uygun olacaktır. Çoğu durumda zorunlu ototrof olarak sınıflandırılan algler sonradan heterotrofik büyüme yeteneği gösterebilirler. Aşağıdaki iki örnek bu konuya açıklık getirecektir (<http://www.suyla.com>).

Brachiomas submarina ve *Haematococcus pluvialis*' in bazı cinsleri fotosentetik olarak büyürlerken ortamdaki nitrati indirgeyebilirler ama bu olayı karanlıkta yapamazlar. Amonyak gibi indirgenmiş bir nitrojen kaynağı sağlandığı zaman, heterotrofik büyüme yeteneği gösterirler (<http://www.suyla.com>).

Pymnesium parvum ve *Chroomonas salina* çok yüksek gliserol konsantrasyonları sağlandığı zaman heterotrofik olarak büyüebildiği halde, gliserol konsantrasyonunun düşük olduğu ortamlarda heterotrofik olarak büyüyemez (0,25M) (Droop, 1974) (<http://www.suyla.com>).

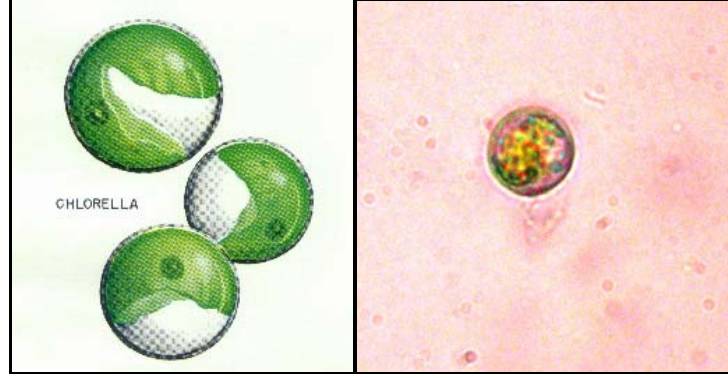
3. KULLANILAN YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Biyolojik materyal

Bu çalışmada kullanılan *Chlorella sp.* 'Gümüldür' den izole edilmiştir (Şekil 3.1). Bu grubun üyeleri genellikle 2-10 µm çapındaki boyutlara sahiptir. Hücreler küresel ya da elipsoid şekillidir. Ayrıca hücrelerinde tek nükleus ve bir kromatofor vardır, tek tek olduğu gibi koloni de meydana getirebilirler. Vejetatif safhada kamçıları olmayan, hareketsiz alglerdir. Kloroplastlarında bulunan pirenooidlerde nişasta oluştururlar. Nişastayı sitoplazma yerine kloroplastlarında oluşturdukları için diğer alg gruplarından ayrılırlar. Bu grup üyeleri hem denizlerde hem de tatlı sularda yayılış gösterir. Bu nedenlerden dolayı *Chlorella sp.* olduğuna karar verilen örnek moleküler tanılama ile de doğrulanmıştır. Örneklerin küçük olması ve birbirlerine çok benzemesi nedeniyle doğru sınıflandırılabilirmeleri moleküler tayinlerini zorunlu kılmıştır.(Beijerinck, 1980; Güner ve Aysel, 1991).

Domain:	Eukaryota
Kingdom:	Plantae
Division:	Chlorophyta
Class:	Chlorophyceae
Ordo:	Chlorococcales
Family:	Chlorellaceae
Genus:	Chlorella



Şekil 3.1: *Chlorella sp.*' nin ışık mikroskobu görüntüleri (1600×)

(<http://course1.winona.edu/sberg/ILLUST/Chlorella.JPG>)

3.1.2. Moleküler tanılanması

ZRFungal/Bacterial DNA kiti ile genomik DNA izolasyonu

1. 50-100 mg (yaş örnek) fungus veya bakteri hücresi 200 µl su veya izotonik tampon (örneğin; PBS) ZR BashingBead™ Lysis Tube içerisinde çözülür ve üzerine 750 µl Lizis Solusyonu eklenmelidir.
2. Tüp max. Hızda 5 dak. vortekslenir ve hücrelerin parçalanması sağlanır.
3. ZR BashingBead™ Lysis Tüpü $\geq 10,000 \times g$ 1 dak. santrifüjlenir.
4. 400 µl süpernatant Zymo-Spin™ IV Spin Filter toplama tüpüne aktarılır ve 7,000 rpm 1 dak. santrifüj edilir.
5. 1,200 µl Fungal/Bacterial DNA Binding Tamponu 4. basamaktaki toplama tüpüne ilave edilir.
6. Zymo-Spin™ IIC Column toplama tüpü içerisine yerleştirilir ve 800 µl karışımdan ilave edilir. $10,000 \times g$ 1 dak. santrifüj edilir ve toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırılır ve işlem tekrarlanır.
7. Zymo-Spin™ IIC Column yeni toplama tüpü içerisine yerleştirilir ve filtre üzerine 200 µl DNA Pre-Wash Tamponu ilave edilir ve $10,000 \times g$ 1 dak. santrifüjlenir ve sonra 500 µl Fungal/Bacterial DNA Wash Tamponu ilave edilir ve sonra tekrar aynı şekilde santrifüjlenir.

8. Zymo-Spin™ IIC Column 1,5 ml ependorf içerisine dikkatlice yerleştirilir ve üzerine 100 µl DNA Elution Tamponu ilave edilerek $10,000 \times g$ 30 saniye santrifüjlenerek filtrede tutulan DNA toplanır.

Görüntüleme;

Bu yöntemle elde edilen DNA' lar agaroz jel elektroforezi yöntemiyle (Yatay Elektroforezi (Owl Horizontal), Güç Kaynağı (Consort EV265)) gözlenmiştir. Jel elektroforezi için %1,2' lik agaroz jel hazırlanmış ve örnekler 100 V, 35 mA ve 3 W' da 45 dak. yürütülmüştür. Ardından SYBR Safe DNA ile boyanan UV transiliminatör yardımıyla görüntülenmiştir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Techne TC-300X)

Kullanılan primer çiftleri Çizelge 3.1' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1: Siyanobakteri primer çiftleri (Nübel, 1997, Boutte et all., 2006)

CYA 359F	Siyanobakteri	5'-GGG GAA TYT TCC GCA ATG GG-3'
CYA 781R(a)	Siyanobakteri	5'-GAC TAC TGG GGT ATC TAA TCC CAT T-3'
CYA 781R(b)	Siyanobakteri	5'-GAC TAC AGG GGT ATC TAA TCC CTT T-3'

PCR Kiti

- HelixAmp™ HyperSense DNA polimeraz (Nanohelix)

Yöntem;

İçerik	50 µl	Final Konsantrasyon
Ultra pure su	Göreceli	
10×Reaksiyon Tamponu	5 µl	2 mM MgCl ₂
dNTP Karışımı	1 µl	200 µM (her bir dNTP)
İleri PCR Primer, (10 pmoles/ml)	1-2µl	0,2-1 µM
Geri PCR Primer, (10 pmoles/ml)	1-2µl	0,2-1 µM
Şablon DNA	5 µl	
HelixAmp™ SpeedHifi DNA Polimeraz	0,125 µl	1,25 U

	Döngü	Zaman	Sıcaklık
Denatürasyon	1	2 dak	95 °C
Denatürasyon	35	20 sn	95 °C
Bağlanma	35	40 sn	65 °C
Uzama	35	1 dak (45 sn/kb)	72 °C
Son Uzama	1	5 dak	72 °C
Soğuma Sınırsız		4 °C	

Sekans Analizi

PCR sonuçlarının dizi analizi İzmir İleri teknoloji Enstitüsü Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda (ABI3130XL, 16 KAPİLLER SİSTEM) yapılmıştır. Sonuçlar NCBI-Blast programı yardımıyla değerlendirilmiştir. Filogenetik haritasını çıkarmak için MEGA 4 Bootstrap Test of Phylogeny programı kullanılmıştır.

3.1.3. Kültür ortamı

Chlorella sp. için ESW (Enriched Seawater Medium) ortamı kullanılmıştır. Hazırlanışı Çizelge 3.2' de verilmiştir (Provasoli, 1963,1968; McLachlan, 1973).

Kültür ortamının hazırlanmasında kullanılan kimyasallar analitik saflıkta olup Merc markadır. Kimyasallar distile suda çözülüp pH ayarları yapılmıştır. Katı kültür ortamı için 15 g/L agar ilave edilmiştir. Kültür ortamlarını steril hale getirmek için 121°C' de 15 dakika otoklav kullanılmıştır.

Çizelge 3.2: ESW kültür ortamının hazırlanışı.

Deniz Suyuna Zenginleştirilmiş Çözelti (Provasoli, 1963,1968; McLachlan, 1973)

Kimyasal	Miktar	Son konsantrasyon
NaNO ₃	2,35 g/L	34 mM
Na ₂ gliserofosfat .5H ₂ O	0,35 g/L	1.6 mM
ES Fe Çözeltisi	163 mL/L	
P-II Metal Çözeltisi	163 mL/L	
Tris	1 g/L	
Vitamin B ₁₂	1,5 mL/L	
Biotin Vitamin Çözeltisi	1,5 mL/L	
Tiamin Vitamin Çözeltisi	1,5 mL/L	

ES Fe Çözeltisi (Provasoli, 1963,1968; McLachlan, 1973)

Kimyasal	Miktar	Son konsantrasyon
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,35 g/500 mL	1.8 mM
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,30 g/500 mL	1.6 mM

P-II Metal Çözeltisi (Provasoli, 1963,1968; McLachlan, 1973)

Kimyasal	Miktar	Son konsantrasyon
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,1 g/100 mL	0.27 mM
H ₃ BO ₃	0,114 g/100 mL	1.8 mM
MnSO ₄ .H ₂ O	16,4 mg/100 mL	0.097 mM
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,2 mg/100 mL	0.007 mM
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,48 mg/100 mL	0.002 mM

Vitamin Çözeltisi (Provasoli, 1963,1968; McLachlan, 1973)

Kimyasal	Miktar
Vitamin B ₁₂	0,0135 g/100 mL
Biotin	0,0025 g/100 mL
Tiamin	0,11 g/100 mL

- 1L steril deniz suyu (30 gr/1 deniz tuzu),
- 20 mL/L zenginleştirilmiş çözelti (Enrichment Solution),
- 1g/L Tris tampon olarak ortama eklenir.
- Ortma pH' sı 7.8 olacak şekilde ayarlanır.
- 0.45 µm Milipore filtre ile steril edilen vitamin çözeltisi ortam steril edildikten sonra eklenir.

3.1.4. İzolasyon yöntemi

Chlorella sp. seyreltme ve dökme plaka yöntemi kullanılarak izole edilmiştir.

3.1.5. Işık kaynağı

Işık kaynağı olarak Wiselight marka 24W day-light renkli tasarruflu ampüller kullanılmıştır ve başlangıç olarak sürekli aydınlıkta çalışılmıştır. Daha sonra heterotrofik üretim için kültürler karanlık ortamda inkübe edilmiştir.

3.1.6. Ekipmanlar

- Spektrofotometre (Ultraspec 1100 pro)
- Sonikatör (Bandelin Sonoplus HD 2070)
- pH-metre (Mettler Toledo)
- Otoklav (Hirayama HICLAVE HVE-50)
- Vorteks (Stuart Scientific SA 2)
- Mikroskop ve Fotoğraf Çekim Aparatı (Olympus CH40)
- Membran Filtre Ünitesi (Sartorius SM 16309)

- Liyofilizatör (Edwards-Modulyo)
- Kültür Dolabı (Uğur)
- Etüv (Brand)
- Analitik Terazı (Mettler Toledo AL204)
- Manyetik Karıştırıcı (Stuard Scientific)
- No-frost Buzdolabı (Vestel)
- Santrifüj (Hettich Universal 32R)

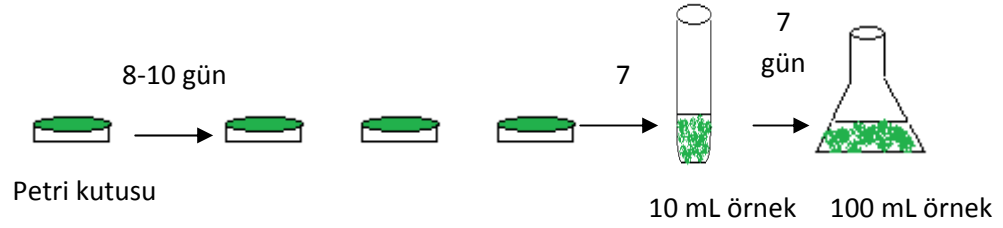
3.1.7. Aksenik kültür elde etmede kullanılan antibiyotikler

- Ampisilin (Sigma-Aldrich),
- Kanamisin (Sigma-Aldrich),
- Gentamisin (Sigma-Aldrich),
- Streptomisin (Sigma-Aldrich),

3.2. Metot

3.2.1. Stok kültür hazırlanması

Denizden alınan örnek (*Chlorella sp.*) ilk olarak katı kültür ortamları içeren petri kaplarına çizgi ekim yöntemleriyle ekilmiştir. 8-10 gün boyunca koloni oluşturmak üzere kültür dolabında inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem yaklaşık üç kere tekrar edilmiştir. Monoalgal koloniler izole edilene kadar bu işleme devam edilmiştir. Oluşan kolonilerin monoalgal hale gelip gelmedikleri mikroskop altında yapılan incelemelerle belirlenmiştir. Monoalgal hale gelen koloniler, 10 mL steril sıvı ortam içeren test tüplerine ateş yanında öze yardımıyla aktarılmıştır. On gün boyunca bu tüplerin vorteks ile karıştırılarak homojenizasyonu ve havalanması sağlanmıştır. Bir hafta sonra 10 mL' lik tüpler alt kültürleme yoluyla tekrar çoğaltılmıştır ve inkübasyona bırakılmışlardır. Yoğunlaşan kültürler tüplerden steril sıvı ortam içeren 100 mL' lik erlenlere aktararak kültür dolabında 25 °C' de inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.3). Tüplerden bir çoğu stok kültür olarak, erlendeki kültür ise ölçek büyütmek için kullanılmıştır. Stok kültür hazırlama prosedürü Şekil 3.2' de gösterildiği gibidir.



Şekil 3.2: Stok kültür hazırlanması



Şekil 3.3: *Chlorella sp.*' nin stok kültürü

3.2.2. İnokulum hazırlanması

Çalışmada kullanılacak kültürlerin aynı özellikte olması deneylerin güvenilirliği açısından önem taşımaktadır. Bu nedenle deneylerde kullanılacak aşı kültürleri sabit koşullarda (25°C sıcaklık ve 5 klux ışık şiddeti) hazırlanmıştır.

Chlorella sp. hücrelerinin üretiminde kullanılmak üzere hazırlanan inokulum için inkübasyon süresi 6 gün olarak belirlenmiştir. 6 günlük inkübasyon periyodu sonunda hücreler logaritmik büyüme evresine girmiştir. Ayrıca 250 mL' lik erlenlere 20 mL inokulum 80 ortam kullanılarak kültür hazırlanmıştır.

3.2.3. Hücre konsantrasyonunun belirlenmesi

Hücre konsantrasyonunu tespit etmek ve büyüme grafiklerini çıkarabilmek için gün aşırı örnek alınmıştır. Yaklaşık 2,5 mL örnek steril pipetler kullanılarak aseptik koşullarda her bir kültür şişesinden alınmıştır. Bunun 2 mL' lik kısmı

optik yoğunluk ölçümünde ve örneğin geri kalanı mikroskop altında incelenmek için kullanılmıştır.

Ultraspec 1100 pro markalı spektrofotometre yardımıyla otomatik olarak görünür dalga boyları (400-700 nm) arasında taranarak optimum dalga boyu seçilmiştir. Bu yüzden hücre büyümesi *Chlorella sp.* için 600 nm' de hücre süspansiyonunun absorbans ölçümü ile yapılmıştır.

Hücreler çökelme eğiliminde olduklarından örnekleri spektrofotometre küvetlerine koymadan önce iyice vorteks ile karıştırmak gerekmektedir ve analiz süratle yapılmalıdır.

- **Spesifik Büyüme Hızlarının Belirlenmesi**

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

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

μ ; Spesifik büyüme hızı

x_2 ; t_2 zamanındaki hücre konsantrasyonu

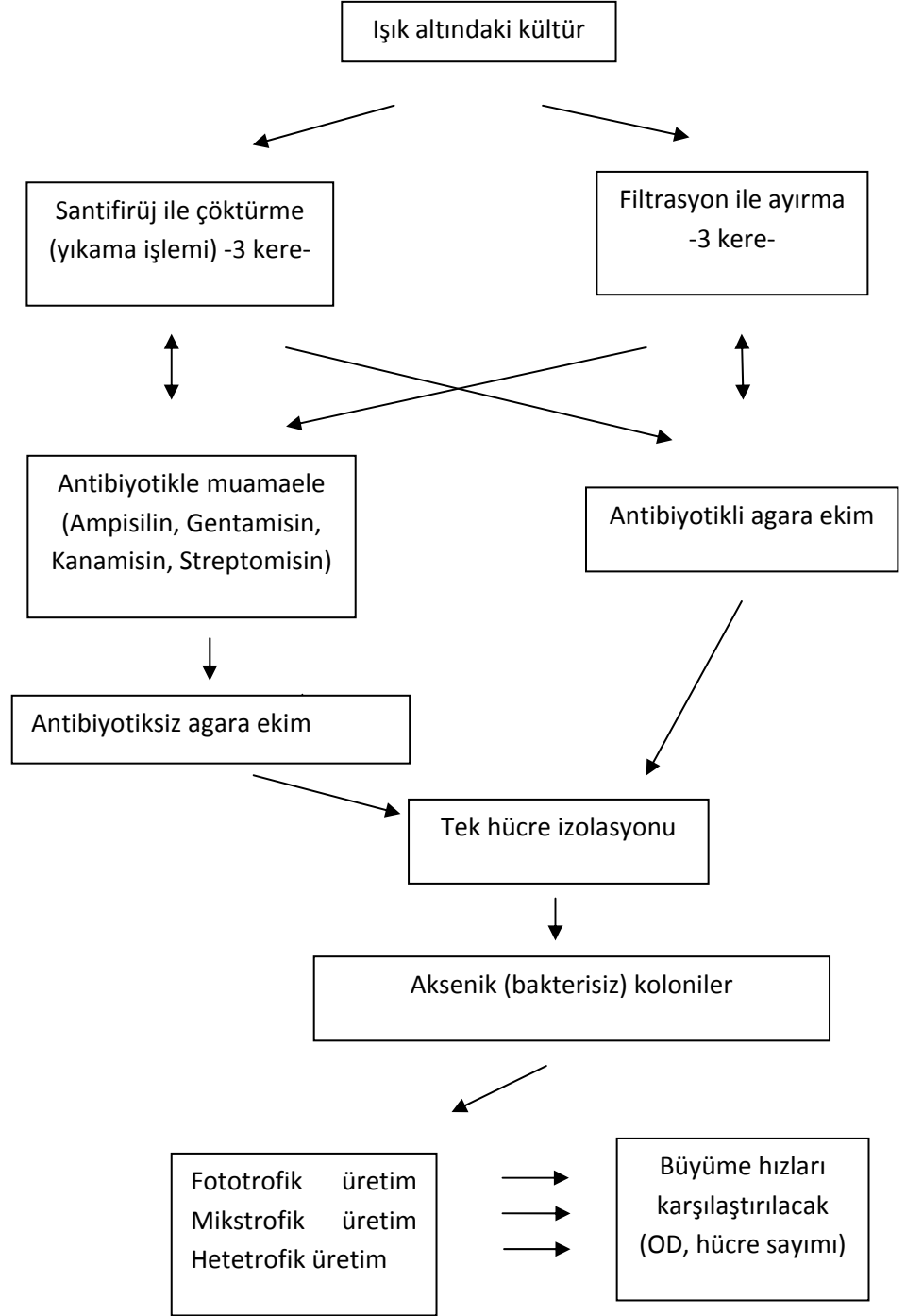
x_1 ; t_1 zamanındaki hücre konsantrasyonu

$\Delta t = t_2 - t_1$

D.T.; ikilenme süresi

$$D.T = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Aksenik kültür elde edilmesi



Şekil 3.4: Aksenik mikroalg elde etme prosedürü

Heterotrofik mikroalg kültürlerinin verimliliği potansiyel olarak ototrofik mikroalg kültürlerinin verimliliğinden daha yüksek olabilir fakat çoğu alg ışığa ihtiyaç duyar.

3.2.3.1. Hücrelerin santrifüj edilmesi

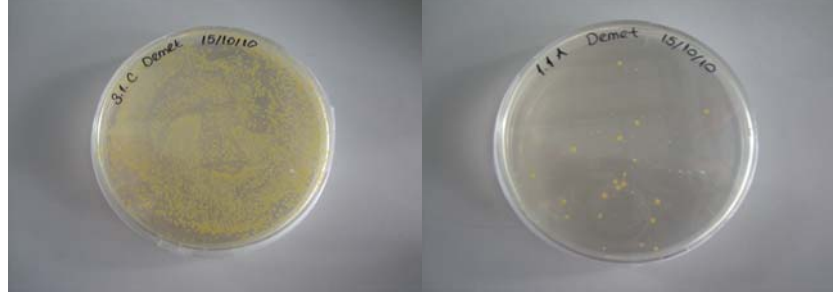
Aseptik koşullar altında ependorf tüplere koyulan *Chlorella sp.*, ESW kültür ortamı ile 4500 rpm' de 5 dk süreyle 3 kere santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen örnekler 5 mL steril sıvı ortamına aktarılır.

3.2.3.2. Antibiyotikle muamele

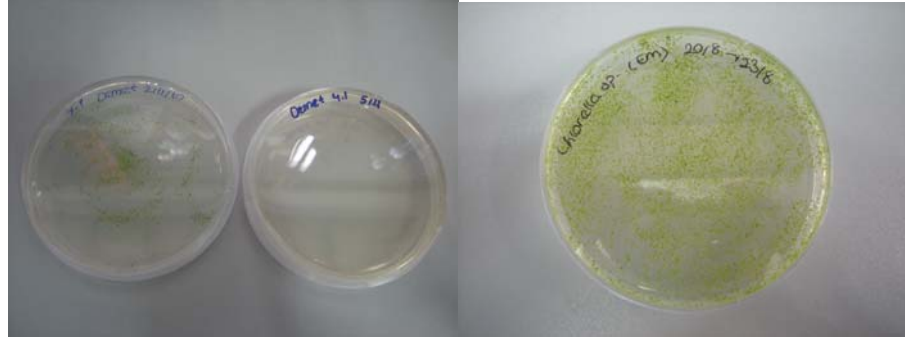
10 mL saf su içinde 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ampisilin, 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ kanamisin, 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ streptomisin ve 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ gentamisin olacak şekilde çözülür. Bu antibiyotik karışımı kullanılmadan önce 0,2 μm steril filtreden geçirilerek steril hale getirilir. Hem sıvı kültüre hem de katı ortama (agar üzerine) antibiyotik eklenmiştir. Santrifüj edilen örnekler 5 mL sıvı ortama aktarılır ve 200 μL antibiyotik karışımı ekleyip yaklaşık 24 saat bekletilir. Bu süre bitiminde hücreler taze ortama alınır ve antibiyotiksiz katı ortama (agara) çizgi ekim yöntemiyle aktarılır. Santrifügasyon yoluyla bakteri sayısı azaltılan örnekler taze sıvı ortama aktarılır ve 25 μL örnek antibiyotikli agar üzerine çizgi ekim yöntemiyle ekilir. Hem antibiyotikli hem de antibiyotiksiz agar üzerinde oluşan mikroalg kolonileri steril edilmiş kürdan yoluyla teker teker toplanıp 3 mL steril sıvı ortam içeren test tüplerine koyulur. Işığı yoğun olan bir kültür dolabında bu tek hücre izolasyonlarının üremesi beklenir.

3.2.3.3. Akseniklik testi

Yoğunlaşan kültürlerin aksenik olup olmadığını anlamak için 100 μL sıvı mikroalg örneğini "Nutrient Agar" üzerine yayma yöntemiyle aktarılır. 30 °C' de 2-3 gün inkübatöre bırakılır.



Şekil 3.5: Aksenik olmayan örnekler



Şekil 3.6: Aksenik olan *Chlorella sp.* örnekleri

Aksenik olan örnekler şekillerde görüldüğü gibi temiz bir görüntü oluşturur ve sadece alg ürer (Şekil 3.6). Aksenik olmayan örnekler ise kirliliği bir görüntü oluşturur ve genelde bakteri veya küf ürediği gözlenir (Şekil 3.5).

Örneğin Optik Yoğunluğu (OD, Optic Density) ölçülerek de aksenik olan kültürlerin aksenikliğini kaybetmesi gözlenebilir. Ani bir artış bunun bir göstergesi olabilir.

Bir diğer yöntem ise steril olarak alınan örneklerin Faz-Kontrast mikroskobu ile incelenmesidir.

Bulanıklık da bir örneğin aksenik olup olmadığının göstergesidir. Eğer örnek bulanık ise kontamine olmuş diyebiliriz. Bulanıklık yok ise bu temiz olduğuna işarettir.

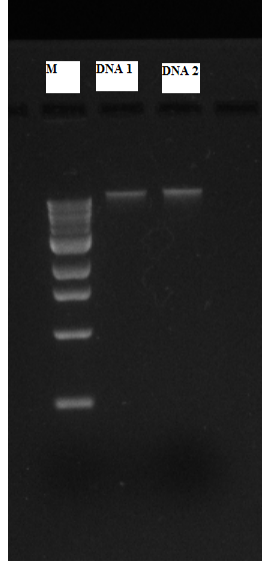
pH ölçümü de bir başka göstergedir. Eğer ani bir pH değişimi söz konusu ise bu bir kontaminasyon olabileceğine işarettir.

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Mikroalgler; enerji kaynağı olarak ışığı, karbon kaynağı olarak CO₂'i kullanan fototrofik canlılardır. Bu yüzden ki mikroalg endüstrisinde fototrofik üretim şekli en yaygın kullanılan üretim sistemidir (Chen, 1996). Bu üretim sistemleri için havuz, göl gibi açık sistemler veya kontrollü kapalı sistemler olarak fotobiyoreaktörler kullanılmaktadır. Açık sistemler hava değişiklikleri nedeniyle kontrollerinin zorluğu, yüksek yatırım maliyetleri, elde edilen biyomas miktarının düşüklüğü ve yüksek kontaminasyon riskleri nedeniyle dezavantajlı olmaktadır. Kapalı sistemler olarak kullanılan fotobiyoreaktörlerin ise açık sistemlere göre avantajları fazla olmasına karşın, bu sistemlerde yaşanan yetersiz ışık penetrasyonu, yüksek konsantrasyonlarda oksijen birikiminden kaynaklanan olumsuz etkiler, çok büyük miktarda suyun işlemde geçirilmesi gerekliliği ve bu işlemin üretim maliyetlerinde oldukça fazla bir yer işgal etmesi gibi dezavantajları da bulunmaktadır (Demirel ve Özpınar, 2003; Lee, 2001). Bazı mikroalgler, organik karbon kaynaklarını hem karbon hem de enerji kaynağı olarak kullanabilmektedir. Heterotrofik üretim yöntemi, bu mikroalglerin kültüre edilmesinde daha düşük maliyetlerle gerçekleşmektedir. Bunun yanı sıra, fotosentetik sistemlere uygulanamayan kesikli beslemeli veya yüksek hücre yoğunluğu (high cell density) üretim teknikleri kullanılmasına ve mikroalglerin büyük ölçekteki üretimlerine olanak sağlar. Bu üretim yöntemi, ışık ihtiyacını ortadan kaldırır ve böylece mikroalgal hücre konsantrasyonunun çoğalma olasılığını arttırarak kesikli sistemlerde hacimsel verimliliği de arttırır. Ayrıca endüstriyel mikrobiyolojideki fermentör sistemleri değişik işletim modlarında kullanılarak bu verimlilik arttırılabilir. Besiyerlerinin steril edilmesi ve üretim boyunca sağlanan aseptik koşullarla kontaminasyonlar elimine edilebilmektedir (Chen, 1996). Mikroalglerle heterotrofik büyüme koşullarında yapılan çalışmaların pek çoğu laboratuvar ölçeğinde kalmıştır. *Chlorella minutissima*, *Chlorella saccharophila*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Cryptocodinium cohnii*, *Schizochytrium aggregatum*, *Schizochytrium mangrovei*, *Amphidinium carterae* ve *Nitzschia laevis* çalışılan türler arasında bulunmaktadır (Chen ve Johns 1991; Chen and Johns 1996; Vazhappilly and Chen 1998; Jiang et al., 2004; Chen et.al., 2007). Mikroalglerin, endüstriyel ölçekte heterotrofik olarak üretilmesi için dikkate değer çalışmalar yapılmaya

başlanmıştır. Japonya’da *Crypthecodinium cohnii*’den hetetrofik olarak üretilen DHA için pek çok heterotrofik proses patent altına alınmıştır. Bu üretim sistemlerinden bir tanesi de ticarileştirilmiştir (Chen, 1996).

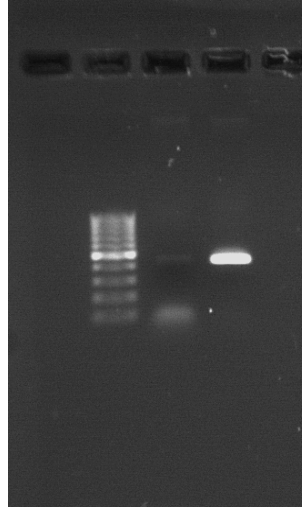
Bu çalışmada heterotrofik büyüme potansiyeline sahip yeni türlerin bulunması ve heterotrofik üretim koşullarının optimizasyonu için yerel bir izolat olan *Chlorella sp.*’ nin heterotrofik üretim potansiyeli diğer üretim yöntemleriyle karşılaştırılarak incelenmiştir. Chlorophyta üyelerinin morfolojik olarak birbirine çok benzemesi sebebiyle moleküler olarak tanılamayı zorunlu kılmıştır. *Chlorella sp.*’ nin DNA’sı ZRFungal/Bacterial DNA Kiti ile izole edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: *Chlorella sp.*’ nin ZRFungal/Bacterial DNA Kiti ile DNA izolasyonu.

Marker(M), 1kb DNA ladder (10,0 kb, 8 kb, 6,0 kb, 5,0 kb, 4,0 kb, 3,0 kb, 2,0 kb, 1,5 kb, 1,0 kb ve 0,5 kb); 1(a)-2(b),

25 µl olarak hazırlanan PCR ürünlerinde 359 F-781R(a) için bağlanma sıcaklığı 62 °C, 359 F-781R(b) için Nanohelix kitinde 65 °C derece kullanılarak optimizasyonları yapılmıştır. Şekil 4.2’ de elde edilen PCR sonuçlarına göre 359 F-781R(a) primeriyle çoğaltılan DNA silik bir bant oluştururken, 359 F-781R(b) primeriyle çoğaltılan DNA belirgin bir bantlaşma göstermiştir.



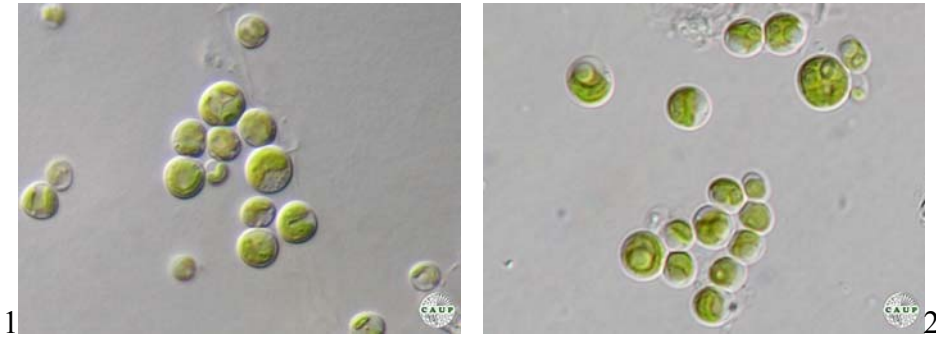
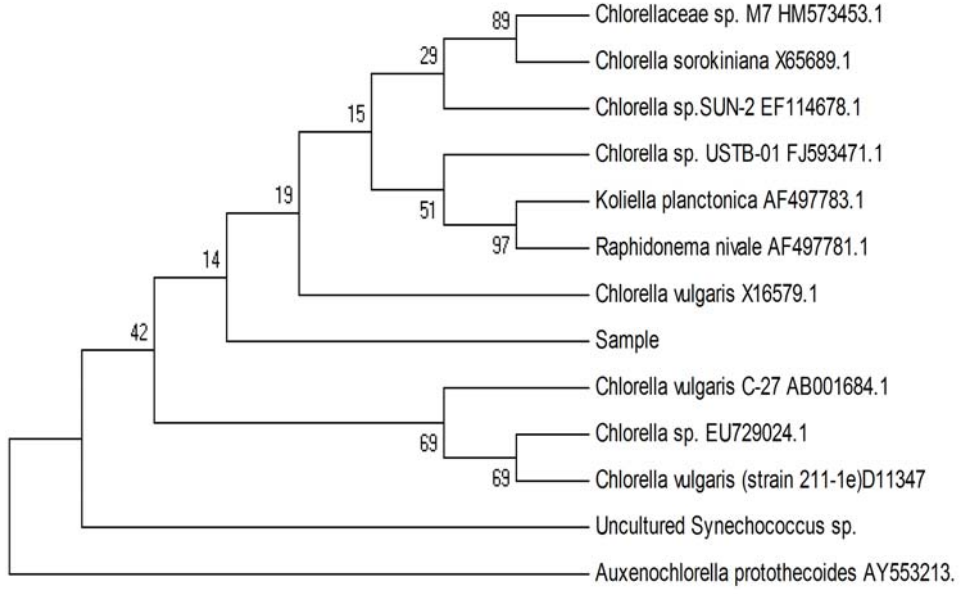
Şekil 4.2: PCR sonuçları

Dizi analizi sonuçları NCBI-Blast programından yararlanılarak yapılmış, ileri ve geri primer yönleri ayrı ayrı okutularak karşılaştırmalı olarak sonuçlar verilmiştir. 359F-781R (a) *Auxenochlorella protothecoides* 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast, AY553213.1; türüne maksimum %90 benzerlik göstermiştir.

359F-781R (b) *Chlorella sorokiniana* plastid DNA small subunit (16S-like) ribosomal RNA, X65689.1; türüne maksimum %97 benzerlik göstermiştir. Dizi analizi sonuçları tablo halinde Çizelge 4.1' de verilmiştir.

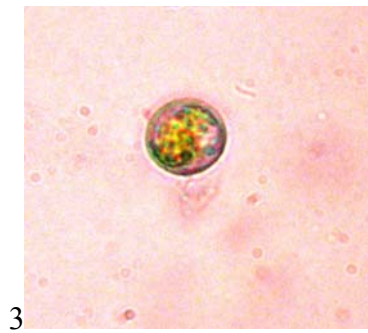
Çizelge 4.1: 359F-781R için dizi analizi sonuçları

Primerler	Organizma Adı	Maksimum Tanılama
359F-781R	<i>Chlorella sorokiniana</i> plastid DNA small subunit (16S-like) ribosomal RNA	%97
359F-781R	<i>Chlorellaceae</i> sp. M7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; plastid	%97
359F-781R	<i>Auxenochlorella protothecoides</i> 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	%90
359F-781R	<i>Chlorella vulgaris</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast gene for chloroplast product	%88
359F-781R	<i>Chlorella pyrenoidosa</i> 16S rRNA gene CS12 region, strain IAM C-210	%84

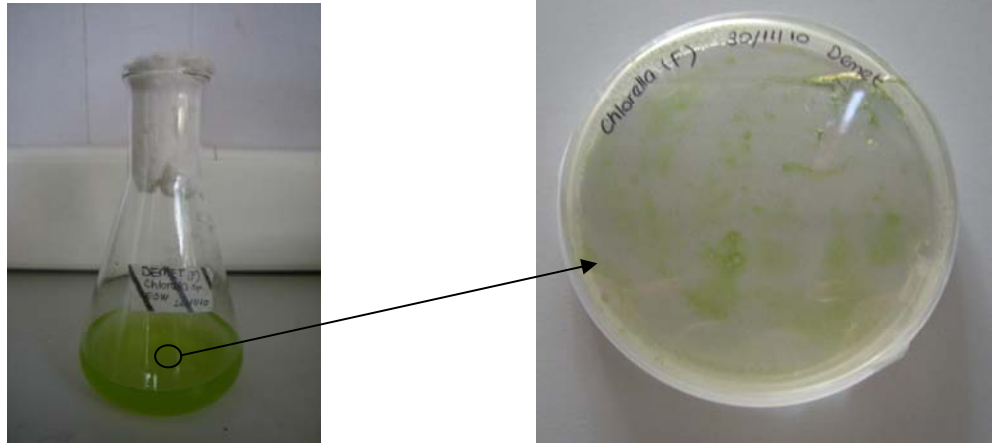


<http://botany.natur.cuni.cz>

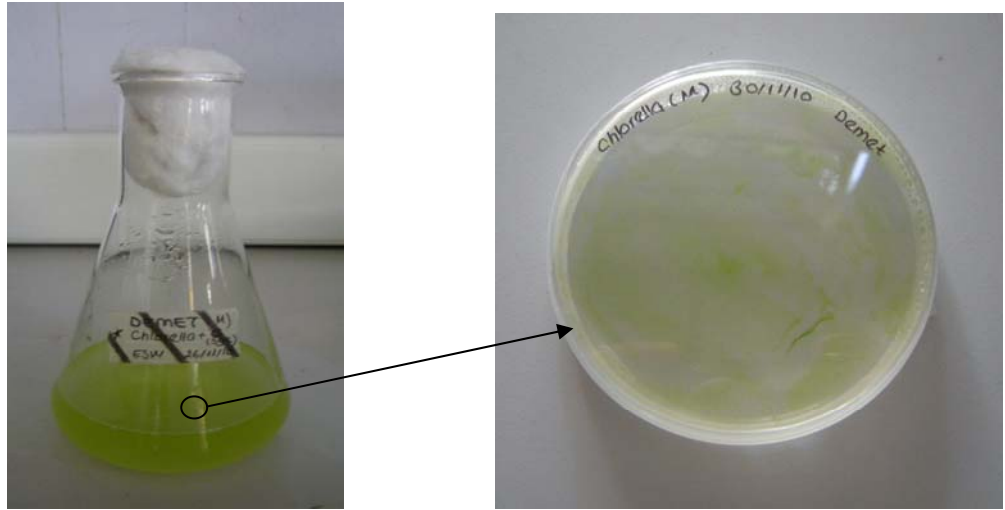
<http://botany.natur.cuni.cz>



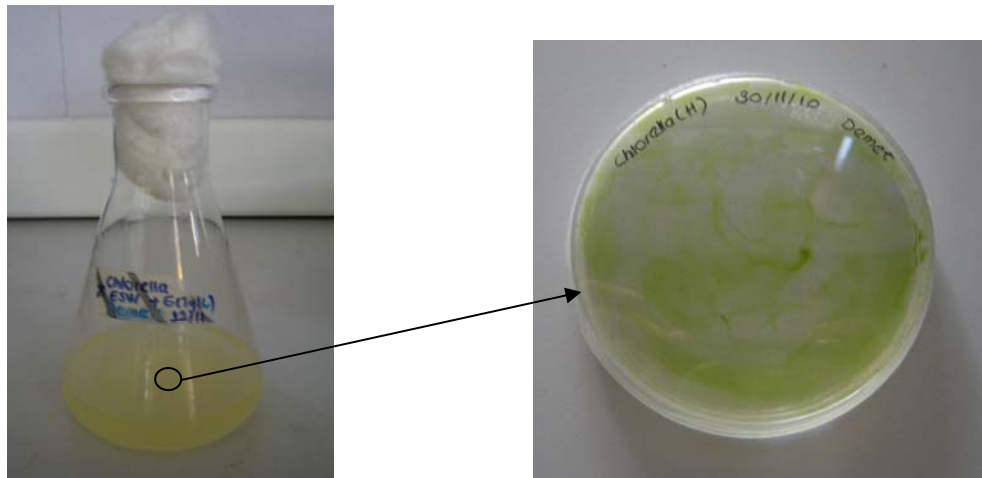
Şekil 4.3: 1, *Auxenochlorella protothecoides*; 2, *Chlorella sorokiniana*; 3, Gümüldür *Chlorella* sp. fotoğrafları (1600×)



Şekil 4.4. Fototrofik üretimi yapılan *Chlorella sp.* ve akseniklik kontrolü

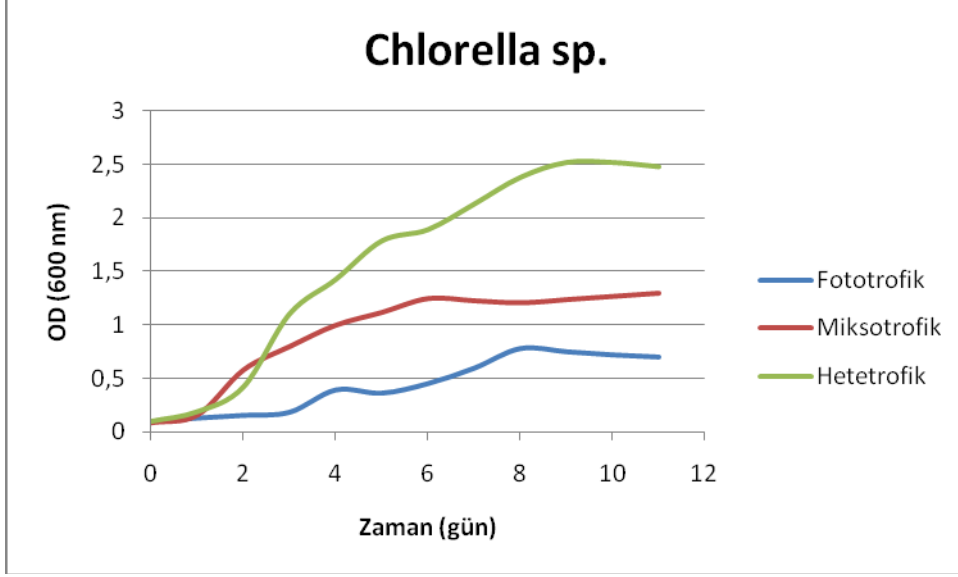


Şekil 4.5: Miksotrofik üretimi yapılan *Chlorella sp.* ve akseniklik kontrolü



Şekil 4.6: Heterotrofik üretimi yapılan *Chlorella sp.* ve akseniklik kontrolü

Şekil 4.7’ de 25°C sıcaklık koşullarındaki *Chlorella sp.*’ nin optik yoğunluk sonuçları yer almaktadır. *Chlorella sp.*’ nin optik yoğunluğu 600 nm’ de ölçülmüştür.



Şekil 4.7: *Chlorella sp.* için 25°C’ de ve 600 nm’ deki optik yoğunluk sonuçları

Çizelge 4.2: Fototrofik, miksotrofik ve heterotrofik üretimi yapılan *Chlorella sp.*’ nin spesifik büyüme hızı (μ değeri) ve ikilenme süreleri

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

Yapılan deneylerin sonuçlarına göre, fototrofik, miksotrofik ve heterotrofik üretim açısından maksimum büyümenin 8. gün olduğu bulunmuştur. Akselik *Chlorella sp.*’ nin farklı üretim yöntemleri karşılaştırıldığında en iyi üretim yönteminin (Şekil 4.7) heterotrofik üretim yöntemi olduğu belirlenmiştir. *Chlorella vulgaris*’ in fototrofik üretimi sonucu elde edilen maksimum kuru ağırlık $0,19 \text{ g/L}^{-1}$ olarak belirlenmiştir (Bulut, 2009). Başka bir çalışmaya göre heterotrofik olarak üretilen; *Chlorella sorokiniana*’ dan $1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, *Nitzschia alba*’

dan $0,8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, *Arthrospira sp.*' dan $1,2 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ biyomas elde edilmiştir (<http://www.algae.wur.nl>). Fototrofik *Chlorella sp.*' den elde edilen biyomas ($0,19 \text{ g L}^{-1}$) ve spesifik büyüme hızı ($0,78 \text{ gün}^{-1}$), mikсотrofik *Chlorella sp.*' den elde edilen biyomas ($0,31 \text{ g L}^{-1}$) ve ve spesifik büyüme hızı ($1,3 \text{ gün}^{-1}$), heterotrofik *Chlorella sp.*' den elde edilen biyomas ($0,6 \text{ g L}^{-1}$) ve ve spesifik büyüme hızı ($2,52 \text{ gün}^{-1}$) olarak belirlenmiştir. Bu araştırma sonuçlarına göre *Chlorella sp.* heterotrofik üretim potansiyeline sahiptir.

5. ÖNERİLER

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

Heterotrofik üreme potansiyeli yüksek yerel bir izolat olan *Chorella sp.*'nin başka çalışmalara kaynak olması açısından izolasyonu yapılmıştır. Bu türün kültür koleksiyonuna dahil edilmesiyle de farklı çalışmalarda kullanılması planlanmaktadır. Ayrıca hedeflenen üretim yöntemleri için koşulların değiştirilmesiyle optimizasyonları sağlanabilir. Çeşitli yöntemler kullanılarak birçok türün aksenik izolasyonu yapılabilir. Başka yerel izolatların heterotrofik üretim potansiyellerinin araştırılması ve farklı sektörlere kaynak oluşturması da büyük önem taşımaktadır. Dünyanın %70' nin denizlerle kaplı olduğu düşünülecek olursa, bu kaynaklarda yaşayan alglerden faydalanmak oldukça önemlidir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Becker, E. W.**, 1995, *Microalgae biotechnology and microbiology*, Cambridge University press, 293p.
- Beijerinck, M. W.**, 1890, Kulturversuche mit Zoochlorellen, Lichenogoniden und anderen niederen Algen, *Bot. Ztg.* 48: 725-739; 741-754; 757-768; 781-785pp.
- Beijerinck, M. W.**, 1893, Bericht über meine Kulturen niederer Algen auf Nährgelatine. *Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde*, 13 (11/12): 368-373pp.
- Berland, B. R. and Maestrini, S. Y.**, 1969, Action de quelques antibiotiques sur le development de cinq diatomees en culture, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 3:62-75pp.
- Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J.**, 1992, *Microalgal biotechnology*, Cambridge University press, Cambridge, 477p.
- Borowitzka, M.A.**, 1995, *J. Appl. Phyol.*, 7, 509-520pp.
- Bulut, Y.**, *Chlorella*'da (*Clorophyceae*) yağ miktarını arttırma olanaklarının araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniv. Fen Bil. Ens., 62s.
- Chen, F.**, 1996, High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth, *Trends in Biotechnology*. 14, 421-426pp.
- Chen, F. & Johns M. R.**, 1991, Effect of C/N ratio and aeration on the fatty acid composition of heterotrophic *Chlorella sorokiniana*, *Journal of Applied Phycology*. 3: 203-209pp.
- Chen, F. & Johns, M.R.**, 1996, Heterotrophic Growth of *Chlamydomonas reinhardtii* on Acetate in Chemostat Culture, *Process biochemistry.*, 31;6, 601-604pp.
- Chen, G.Q., Jiang, Y. and Chen, F.**, 2007, Fatty acid and lipid class composition of the eicosapentaenoic acid-producing microalga, *Nitzschia laevis*, *Food Chemistry*, 104, 1580-1585pp.
- Chodat, M.**, 1904, Cultures pures d'algues vertes, de Cyanophycées et de Diatomacées. *Archives des Sciences Physiques et Naturelles*. 18(8): 368p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cirik, S. ve Gökpinar, Ş.**,1993, Plankton Bilgisi ve Kültürü, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları No:47, 274s., İzmir.
- Contrell, M. T. and Suttle, C. A.**, 1993, Production of axenic cultures of *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae) using antibiotics, *J. Phycol.*, 29:385-7.
- Day, J.D., Edwards, A.P. and Rogers, G.A.**, 1991, Bioresource Technol., 38, 245-249pp.
- de Swaaf, M. E., Pronk, J. C. and Sijtsma, L.**, 2003a, Fed-batch cultivation of the docosahexaenoic acid producing marine alga *Cryptocodinium cohnii* on ethanol, *Appl Microbiol Biotechnol*, 61:40–43pp.
- de Swaaf, M. E., Sijtsma, L. and Pronk, J. C.**, 2003b, High-cell-density fed-batch cultivation of the docosahexaenoic acid producing marine alga *Cryptocodinium cohnii*, *Biotechnol Bioeng*, 81:666–672pp.
- Demirel, G. ve Özpınar, H.**, 2003, Yosunlar ve Hayvan Beslemede Kullanımları, Uludag Univ., J. Fac. Vet. Med. 22, 1-2-3: 103-108s.
- Divan, C. L. and Schnoes, H. K.**, 1982, Production of *Gonyaulax* cultures by treatment with antibiotics, *Applied and Environmental Microbiology*, 250-254pp.
- Droop, M. R.**, 1967, A procedure for routine purification of algal cultures with antibiotics, *Br. Phycol. Bull.*, 3:295-7.
- Droop, M. R.**, 1974, Heterotrophy of carbon, In *Algal Physiology and Biochemistry*, Edited by Stewart, W.D.P., Blackwell Scientific Publ., Oxford, 530-559pp.
- Dzurica, S., Lee, C., Cosper, E. M. and Carpenter, E. J.**, 1989, Role of environmental variables, specifically organic compounds and micronutrients, in the growth of the chrysophyte *Aureococcus anophagefferens*, In: Cosper, E. M., Bricelj, V. M., and Carpenter, E. J., eds., *Novel Phytoplankton Blooms*, Springer-Verlag, Vienna, 229-52pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Eriksen, N.T.**, 2008, The technology of microalgal culturing, *Biotechnol Lett*, 30: 1525-1536pp.
- Godzwiz-Shelubsky, M.**, 1951, The use of antibiotic substances for obtaining monoalgal bacteria-free cultures, *Palestine J. Bot. (Jerusalem)* 5: 129-131pp.
- Graverholt, O. S. and Eriksen, N. T.**, 2007, Heterotrophic high cell-density fed-batch and continuous flow cultures of *Galdieria sulphuraria* and production of phycocyanin, *Appl Microbiol Biotechnol*, 77:69–75pp.
- Guillard, R. R. L.**, 1973, Methods for microflagellates and nannoplankton, In: Stein, J. R., ed. *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*, Cambridge University Press, Cambridge, 69-85pp.
- Guillard, R.R.L. and Keller, M.**, 1984, Culturing dinoflagellates, In: Spector, D. L., ed. *Dinoflagellates*, Academic Press, New York, 391-442pp.
- Guillard, R.R.L. and Morton, S.L.**, 2003, Culture methods, In: Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M., and Cembella, A. D., eds., *Manual on Harmful Marine Microalgae*, UNESCO, Paris, 77-97pp.
- Guillard, R. R. L.**, 2004, Purification methods for microalgae, In: Anderson, A. R., *Algal culturing techniques: Phycological Society of America*, Elsevier Academic Press, 117-131pp.
- Güner, H. ve Aysel, V.**, 1991, Tohumuz Bitkiler Sistematigi, Ege Üni. Fen Fak. Kitaplar Serisi No:108.
- Hilaly, A. K., Karim, M. N. and Guyre, D.**, 1994, *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 314-320pp.
- Hoshaw, R. W. and Rosowski, J. R.**, 1973, Methods for microscopic algae, In: Stein, J. R., ed. *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*, Cambridge University Press, Cambridge, 53-68pp.
- Jiang, Y., Fan, K.W., Wong, R.T.Z. and Chen, Y.**, 2004, Fatty Acid Composition and Squalene Content of the Marine Microalga *Schizochytrium mangrovei*, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 1196-1200pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jones, A. K., Rhodes, M. E. and Evans, S. C.**, 1973, The use of antibiotics to obtain axenic cultures of algae, *Br. Phycol. J.*, 8:185-9.
- Kaba, N. ve Çağlak, E.**, 2006, Deniz Alglerinin İnsan Beslenmesinde Kullanılması, *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 243-246pp.
- Kawaguchi, K.**, 1980, in *Algae Biomass* (Shelef, G. and Soeder, C. J., eds), North-Holland Biomedical Press, 25-33pp.
- Klebs. G.**, 1896, Die Bedingungen der Fortpflanzung bei einigen Algen und Pilzen, G. Fischer, Jena., 543 pp.
- Lee, Y.K.**, 1997, Commercial production of microalgae in the Asia-Pacific rim., *J. Appl. Phycol.*, 9: 403-411pp.
- Lee, Y.K.**, 2001, Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential, *Journal of Applied Phycology*, 13: 307-315pp.
- Lehman, J. T.**, 1976, Ecological and nutritional studies on *Dinobryon* Ehrenb.: Seasonal periodicity and the phosphate toxicity problem, *Limnol. Oceanogr.*, 21:646-58pp.
- León, C., Kumazawa, S. and Mitsui, A.**, 1986, Cyclic appearance of aerobic nitrogenase activity during synchronous growth of unicellular cyanobacteria, *Curr. Microbiol.*, 13:149-53pp.
- Lewin, R. A.**, 1959, The isolation of algae, *Rev. Algol. (new series)* 3: 181-197pp.
- McLachlan, J.**, 1973, Growth media marine, *In Stein, J.R (ed.) Culture Methods & Growth Measurements*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 25-51pp.
- Miquel, P.**, 1890/92d, De la culture artificielle des diatomées. Cultures pures des diatomées, *Le Diatomiste* 1: 149-156pp.
- Ogbonna, J. C., Tomiyama, S. and Tanaka H.**, 1998, Heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* Z for efficient production of a-tocopherol, *J. Appl Phycol*, 10:67-74pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Oppenheimer, C. H.**, 1955, The effect of bacteria on the development and hatching of pelagic fish eggs, and the control of such bacteria by antibiotics, *Copeia.*, 1955:43-9pp.
- Pringsheim, E.G.**, 1946, Pure Cultures of Algae, Cambridge University Press, London, 119pp.
- Provasoli, L., Pintner, I. and Packer, L.**, 1951, Use of antibiotics in obtaining pure cultures of algae and protozoa, Proc. Am. Soc. Protozoologists. 2: 6p.
- Provasoli, L.**, 1963, Growing marine seaweeds, 9-17pp., *In* De Virville, A.D. and Feldmann, J. (eds.) *Proc. 4th Internatl. Seaweed Symp.* Pergamon Press, Oxford.
- Provasoli, L.**, 1968, Media and prospects for the cultivation of marine algae, 63-75pp. *In* Watanabe, A. and Hattori, A. (Eds.) Cultures and Collections of Algae, Proc. U.S.-Japan Conf. Hakone, Japan, September 1966, Publ. by the Jap. Soc. Plant Physiol.
- Radmer, R.J. and Fisher, T. C.**, 1996, in Abstracts of the 7th International Conference, *International Association of Applied Algology*, Knysna, South Africa, 60p.
- Reich, K. and Kahn, J.**, 1951, A bacteria-free culture of *Prymnesium parvum* (Chrysoomonadina), Bull. Res. Council Israel, 4: 144-149pp.
- Repak, A. J., Provasoli, L. and Pintner, I. J.**, 1982, Tailor-made antibiotic mixes form marine ultraplankton, *J. Protozool.*, 29:291pp.
- Sasson, A.**, 1997, Microalgal biotechnologies: Recent developments and prospects for developing countries, Biotec Publication, 1, 76p.
- Schmidt, R.A., Wiebe, M.G. and Eriksen, N.T.**, 2005, Heterotrophic high cell-density fed-batch cultures of the phycocyanin producing red alga *Galdieria sulphuraria*, *Biotechnol Bioeng*, 90:77–84pp.
- Shirai, M., et al.**, 1989, Development of a solid medium for growth and isolation of axenic *Microcystis* strains (cyanobacteria), *Appl. Environ. Microbiol.*, 55:2569-71pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shephard, D. C.**, 1970, Axenic culture of *Acetabularia* in a synthetic medium, In: Prescott, D. M., ed *Methods in Cell Physiology*, Vol. 4. Academic Press, New York, 49-69pp.
- Spencer, C. P.**, 1952, On the use of antibiotics for isolating bacteria-free cultures of marine phytoplankton organisms, *J. Mar. Biol. Ass.*, U.K., 31:97-106pp.
- Sukatar, A.**, 2002, Alg kültür yöntemleri, Ege Üniversitesi Yayınları, 184, İzmir, 168s..
- Watanabe, M.M., Suda, S., Kasai, F. and Sawaguchi, T.**, 1985, Axenic cultures of three species of *Microcystis* (Cyanophyta=Cyanobacteria), *Bull. Jap. Fed. Culture Coll.*, 1: 57-63pp.
- Watanabe, Y. and Hall, D.O.**, 1996, Photosynthetic CO₂ conversion technologies using a photobioreactor incorporating microalgae energy and material balances, *Energy Convers. Mgnt.*, 37: 1321-1326pp.
- Watanabe, M.M.**, 2004, Freshwater Culture Media, In: Anderson, A. R., *Algal culturing techniques: Pycological Society of America*, Elsevier Academic Press, 13-20pp.
- Wen, Z.Y. and Chen, F.**, 2001, A perfusion-cell bleeding culture strategy for enhancing the productivity of eicosapentanoic acid by *Nitzchia laevis*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 57: 316–322pp.
- Wen, Z.Y. and Chen, F.**, 2003, Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae, *Biotechnol Adv*, 21:273–294pp.
- Wu, Z.Y., Shi, C.L. and Shi, X.M.**, 2007, Modelling of lutein production by heterotrophic *Chlorella* in batch and fedbatch cultures, *World J Microbiol Biotechnol*, 23: 1233–1238pp.
- Xiong, W., Li, X., Xiang, J. and Wu, Q.**, 2008, High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production, *Appl Microbiol Biotechnol*, 78: 29–36pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vance, B. D.**, 1966, Sensitivity of *Microcystis aeruginosa* and other blue-green algae and associated bacteria to selected antibiotics, *J. Phycol.*, 2, 125-128pp.
- Vazhappilly, R. and Chen, F.**, 1998, Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid Production Potential of Microalgae and Their Heterotrophic Growth, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75, 3, 393-397pp.
- Vonshak, A. and Torzillo, G.**, 2004, Applied course on production and monitoring of microalgal growth, handbook (07-11 Haziran İzmir/Türkiye).
- <http://www.egc.com/illumination.html>
- <http://ccmp.bigelow.org>
- <http://www.marine.csiro.au>
- <http://www.suyla.com>
- <http://botany.natur.cuni.cz>
- <http://course1.winona.edu/sberg/ILLUST/Chlorella.JPG>
- <http://www.algae.wur.nl>

ÖZGEÇMİŞ

Döndü YALÇIN BİNGÜL 1986 yılında Denizli' nin Buldan ilçesinde doğmuştur. Lise eğitimini 2004 yılında Buldan Akın Lisesin' de (Y.D.A.L.) tamamlamıştır. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Biyoloji Bölümden Biyolog ünvanı alarak 2008 yılında mezun olmuştur. 2008 yılında Ege Üniversitesi Biyoteknoloji Bölümü' nde yüksek lisans eğitimine başlamıştır.