

TATLI SU VE TOPRAKTAN İZOLE EDİLMİŞ
MİKROALGLERİN BİYİYAKIT ÜRETİMİ
İÇİN KARAKTERİZASYONU

Yüksek Lisans Tezi
Zeyneb Merve ÜNVER
Eskişehir, 2017

TATLI SU VE TOPRAKTAN İZOLE EDİLMİŞ MİKROALGLERİN BİYOYAKIT
ÜRETİMİ İÇİN KARAKTERİZASYONU

Zeyneb Merve ÜNVER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ümran Tezcan ÜN

(İkinci Danışman: Prof. Dr. Tahir ATICI)

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Aralık, 2017

Bu Tez Çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1610F672 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Zeyneb Merve ÜNVER'in "Tatlı Su Ve Toprakta İzole Edilmiş Mikroalglerin Biyoyakıt Üretimi İçin Karakterizasyonu" başlıklı tezi 15/12/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Çevre Bilimleri Anabilim dalında Yüksek Lisans/Doktora/Sanatta Yeterlik tezi olarak kabul edilmiştir.

Unvanı-Adı Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) : Prof. Dr. Ümran Tezcan Ün
Üye : Prof. Dr. Tahir Atıcı
Üye : Yard. Doç. Dr. Filiz Bayrakçı Karel
Üye : Prof. Dr. Cansu Filik İşçen
Üye : Prof. Dr. Funda Ateş

	Enstitü Müdürü

ÖZET

TATLI SU VE TOPRAKTAN İZOLE EDİLMİŞ MİKROALGLERİN BİYOYAKIT ÜRETİMİ İÇİN KARAKTERİZASYONU

Zeyneb Merve ÜNVER

Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aralık, 2017

Danışman: Prof. Dr. Ümran Tezcan ÜN

(İkinci Danışman: Prof. Dr. Tahir ATICI)

Algler fotosentez yapabilme kabiliyetleri sayesinde dünyadaki oksijen döngüsünde önemli bir rol oynamaktadır. Ökaryot ve prokaryot mikroalgler de fotosentez yaparak bu döngüye katkı sağlamaktadırlar. Mikroalgler fotosentez yapmalarının yanı sıra biyoyakıt üretebilecek potansiyele de sahiptir. İçerdikleri yağ çeşitli yöntemlerle biyodizele dönüştürülerek yakıt elde edilmektedir. Türlerin yaşadığı su ortamının besin değerleri, ışık miktarı, sıcaklık ve pH değerleri tür gelişimini etkilemektedir. *Chlorella* sp. türleri pek çok çalışmada farklı parametrelerle biyoyakıt üretimi konusunda incelenmiştir. Bu çalışmada farklı olarak iki siyanobakteri türü olan *Synechocystis* sp. ve *Chroococcus* sp. ile iki mikroalg olan *Chlorella* sp. ve *Scenedesmus* sp. türleri üzerinde çalışılmıştır. Folch yöntemiyle yapılan yağ analizi sonucunda 500 lüks ışıkta 45 günlük inkübasyon süresi boyunca siyanobakterilerde *Synechocystis* sp. türünün %18,90, mikroalglerde *Chlorella* sp. türünün %16,85 en yüksek yağ içeriğine sahip olduğu bulunmuştur.

Anahtar Sözcükler: Mikroalg, *Chlorella*, Biyoyakıt, *Synechocystis*.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF ISOLATED MICROALGAE FROM FRESH WATER AND SOIL FOR BIOFUEL PRODUCTION

Zeyneb Merve ÜVER

Department of Environmental Engineering

Anadolu University, Institute of Science, November, 2017

Supervisor: Prof. Dr. Ümran Tezcan ÜN

(Second Supervisor: Prof. Dr. Tahir ATICI)

Algae play an important role in the oxygen cycle in the world thanks to their ability to perform photosynthesis. Eukaryotic and prokaryotic microalgae also contribute to this cycle by photosynthesis. Microalgae have the potential to produce biofuels as well as photosynthesis. The oil they contain is converted into biodiesel by various methods and fuel is obtained. The nutrient values, the amount of light, temperature and pH values of the water environment inhabiting the species affect the species development. *Chlorella* sp. have been studied in various studies on biofuel production with different parameters. In this study, two different cyanobacterial species, *Synechocystis* sp. and *Chroococcus* sp. with two microalgae, *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. species. As a result of Folch oil analysis, it was found that *Synechocystis* sp. 18,90% in the cyanobacteria and *Chlorella* sp. 16,85% in the microalgae during the 45 days incubation period in 500 lux light.

Keywords: Microalgae, *Chlorella*, Biofuels, *Synechocystis*.

ÖNSÖZ

Tüm eğitim hayatımda benden desteğini esirgemeyen sevdiklerime ve aileme, bana kattığı tecrübelerden dolayı öğretmenlerim Prof. Dr. Ümran Tezcan ÜN ve Prof. Dr. Tahir ATICI'ya, laboratuvar çalışmalarında ve tezimde desteğini esirgemeyen arkadaşım Masoud DERAKHSHANDEH'e teşekkür ediyorum.

Zeyneb Merve Ünver

..../..../20....

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalardan bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmamın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Zeyneb Merve ÜNVER

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. MİKROALGLER.....	5
2.1. Mikroalglerin Tanımı	5
2.2. Mikroalglerin Geçmişi	6
2.3. Siyanobakteriler	7
2.3.1. Tanım	7
2.3.2. Siyanobakterilerin Fotosentez Sistemi	7
2.3.3. Siyanobakterilerin Geçmişi	10
2.3.4. Siyanobakteriyel Azot Fiksasyonu.....	12
2.3.5. Siyanobakteriyel Karbondioksit Fiksasyonu	13
2.3.6. Siyanobakterilerin Genom Özellikleri.....	13
2.3.6.1 Genom Dizisi Belirleme Yöntemleri.....	14
2.3.6.2 Siyanobakteriyel Tür Ağı.....	15
2.3.7. Siyanobakterilerin Moleküler Ekolojisi	18
2.3.8. Siyanobakterilerin Kullanım Alanları.....	20
2.3.9. Siyanobakteriler Tarafından Üretilen Toksinler	21
3. MİKROALGLERİN BİYYOYAKIT ÜRETİMİNDE KULLANILMASI.....	24

3.1 Biyohidrojen Üretimi.....	24
3.2. Biyoetanol Üretimi.....	25
3.3. Biyodizel Üretimi.....	28
3.4. Konuyla İlgili Yapılmış Çalışmalar.....	31
3.4.1. Biyoyakıt Üretimi Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	31
3.4.2. Farklı Biyoyakıt Üretim Yöntemleri ve Hammaddeleri Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	32
3.4.3. Mikroalglerin Biyoyakıt Üretiminde Kullanılması Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	33
4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	35
4.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	35
4.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	35
4.3. Numune Alımı.....	36
4.4. Mikroalg Türlerinin Ekimi.....	38
4.5. Mikroalg Türlerinin İzolasyonu ve Tanımlanması.....	40
4.6. Büyüme Eğrisinin Oluşturulması.....	41
4.7. Büyük Hacimde Ekim.....	42
4.8. Biyokütlenin Yağ İçeriği Analizi.....	43
4.8.1 Folch Yöntemi.....	44
4.9. Biyokütlenin Karbonhidrat İçeriği Analizi.....	45
4.10. Biyokütlenin Elementel Analizi.....	46
4.11. Biyokütlenin Protein İçeriği Analizi.....	46
4.12. DNA Dizi Analizi ve PCR Analizleri.....	47
5. BULGULAR VE YORUM.....	50
5.1. İzolasyon Bulguları.....	50
5.2. Tanımlama Bulguları.....	50
5.3. Büyüme Eğrisi Bulguları.....	51
5.4. Büyük Hacimde Ekim Bulguları.....	55
5.5. Yağ İçeriği Analizi Bulguları.....	58

5.6. Karbonhidrat İçeriği Analizi Bulguları.....	59
5.7. Elementel Analizi Bulguları.....	60
5.8. Protein İçeriği Hesaplaması Bulguları.....	63
5.9. Tür Seçimi ve Yorumlamaları.....	63
5.10 DNA Analizi Yorumları.....	64
6. SONUÇ, TARTIŞMA ve ÖNERİLER.....	75
KAYNAKÇA	77
EKLER	
ÖZGEÇMİŐ	

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 1.1. 2011 yılında ülkelerin milyar litre bazında biyoyakıt üretimleri... 2	2
Çizelge 1.2. Yağ içeriğine göre biyoyakıt üretiminde kullanılan ürünler.....3	3
Çizelge 2.1. Bazı mikroalglerin biyokimyasal içerik yüzdeleri.....5	5
Çizelge 2.2. Alg ürünlerinin ticari uygulaması.....6	6
Çizelge 4.1. Çalışmalarda kullanılan kimyasallar.....35	35
Çizelge 4.2. BG11 besiyeri39	39
Çizelge 4.3. Johnson besiyeri39	39
Çizelge 4.4. BBM besiyeri40	40
Çizelge 5.1. 685 nm’de 5 türün büyüme grafiği52	52
Çizelge 5.2. Farklı koşullarda büyütülen <i>Synechocystis</i> türünün spektrofotometre okumaları56	56
Çizelge 5.3. Karbonhidrat analizi absorpsiyon değerleri.....59	59
Çizelge 5.4. 5 türün yüzde kütlece elementel analiz sonuçları (alındığı gibi)60	60
Çizelge 5.5. Protein içeriği tespiti63	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Dünyada 2011 yılı birincil enerji kullanımı.....	2
Şekil 2.1. Siyanobakterilerin fotosentez sistemi.....	9
Şekil 2.2. Moleküler dizi karşılaştırmasına dayalı siyanobakterilerin filogenik ilişkisi.....	11
Şekil 2.3. Siyanobakteri grupları.....	12
Şekil 2.4. Geniş siyanobakteriyel tür ağı	16
Şekil 2.5. Detaylı siyanobakteriyel tür ağı	16
Şekil 2.6. <i>Synechococcus</i> türünün filogenisi	17
Şekil 4.1. Sıvı numune alım noktası	36
Şekil 4.2. Sıvı numune alım noktasının uydu görüntüsü	37
Şekil 4.3. Katı numune alım noktası	37
Şekil 4.4. Katı numune akım noktası uydu görüntüsü	38
Şekil 4.5. Kılcal pipetle tek tür izolasyonu	41
Şekil 4.6. Katı besiyerinde çizgi ekimi.....	41
Şekil 4.7. Türlerin spektrofotometrede okunması.....	42
Şekil 4.8. Büyük hacimli ekim.....	43
Şekil 4.9. Yağ analizi sırasında 5 türdeki faz oluşumu	44
Şekil 4.10. Yağ analizi sonunda kurutulmak üzere folyolara dökülen türler.....	45
Şekil 4.11. Fenol-sülfirik asit ilavesi ile renk gelişimi	45
Şekil 4.12. Santrifüj öncesi ve sonrası <i>Synechocystis</i> türü.....	46
Şekil 4.13. Elementel analiz için türlerin etüvde kurutulması.....	46
Şekil 4.14. PCR döngülerinin sayısına karşı taban çizgisinden çıkartılan floresanı gösteren amplifikasyon grafiği.....	48
Şekil 5.1. Besiyerlerine ekim yapılan kültürler.....	50
Şekil 5.2. İzolasyon öncesi karışık kültürler.....	50
Şekil 5.3. Türlerin izolasyon sonrası mikroskop görüntüleri.....	51
Şekil 5.4. <i>Scenedesmus</i> büyüme grafiği	53
Şekil 5.5. <i>Chlorella 1</i> büyüme grafiği	53
Şekil 5.6. <i>Chroococcus</i> büyüme grafiği	54

Şekil 5.7. <i>Chlorella 2</i> büyüme grafiği	54
Şekil 5.8. <i>Synechocystis</i> büyüme grafiği.....	55
Şekil 5.9. Hava verilen <i>Synechocystis</i> türünün büyüme grafiği	57
Şekil 5.10. Hava verilmeyen <i>Synechocystis</i> türünün büyüme grafiği.....	57
Şekil 5.11. NaHCO ₃ ilavesi yapılan <i>Synechocystis</i> türünün büyüme grafiği.....	58
Şekil 5.12. <i>Synechocystis</i> 'in karşılaştırmalı büyüme grafiği.....	58
Şekil 5.13. Karbonhidrat içeriğini gösteren Kochert grafiği.....	60
Şekil 5.14. <i>Scenedesmus</i> hücre bileşenleri.....	61
Şekil 5.15. <i>Chlorella 1</i> hücre bileşenleri	61
Şekil 5.16. <i>Chroococcus</i> hücre bileşenleri	62
Şekil 5.17. <i>Chlorella 2</i> hücre bileşenleri	62
Şekil 5.18 <i>Synechocystis</i> hücre bileşenleri	63
Şekil 5.19. <i>Scenedesmus</i> kromotogram sonuçları.....	65
Şekil 5.20. <i>Scenedesmus</i> ham veriler.....	66
Şekil 5.21. <i>Chlorella 1</i> kromotogram sonuçları	67
Şekil 5.22. <i>Chlorella 1</i> ham veriler.....	68
Şekil 5.23. <i>Chroococcus</i> kromotogram sonuçları.....	69
Şekil 5.24. <i>Chroococcus</i> ham veriler.....	70
Şekil 5.25. <i>Chlorella 2</i> kromotogram sonuçları.....	71
Şekil 5.26. <i>Chlorella 2</i> ham veriler.....	72
Şekil 5.27. <i>Synechocystis</i> kromotogram sonuçları.....	73
Şekil 5.28. <i>Synechocystis</i> ham veriler.....	74

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

rRNA: Ribozomal-ribonükleik asit

tRNA: Taşıyıcı-ribonükleik asit

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerise Chain Reaction)

ATP: Adenozin Trifosfat (Adenosine Triphosphate)

VOCs: Uçucu Organik Maddeler (Volatile Organic Compounds)

PAH: Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon)

1.GİRİŞ

İklim değişikliği 4,6 milyar yıllık dünya tarihi boyunca var olan bir doğal olay olmasına karşın sanayi devriminden bu yana insanoğlunun doğaya verdiği zararların artması ile insanlığın iklimi etkilediği bir sürece dönüşmüştür. Bundan dolayı Birleşmiş Milletler İklim Değişikliği Çerçeve Sözleşmesi'nde "karşılaştırılabilir bir zaman periyodunda gözlenen doğal iklim değişikliğine ek olarak, doğrudan ya da dolaylı olarak küresel atmosferin bileşimini bozan insan etkinlikleri sonucunda iklimde oluşan bir değişiklik" tanımı kullanılmıştır (Alper ve Anbar, 2008, s. 223).

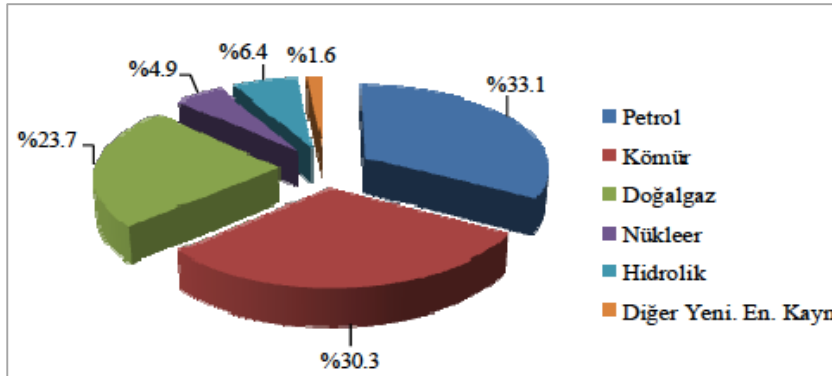
Günümüzde Dünya ısısının yıllık ortalaması yaklaşık 14 santigrattir. Bu değer son buzul devrinde 3-6 °C düşmüş, buzul yüzey alanı artmış ve doğal yaşama olanak sağlayan kara parçası küçülmüştür. Eğer son buzul çağındaki ısı düşüşü günümüzde artışa dönüşürse kutup buz kapakları yok olacak, deniz seviyesi 20-30 metre arasında yükselecektir (Wedding, 1968).

Mevcut durumda iklim değişikliğinin başlıca sebebi "sanayi devriminden beri, özellikle fosil yakıtların yakılması, ormansızlaşma, tarımsal etkinlikler ve sanayi süreçleri gibi çeşitli insan etkinlikleri ile atmosfere salınan sera gazlarının atmosferdeki birikimlerindeki hızlı artışa bağlı olarak, şehirleşmenin de katkısıyla doğal sera etkisinin kuvvetlenmesi sonucunda, yeryüzünde ve atmosferin alt katmanlarında saptanan sıcaklık artışı" şeklinde tanımlanabilir (Türkeş, 2008; Türkeş, 2012).

İklim değişikliğinin başlıca nedeni sanayi devriminden bu yana petrol, kömür ve doğal gaz gibi karbon içeriği yüksek fosil yakıtların yakılması ve bunun sonucunda karbondioksit ve diğer sera gazlarının atmosferdeki yoğunluklarının çok önemli miktarda artmasıdır. Bu gazlar dünyaya gelen kısa dalgalı güneş işınlarının yerküreden yansiyarak atmosferi terk etmesini engelleyerek ve bu işınları uzun dalgalı ısı işınları olarak tekrar yerküreye yansıtarak sera etkisi oluşurmaktadır (Aksay vd., 2005).

Çevresel zararlarının yanı sıra fosil yakıtların sonlu birer doğal zenginlik olması nedeniyle bilim dünyası alternatif yakıt arayışına girmiştir. Petrolün 35-40 yıl, doğalgazın 55-60 yıl ve kömürün 140-145 yıl sonra tükeneceği bilim adamları tarafından bildirilmektedir. Mevcut enerji kaynaklarına alternatif yeni ve yenilenebilir enerji kaynakları; hidroelektrik, jeotermal, rüzgar, güneş, dalga, gel-git, okyanus ısısı, hidrojen, biyokütle ve biyogaz enerjisidir (anka Kılıç, 2011, s.94).

Dünyada enerji ihtiyacı çoğunlukla birincil enerji kaynaklarından karşılanmaktadır. Şekil 1.1’de 2011 yılında dünyada birincil enerji kullanımı verilmiştir.



Şekil 1.1. Dünyada 2011 yılı birincil enerji kullanımı (BP Statistical Review of World Energy, 2012. British Petroleum (BP), London, UK.)

Yenilenebilir enerji kaynaklarından olan biyokütle işlenerek biyoetanol, biyodizel ve biyogaz olarak üç yakıt elde edilebilmektedir. Çizelge 1.1’de 2011 yılında ülkelerin biyoyakıt üretimleri verilmiştir.

Çizelge 1.1. 2011 yılında ülkelerin milyar litre bazında biyoyakıt üretimleri (REN21, 2012. Renewables 2012 Global Status Report, Renewables Energy Policy Network for the 21st Century (REN21), Paris, France.)

Ülkeler	Biyoetanol	Biyodizel	Toplam
ABD	54,2	3,2	57,4
Brezilya	21	2,7	23,7
Almanya	0,8	3,2	3,9
Arjantin	0,2	2,8	3
Fransa	1,1	1,6	2,7
Çin	2,1	0,2	2,3
Kanada	1,8	0,2	2
Endonezya	0	1,4	1,4
İspanya	0,5	0,7	1,2
Dünya	86,1	21,4	107

Sera etkisini ve CO₂ emisyonunu azaltmak için biyodizel üretimi ve tüketimi vergiden muaf tutularak desteklenmektedir. Ayrıca biyodizelin sera etkisini dizel yakıtı göre %41 oranında azalttığı bilinmektedir (Chisti, 2007).

Biyodizel üretiminde kullanılan ürünler arasında mikroalglerin hektar başına yağ içeriğinin daha fazla olduğu Çizelge 1.2’de görülmektedir.

Çizelge 1.2. Yağ içeriğine göre biyoyakıt üretiminde kullanılan ürünler (Chisti, 2007)

Ürün	Yağ İçeriği (L/ha)
Mısır	172
Soya	446
Kanola	1190
Jatropha	1892
Hindistan cevizi	2689
Palmiye	5950
Mikroalg (%70 yağ)	136900
Mikroalg (%30 yağ)	58700

Ülkemizin taraf olduğu uluslararası çevre sözleşmelerinden Kyoto Protokolü, Birleşmiş Milletler İklim Değişikliği Çerçeve Sözleşmesi, Birleşmiş Milletler Biyolojik Çeşitlilik Sözleşmesi, Denizlerin Gemiler Tarafından Kirlenmesinin Önlenmesine ait Uluslararası Sözleşme, Kalıcı Organik Kirleticilere İlişkin Stokholm Sözleşmesi, Akdeniz'in Deniz Ortamı ve Kıyı Bölgesinin Korunması Sözleşmesi ve Karadenizin Kirliliğe Karşı Korunması Sözleşmesi uyarınca petrol kullanımının azaltılması önemlidir. Bu sözleşmeler kapsamında petrol yerine alternatif olarak biyoyakıtların kullanımı mümkündür.

2000'li yıllardan sonra dünyada ve ülkemizde hız kazanan biyoyakıt üretiminin hammaddesi genelde tarımsal ürünler ve atık yağlardır. Rüzgar ve güneş enerjisi gibi alternatif enerji kaynaklarına kıyasla biyoyakıt üretiminin daha kolay ayarlanabilen ve depolanan bir yöntem olması ve bunun yanı sıra daha düşük maliyetli ve kolay bir üretim yöntemine sahip olması biyoyakıt üretiminin artmasına katkı sağlamaktadır.

Biyoyakıtlar üç nesil olarak ayrılabilir. Birinci nesil biyoyakıtlar geleneksel yöntem ve teknolojilerin kullanıldığı ve şeker, nişasta, hayvansal yağ veya bitkisel yağ hammaddelerden üretilen yakıtlardır. Birinci nesil biyoyakıtlar hammaddelerinin gıda kaynağı olması ile eleştirilmektedir; gıda stoğunu ve biyoçeşitliliğini tehdit etmemek için üretimine sınır koyulmuştur. Bu sınır ve artan talep ikinci nesil biyoyakıtların üretimine olanak sağlamıştır. İkinci nesil biyoyakıtların hammaddesi gıda amaçlı olarak doğrudan kullanılmayan gıda atıklarıdır. Üretim yöntemi daha karmaşık olsa da ikinci nesil biyoyakıtların sera gazı emisyonunun birinci nesilden daha az olduğu tahmin edilmektedir. Son olarak üçüncü nesil biyoyakıtların hammaddesi ise alglerdir. Alglerin fermentasyonu ile açığa çıkan karbonhidratlardan elde edilmektedir.

Ülkemizde biyoyakıtlar arasında en çok biyodizel üretimi için potansiyel olmasına rağmen yüksek vergiler, denetimler ve hammadde sorunları sektördeki firmaların üretimlerini durdurmalarına neden olmuştur.

Ülkemizde biyodizel ve biyoetanol üreten az sayıda firma bulunmaktadır. Özellikle biyoetanol kullanımının zorunlu olmaması bu sektörün ilerlemesine olanak sağlamamıştır.

Bu çalışmada, fosil yakıtlara alternatif olacak bir biyoyakıt üretimi için kullanılacak mikroalglerin araştırılması ve karakterizasyonu amaçlanmıştır.

2. MİKROALGLER

2.1. Mikroalglerin Tanımı

Algler okyanus, deniz ve nehir gibi su ekosistemlerinden kara ekosistemlerine; çöller gibi sıcak ekosistemlerden kar ve buz gibi soğuk ekosistemlere kadar birçok ekosistemin önemli birer üyesidir. Dünyadaki primer üretimin çoğunluğunu algler sağlamaktadır.

20.000'den fazla mikroalg türünün varlığı tahmin edilmektedir. Ancak sadece 50 mikroalg türünün biyokimyası ve fizyolojisi ayrıntılı bir biçimde çalışılmıştır. Mikroalgler, fotosentez yapabilme kabiliyetine sahip tüm prokaryotik ve ökaryotik mikroorganizmaları içermektedir. Genel olarak mavi-yeşil algler olarak bilinen ve mikroalgler gibi fotosentez yapabilen siyanobakteriler prokaryot mikroalglerdir. Mikroalgler ve siyanobakteriler fitoplanktonu oluştururlar (Sasson, 1997).

Mikroalgler güneş ışığını kullanarak fotosentez yoluyla karbondioksiti yem, yiyecek, biyokimyasal ve potansiyel biyoyakıtlara dönüştürebilirler. Azot fiksasyonu yapabilmeleri sayesinde biyogübre olarak da kullanılmaktadır. Mikroalglerin biyokütlelerinin fermantasyonu ile biyometan, biyokütle yağlarının ekstraksiyonu ve türevlenmesi ile biyodizel üretilebilmektedir (Kaykaç, 2003; Chisti, 2007; Carioca vd., 2009). Mikroalglerden üretimlerin yaklaşık olarak yarısı gıda sanayinde kullanılırken, geri kalan kısmın büyük bir bölümü ilaç ve kozmetik sanayinde kullanılır (Güner ve Aysel, 1999).

Literatürde çalışılmış mikroalglerden bazılarının biyokimyasal içeriği Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Bazı mikroalglerin biyokimyasal içerik yüzdeleri (Carioca vd., 2009)

Türler	Protein	Karbonhidrat	Yağ	Nükleik asit
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-60	10-17	12-14	3-6
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-	1.9	-
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40	-
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22	4-5
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2	-
<i>Spirogyra sp.</i>	6-20	33-64	11-21	-
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6	-
<i>Prummesium parvum</i>	28-45	25-33	22-38	1-2
<i>Tetraselmus maculata</i>	52	15	3	-
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14	-
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9	2-5
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7	3-4.5
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11	5
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-65	25-30	4-7	-

Mikroalgler Çizelge 2.2’de verildiği gibi gıda ve yem üretiminde protein ilavesi olarak; gıda ve kozmetik sanayisinde pigment olarak, tarım sektöründe gübre olarak ve sağlık sektöründe cilt kanseri tedavisinde kullanılmaktadır.

Çizelge 2.2. *Alg ürünlerinin ticari uygulaması (Becker, 1995)*

Gıda	Beslenme yetersizliği yaşayan insanlar için protein ilavesi
Yem	Kümes, küçük ve büyükbaş hayvanlara beslenmeye ek protein ve vitamin ilavesi
Terapötik	Cilt kanserinin tedavisinde β -karoten kullanılmaktadır.
Pigmentler	B-karoten ve fikobilin gıda renklendiricisi olarak kullanılmaktadır. Fikobilinler teşhis kiti, kozmetikte ve analitik ayıraç olarak da kullanılmaktadır.
Kimyasal Kaynak Olarak	Gliserol gıda, içecek, farmasötik, kozmetiklerde kullanılmaktadır. Yağ asitleri, yağlar, steroller, hidrokarbonlar, enzimler, aminoasitler, vitamin C ve E, polisakkaritler ve vakslar iyon değiştirici ve yapıştırıcı olarak kullanılmaktadır.
Yakıtlar	Hidrokarbonlar, hidrojen, metan ve yanabilir yağlar
Diğerleri	Organik gübre, toprak iyileştiricisi, atık arıtımı

2.2. Mikroalglerin Geçmişi

Algler yaklaşık 3,5 milyar yıl önceye dayanan oluşumlarından yararlanılarak tarih boyunca medeniyetler tarafından ilaç ve gıda yapımında kullanılmışlardır (Sukatar, 2002). Algleri M.Ö. 2700’lerde ilk kullanan kişi Kral Shen Nung’tur. M.S. ise Uzak Doğu ülkeleri deniz alglerini tıpta ve beslenmede kullanmışlardır. Öncelikle kozmetik sektöründe pigment olarak, Roma İmparatorluğu Heros ve Virgil zamanında kullanılmıştır (Cirik, 1981).

Alg kültürleri hakkında yayınlanan ilk rapor Ferdinand Cohn’a (1850) aittir. İlk saf mikroalg kültürü hakkındaki rapor mikrobiyolog Beijerinck’in 1890 yılında siyonobakteriler üzerindeki çalışmaları hakkındadır (Andersen, 2005).

Büyük hacimlerde mikroalg üretimi ve biyokütlelerinin farklı amaçlarla kullanımı ilk olarak 1950’li yıllarda Almanya’da başlamıştır. Washington Carnegie Enstitüsü bünyesindeki bilim adamları tarafından çalışmaya devam edilmiştir. Burada amaç *Chlorella* yeşil alginin büyük hacimde gıda için üretimi ve laboratuvar şartlarındaki verimin açık havada da sağlanabilmesi olup bu çalışmalar “*Algal culture from laboratory to pilot plant*” adlı raporda yer almaktadır (Burlew, 1953).

Algler tarihte ilk olarak gübre yapımında en çok Uzak Doğu’da kullanılmıştır. Algler biyoteknoloji endüstrisinde birçok alanda kullanılmaktadır. Özellikle Uzak Doğu ve Güney Asya ülkelerinde öncelikle besin maddesi olarak kullanılırken tıp, eczacılık, kozmetik sanayi ve tarımda da geniş bir kullanım alanı olmuştur (Atay, 1984).

Günümüzde alglerden başlıca agar, karragen ve alginat üretilmektedir. Ayrıca mikroalgler sahip oldukları organik asitler, sakkaritler, proteinler ve vitaminler sayesinde çalışılmaları önem taşımaktadır.

2.3. Siyanobakteriler

2.3.1. Tanım

Siyanobakterler, klorofil-a'ya sahip olan fotosentetik prokaryotlardır. Genellikle su fotosentez sırasında elektron vericidir ve oksijenin yükseltgenmesini sağlar. Yakın zamana kadar siyanobakteriler, fikobilin pigmenti olan fikosiyanini oluşturma yetenekleri ile de karakterize edilmiştir. Bu pigmentin yüksek konsantrasyonunun bazı koşullar altında organizmaların mavimsi rengine yol açtığı için organizmaların yaygın olarak bilinen isimlerinden ikisi siyanobakteriler veya mavi-yeşil alglerdir. Bununla birlikte klorofil-a'ya ek olarak, fikobiline sahip olmayan, ancak klorofil b oluşturan *Prochlorothrix* gibi oksijenle gelişen en azından prokaryotların fikosiyanin içeren organizmalarla oldukça yakından ilişkili olduğu açık bir hale gelmiştir (Tomitani vd., 1999). Moleküler deliller, klorofil b içeren organizmaların birlikte gruplanmasını desteklemediğinden, burada en geniş anlamda siyanobakterlerin üyeleri olarak kabul edilirler (Whitton ve Potts, 2000).

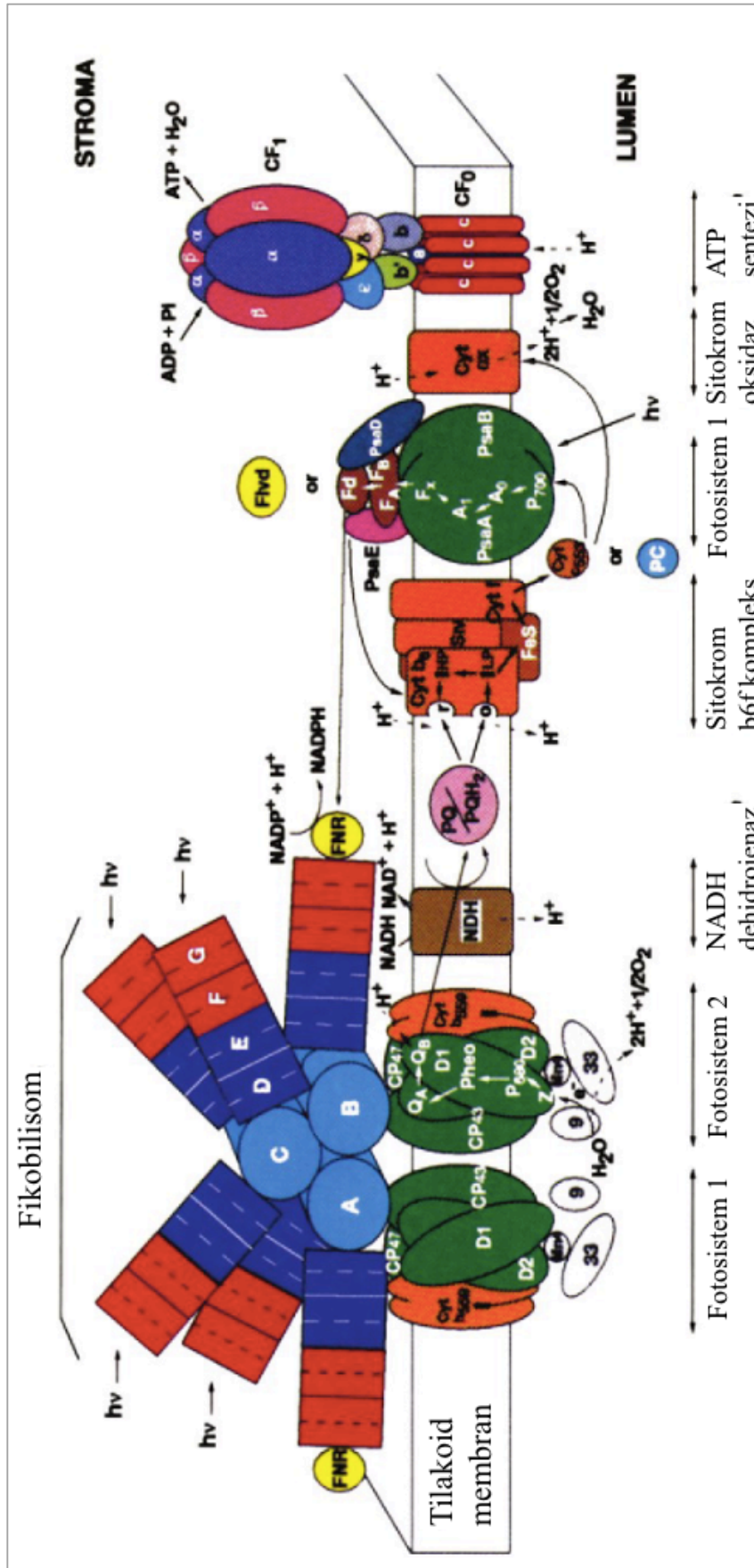
Siyanobakteriler, gezegenimizde şimdiye kadar görülmüş en önemli organizma grubunu teşkil eder. Fotosentezde suyu bir elektron kaynağı olarak kullanma kapasiteleri birincil üretimi, H₂S, H₂ ve Fe⁺² gibi alternatif elektron kaynaklarının dağılımı ve bolluklarının dayattığı sınırları ortadan kaldırmıştır (Kharecha vd., 2005).

Primer üretimi azot fiksasyonuna bağlama yeteneği, okyanusların biyolojik taşıma kapasitesini daha da arttırmıştır (Gruha, 2005).

2.3.2. Siyanobakterilerin Fotosentez Sistemi

Güneşten gelen ışık enerjisinin kimyasal enerjiye dönüştürülmesinin ana süreci oksijenli fotosentezdir. Yeryüzündeki tüm yüksek yaşamı enerjiyle sağlayan süreçtir. Atmosferdeki tüm oksijen 2,8 milyar yıl önce siyanobakterilerin ataları tarafından keşfedilen bu süreçle gelişmiştir. Siyanobakteriler günümüzde küresel ekosistemin önemli üyeleridir ve dünyadaki yıllık oksijen üretiminin %30'una katkıda bulunurlar. Bu bölüm, enerji dönüşümünün ilk adımlarını katalize eden protein kompleksinin yapısını ve fonksiyonunu açıklamaktadır. Işık, anten kompleksleri tarafından yakalanır ve transmembran yük ayrımını katalize eden iki büyük biyofiziksel sistemi, Fotosistem 1 ve 2'ye

aktarılır. Bu, fotosentetik süreci harekete geçirir ve yüksek enerjili adenosin trifosfat (Adenosine Triphosphate, ATP) substratının ve azaltılmış hidrojenin NADPH formunda üretimi için enerji sağlar. Fotosistemler, sitokrom b6f kompleksi, membrana özgü plastokinon havuz ve lumenal elektron taşıyıcıları tarafından işlevsel olarak birleştirilir. Elektron taşıma zincirinin reaksiyonları, moleküler motor ATP senteziyle ATP'nin sentezini sağlayan bir elektrokimyasal proton gradyanına yol açar.



Şekil 2.1. Siyanobakterilerin fotosentez sistemi (Bryant, 2006)

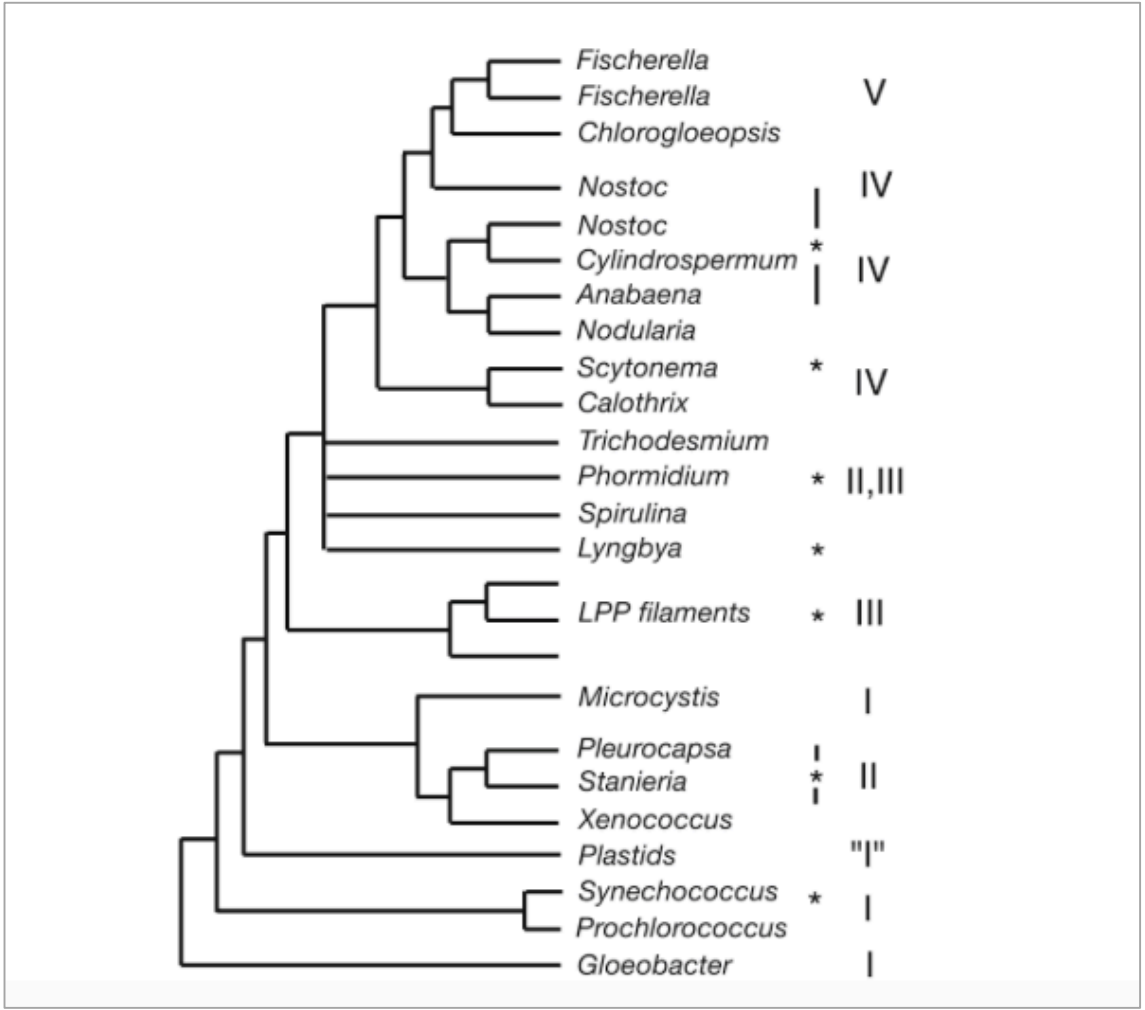
2.3.3. Siyanobakterilerin Geçmişi

Dünya tarihi bakımından, siyanobakterler organizmalar arasında ayrıcalıklı bir konuma sahiptir. Birincil üreticiler olarak karbon döngüsünde önemli bir rol oynarlar ve N-fiksatörleri olarak, azot döngüsünde belirgin bir şekilde görülürler. Dahası, elektronları sudan alan ve oksijeni yan ürün olarak üreten birleşmiş fotosistemleri geliştiren tek organizma olarak, gezegenimizin redoks geçmişinde de büyük bir yere sahiptirler (Knoll, 2008).

Bakteriler arasında, siyanobakteriler alışılmadık ölçüde farklı morfolojilere sahiptirler. Mavi-yeşil alglerin geleneksel taksonomik sınıflandırmaları beş temel grubu tanıyan morfoloji ve gelişime odaklanmıştır (Rippka vd., 1979). Grup I (Chroococcales) yalnız ve kolonyal tek hücreli siyanobakteriler, örneğin *Synechococcus* ve *Gloeocapsa*. Grup II (Pleurocapsales) tek hücrelilerden yalancı filamentli, talus oluşturan siyanobakterilere, çoklu ve ikili fisyona sahip hücrelerden oluşur. Grup III (Oscillatoriales) hücre farklılaşması olmaksızın ipliksi siyanobakterileri içermekle birlikte, Grup IV (Nostocales) akinet ve heterosist üretmek üzere hücre farklılaşması ile işaretlenmiş filamentlerden oluşur. Grup V (Stigonematales) daha karmaşık çok hücreli organizasyona sahip, hücre farklılaştırıcı siyanobakterilerden oluşur (Knoll, 2008).

Filogeni, 16S ribozomal-ribonükleik asit (rRNA), *hetR* ve *rbcL* genlerinin dizi analizine dayanılarak ve çok hücreli taksonun geniş örnekleme ile akinetleri ve heterosistleri ayıran siyanobakterilerin monofilisini de desteklemektedir (Tomitani vd., 2006).

Şekil 2.2'de siyanobakterilerin filogenik ilişkisi gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Moleküler dizi karşılaştırmasına dayalı siyanobakterilerin filogenik ilişkisi (Tomitani vd., 2006)

Diğer prokaryotlara kıyasla, siyanobakteriler genelde büyük hücrelere, karmaşık morfolojilere sahiptirler ve fosil kayıtlarında bulunma ihtimalleri yüksektir. Bu nedenle, dünyanın geçmişi ile en merkezi olarak ilişkili olan bakteri grubunun sedimentlerde bir iz bırakma ihtimalinin yüksek olduğu düşünülmüştür (Knoll, 1989; Knoll, 2003).

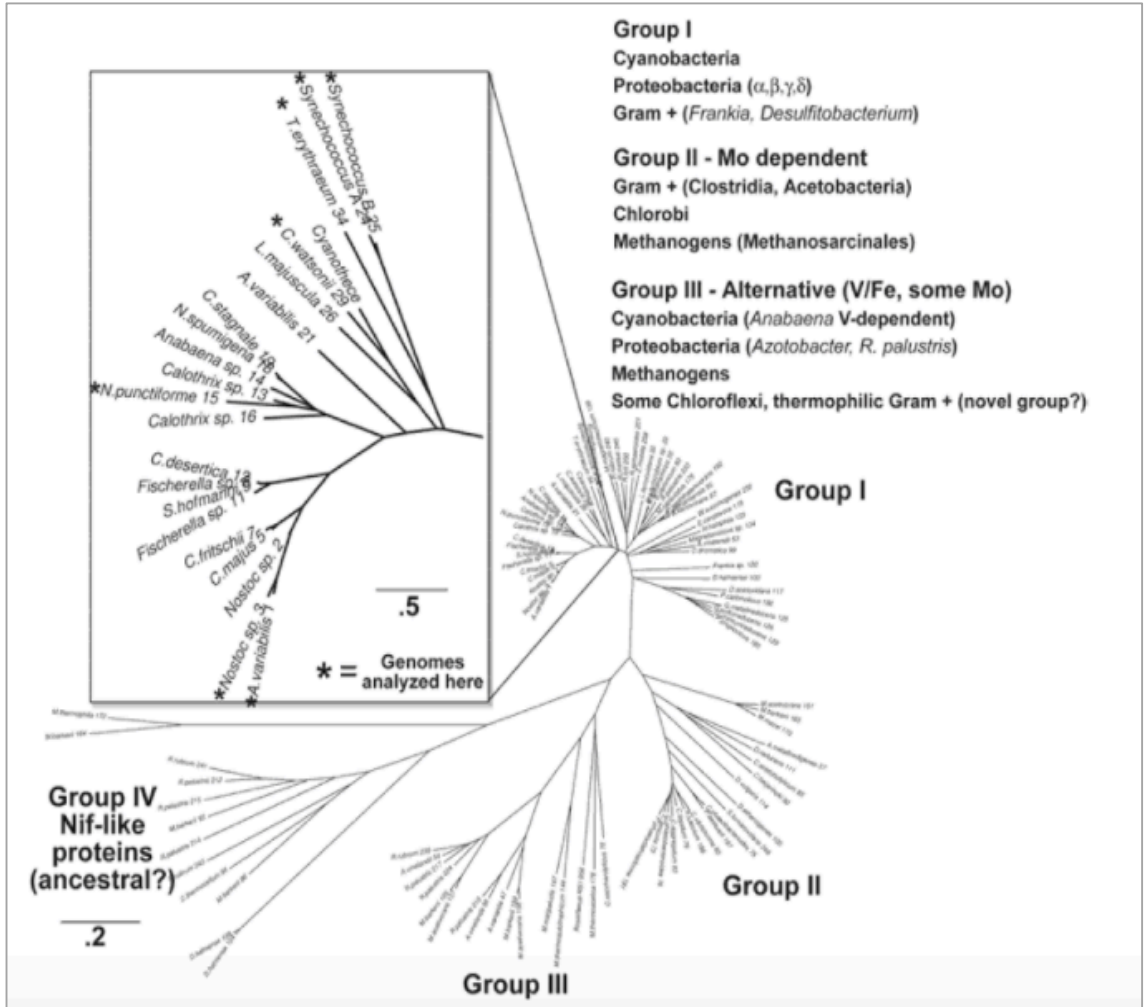
Fotosentezdeki elektronlar için suyun kaynağı olarak kullanılacak olan biyokimyasal kapasite, bir zamanlar mevcut siyanobakterilerin ortak atası olarak gelişmiştir. Jeolojik kayıt, dönüşüm olayını, en azından 2450-2320 milyon yıl önce gezegenimizin tarihinin erken dönemlerinde ve muhtemelen çok daha erken gerçekleştiğini göstermektedir. Mevcut kanıtlar, yaşamın 3500 milyon yıl önce var olduğunu gösteriyor, ancak oksijenli fotosentezin ne zaman evrimleştiği tartışma ve araştırmalara neden olmaya devam etmektedir. Siyanobakteriyal evrim üzerine net bir paleontolojik pencere yaklaşık 2000 milyon yıl önceye açılmış ve mavi-yeşil alglerin çeşitliliğini ortaya koymuştur (Knoll, 2008).

2.3.4. Siyanobakteriyel Azot Fiksasyonu

Siyanobakterilerin sahip oldukları heterosistlerin rolü esas olarak azot fiksasyonuna yatkın bir sitozolik ortam yaratmaya uygundur. Bu nedenle heterosist oluşumu muhtemelen azot açlığı ile yönlendirilen filamentli siyanobakterilerden oluşan bir grup içinde spesifik bir adaptasyon olarak gelişmiştir (Berman-Frank vd., 2003; Tomitani vd., 2006).

Nitrojenaz ağları ile siyanobakter tür ağları arasındaki uyumsuzluk, bu metabolik kabiliyetin karmaşık bir evrimsel öyküsü olduğunu düşündürmektedir. Azot fiksasyonunun enerjik maliyeti (sabit N₂ molü başına en az 16 mol ATP) sabit azot alternatif kaynakları bulmak için güçlü bir seçim baskısı oluşturmaktadır (Swingley vd., 2007).

Şekil 2.3'teki yatay gen aktarımı, sadece siyanobakteriler arasında değil, yaşam ağında N₂ sabitlemesinde önemli bir rol oynamıştır (Swingley vd., 2007).



Şekil 2.3. Siyanobakteri grupları (Swingley vd., 2007)

2.3.5. Siyanobakteriyel Karbondioksit Fiksasyonu

Atmosferik karbondioksit konsantrasyonundaki artışın küresel ısınmanın ana nedenlerinden biri olduğu düşünülmektedir. Uluslararası İklim Değişikliği Paneli (International Panel of Climate Change, IPCC) kriterlerine göre, kömürün yanmasından çıkan gazların yaklaşık %10-15'i karbondioksittir. Mikroalgler ve siyanobakteriler, bu gazı karbon kaynağı olarak kullanarak atmosferik karbon dioksitin azalmasına katkıda bulunabilir.

Bugüne kadar incelenen tüm siyanobakterler CO₂'i karbonhidratlara sabitleyebilir. Bununla birlikte, fiziksel büyüme koşullarının çeşitliliğine ek olarak, siyanobakteriler, çevrelerinden organik karbon tüketme kabiliyetlerinde de büyük ölçüde değişiklik gösterir. Birçok suş, tek karbon kaynağının CO₂ olduğu yerde zorunlu fotototrof olup diğerleri çok çeşitli organik maddeler kullanarak fotomiksotropik veya hatta heterotrofik büyüme gerçekleştirebilirler. Siyanobakteriler, aynı hücresel bölmede anabolik ve katabolik karbonhidrat metabolizmalarının işlev görmesi durumunda eşsiz bir durum oluşturmaktadır. Buna ek olarak, fotosentez ve solunumla elektron taşıma yolları tilakoid membranlardaki bileşenleri paylaşır. Siyanobakteriyel metabolizmanın öneminin bilinmesine rağmen fotototrofik, heterotrofik ve fotomiksotropik büyüme modları arasındaki kaymalarla ilişkili mekanizmalar ve bunların düzenlenmesi hakkında çok az şey bilinmektedir. Glikoliz, fermantasyon, oksidat pentoz fosfat, Krebs döngüsü ve solunum karbonhidrat parçalanmasının farklı yollarıdır (Kaplan vd., 2008).

2.3.6. Siyanobakterilerin Genom Özellikleri

Siyanobakteriler, tek hücreli liflerden filamentlere kadar değişen, morfolojik açıdan çok çeşitli organizmalar olup, bazıları çıplak gözle görülebilecek kadar büyüktür. Bu nedenle tarihsel olarak mavi-yeşil alg olarak adlandırılmıştır (Rippka vd., 1979; Stainer vd., 1978). Birçok siyanobakteriyen ailesi çok yakından ilişkili olduğundan, genetik filogenetik ilişkileri ayırt etmek için sıklıkla kullanılan 16S rRNA, türler morfolojik açıdan farklı olsa da yakından ilişkili türleri tam olarak çözemez (Casamatta vd., 2005; Fox vd., 1992).

Birçok çalışma, ribozomal çeşitlilik eksikliğini telafi etmek için, 16S-23S rRNA dahili kopyalama alanı bölgesine dönmüştür (Boyer vd., 2001; Brown vd., 2005; Rocap vd., 2002). Bu bölge hem dizi hem de uzunluk bakımından oldukça değişkendir. Antiterminasyon ve rRNA katlanmasından sorumlu bilgileri içerir ve aynı zamanda iki

taşıyıcı RNA (tRNA) genini kodlar. ITS sekansları yakından ilişkili türlerin ayırt edilmesinde kullanışlı olmasına rağmen, dikkate alınması gereken birkaç husus vardır. Bazı siyanobakterilerin ribozomal operonlarının aynı olmayan kopyaları vardır (Boyer vd., 2001). Bir organizma sınıfı ya da tek bir organizma içindeki dahili kopyalama alanı bölgelerinin uzunluğu ya da tRNA kodlama sayısındaki değişiklikler dikkatle ele alınmalı ve inceleme anında insan hatasına neden olmamalıdır (Boyer vd., 2001; Rocap vd., 2002).

2.3.6.1. Genom Dizisi Belirleme Yöntemleri

Büyük ölçekli ağ yapısı, tüm genomlar arasındaki evrimsel ilişkileri çözmek için nispeten yeni bir tekniktir. Bu problemin üstesinden gelmek için iki temel yaklaşım kullanılmıştır. Konsensüs ağları, çok sayıda gen (protein) ağının topolojisinin ortalaması alınarak oluşturulmuştur. Zincirleme ağlar, tek bir uzun hizalamadan bir ağ oluşturmak için uçtan uca istifleme ile oluşturulmuştur. Her iki yöntem de 20'den fazla dizilim kullanıldığında gerçek bir topolojiye yaklaşma eğilimindedir; ancak, birleştirme yöntemleri daha az dizi kullanarak bu topolojiye ulaşmak eğilimindedir ve genellikle daha doğrudur (Gadagkar vd., 2005).

Kanonik tek gen veya protein filogenezinde olduğu gibi, bu yöntemlerin doğruluğu, homolog dizileri seçme ve doğru bir şekilde hizalama kabiliyeti ile sınırlanmaktadır. BLAST algoritması / yazılım paketi en yaygın kullanılan arasında yer alan homolog dizileri bulmak için bir dizi hesaplama aracı kullanılabilir. Homologlar grubu için filogenezi gruplamak, hizalamak ve türetmek basitçe doğru olmayan evrim ağaçlarıyla sonuçlanır. Bu sonuç, tüm genomlarda bulunan çoğaltılmış genlerin üstünlüğünden kaynaklanır ve bu genlerin içerilmesi, sahte hizalamalara ve yorumlanması zor evrimarar ağaçlara yol açabilir. Bu nedenle, filogenetik analizin ilk adımı, homolog genleri veya proteinleri, dikey iniş ile ilgili ve genelde aynı genojelerde aynı işlevi gören ortologlara gruplamaktır.

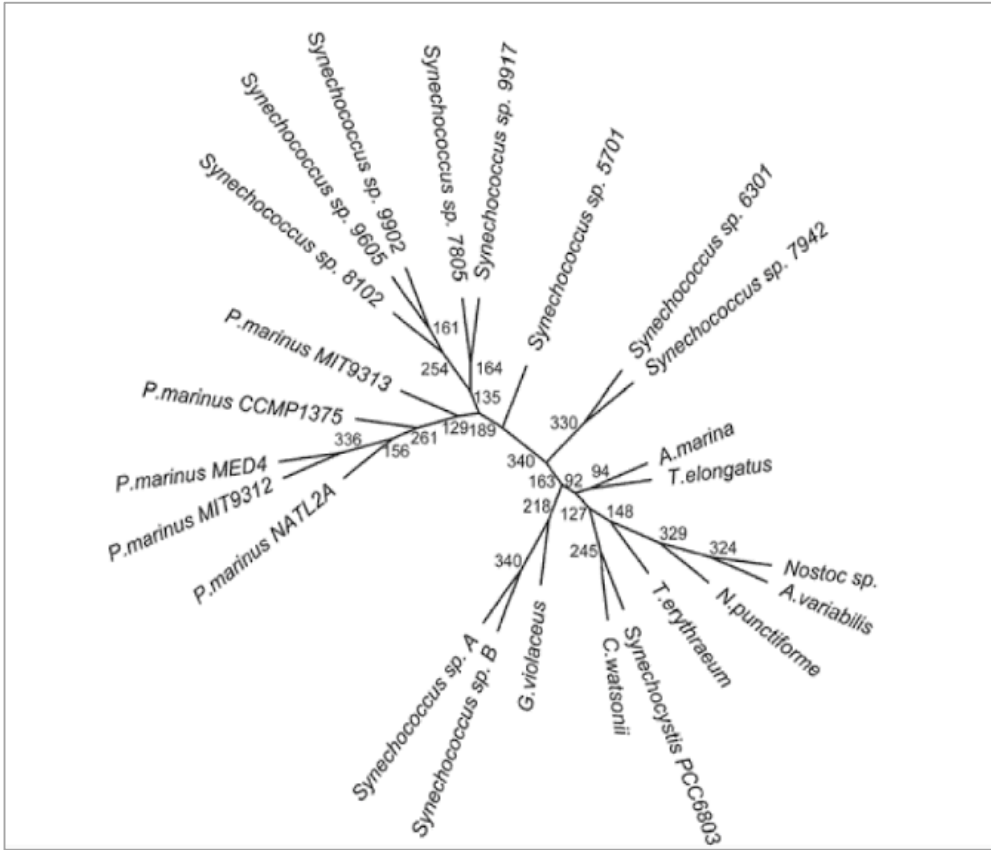
İlke bakımından basit olsa da daha ileri analiz için ortologları seçmek pratikte oldukça zordur ve sıklıkla filogenetik analizde yer alan gen sayısını sınırlar. Ortologların seçimi için eşik kullanımı, özellikle bir grup homolog için (en az yüzde özdeşlik, açılmamış / örtüşen sekans uzunluğu veya homologların 2 veya daha fazla genomda karşılıklı en yakın eşleşmeleri) iyi sonuç veren kesimlerin iyi sonuç vermemesi nedeniyle problemlidir (Koski ve Golding, 2001; Tatusov vd., 1997; Tatusov vd., 2001). Bu, evrensel olarak korunan "temizlik" genleri veya proteinleri üzerinde odaklanan analizlere neden olur. Potansiyel olarak bilgilendirici olmasına rağmen, bu homologların çoğunun filogenetik

analizi kompozisyon veya evrimsel oranlarda güçlü yanlılıklar olduğunu belirtmiştir (Lamour vd., 1994). Dahası, bu proteinler evrensel olarak korunduğu için, belirli bir organizma hakkında ilginç olanın çok azını açığa çıkarırlar.

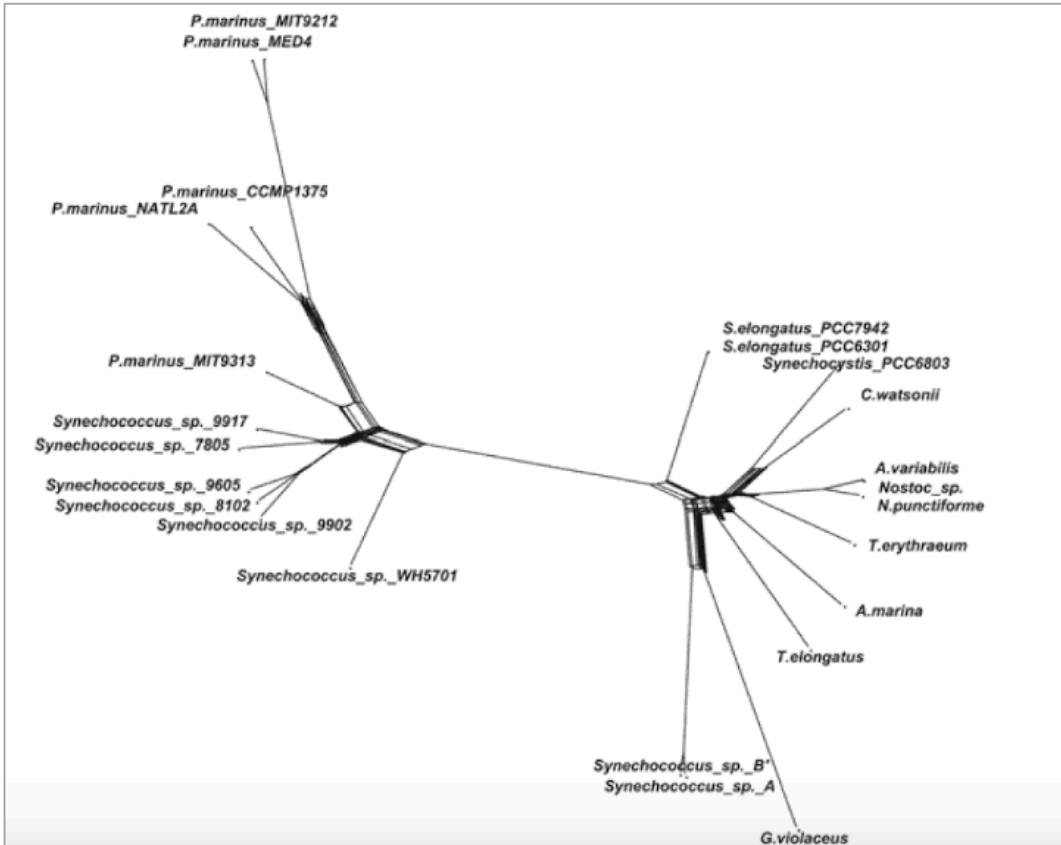
2.3.6.2. Siyanobakteriyal Tür Ağı

Burada kullanılan yöntemler, siyanobakterilerin filogenezi benzeri görülmemiş düzeyde bir genetik ayrımı sağlamıştır. 340 ayrı ağdaki topolojik imzaları içeren ve birbirine bağlı tek bir büyük veri grubuna dayanan iki farklı yöntem kullanılmış olsa da elde edilen filogenler neredeyse birbirleriyle aynıdır. Ayrıca, burada üretilen ağların birçok yönü, 16S rRNA, ribozomal proteinler veya Rubisco büyük altbirim gibi metabolik proteinler ve fotosentetik aparatın bileşenleri gibi tekli gen veya protein markerlerine dayanan önceki analizlerin sonuçlarını kabul eder.

Şekil 2.4, tahmin edilen 340 maksimum olasılıklı filogenezi için bir konsensus ağını göstermektedir. Düğümler üzerindeki sayılar, 340 ağda belirli "bölünme" sayısının kaç kez gözlemlendiğini gösterir. Örneğin, pikofitoplankton-Proklorokok ve deniz sineşokokları ve diğer siyanofitler arasındaki ayrım (burada "kanonik siyanofit" olarak anılır, deniz sineşokokları-proklorokok sınıfı hariç tüm siyanobakterileri kapsar) yakından ilişkili olan termofilik *Synechococcus* OS soyları A ve B'nin kümelenmesi her tek ağda gözlenmiştir. Diğer dallar çok daha zayıf bir şekilde desteklenmiştir- *Acaryochloris marina* / *Thermosynechococcus elongatus* kümesi yalnızca birçok ağda gözlenmiştir. Şekil 2.5'te gösterilenler, bu filogenezin Bölme Ağacı analizinden kaynaklanan "bölünmüş dekompozisyonlar" olarak adlandırılmaktadır. Bu, değişken fakat sıklıkla yinelenen filogenetik sinyalleri, ağaç yerine net olarak tasvir eder, örneğin zayıf desteklenen *Acaryochloris marina* / *Thermosynechococcus elongatus* kümesinin tabanı, birçok tekli protein ağacında bulunan alternatif sinyali gösteren bir karışıklık olarak gösterilir (Swingley vd., 2007).

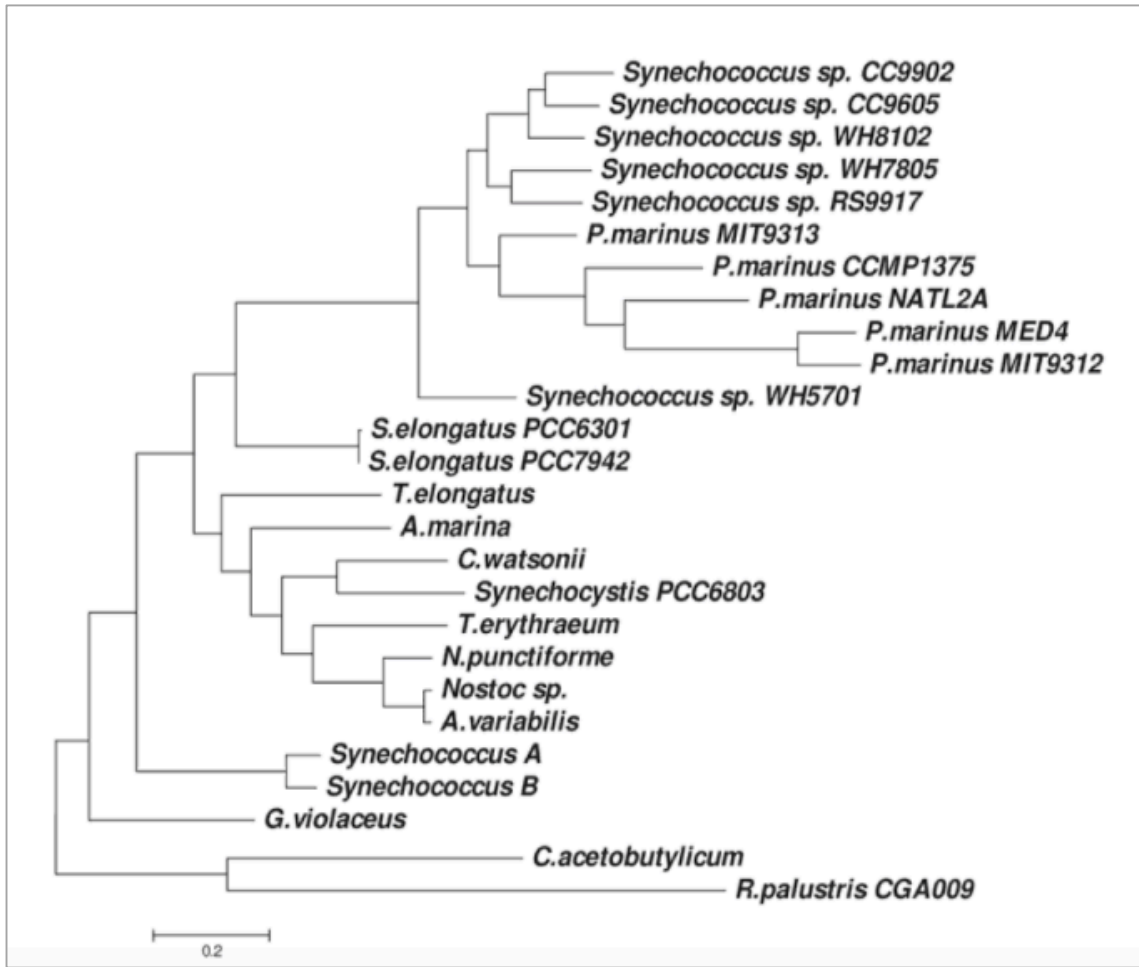


Şekil 2.4. Geniş siyanobakteriyel tür ağı (Swingley vd., 2007)



Şekil 2.5. Detaylı siyanobakteriyel tür ağı (Swingley vd., 2007)

Şekil 2.6, 130000'den fazla korunan karakterin Bayesian maksimum olasılık analizinin sonucunu gösterir ve konsensüs ağlarıyla çarpıcı genel uyumu gösterir. Bu ağ, ikame şekillerinin (sadece topolojilere karşıt olarak) analizine dayandığı için, dal uzunlukları korunur; örneğin birçok prokloroprote proteininde anolimalus evrimsel oranlarını gösteren nispeten uzun dalları gösterir. Birleştirilmiş hizalamaları kullanmanın diğer bir avantajı, içerdikleri protein ailelerinin sayısını en yükseğe çıkarmak için, siyanobakteriyal filumun dışında bulunan ortologları olan protein ailelerini içerebilmeleridir (bu siyanobakteriler konsensus ağ filogenezerinden hariç tutulmuştur). Bu dış grupların eklenmesinden yola çıkarak, *Gleobacter violaceus* soyları, mevcut bulgularla uyumlu olarak, mevcut siyanobakteriler arasında en derinde dallanma olarak görülür (Honda vd., 1999; Nakamura vd., 2003). Ayrıca, bu köklenme, daha önce çok daha çeşitli organizmaların analizine dayanan, daha önce de savunulan, bazı termofilik siyanobakterilerin erken radyasyonunu önermektedir (Sanchez-Baracaldo vd., 2005).



Şekil 2.6. *Synechococcus* türünün filogenisi (Swingley vd., 2007)

2.3.7. Siyanobakterilerin Moleküler Ekolojisi

Moleküler teknikler ortaya çıkmadan önce, morfoloji, ekolojik dağılım ve çevresel rolü açısından siyanobakteriyel çeşitlilik, yüz yıldan uzun süren özel doğabilim hesaplarından oldukça iyi biliniyordu. Burada moleküler tekniklerin katkıları, çoğunlukla dönüştürücü olmaktan ziyade artımsal olmuştur.

Birincil üreticiler olarak önemi nedeniyle, grup olarak siyanobakteriler, moleküler ve genomik tekniklerle yoğun araştırmalara konu olmuştur. Oksijenik fototrof grubundadırlar. Bazı durumlarda siyanobakterilerin çalışma ortamındaki önemi, dolaylı olarak, siyanobakteri için mevcut olan moleküler verilerin taban çizgisini genişletmeye yardımcı olmuştur. Fakat modern moleküler ekolojik çalışmaların siyanobakteriyel araştırmalar üzerindeki etkisi, diğer bakteri gruplarını içeren araştırmalardan biraz farklıdır veya bir bütün olarak mikrobik ekoloji disiplini üzerindedir. İlk olarak, gruptaki filogenetik üyeliğin tanınması hiçbir zaman tanımlayıcı bir problem değildir, bu arada siyanobakteriler genelde mikroskobik, hatta bazen makroskopik gözlemlerle diğer bakterilerden daha fazla tanımlanması mümkündür.

Genel olarak;

- 1) Genellikle büyüktürler.
- 2) Genellikle açıkça tanımlanmış morfolojik özellikleri vardır.
- 3) Fotosentetik pigment içeriği onları şiddetle flüoresan hale getirmiştir.
- 4) Güneş ışığı zorunlu ihtiyaçları olduğundan habitatlarını sınırlar.

Doğadaki siyanobakteriler fotoototrof olduğu için moleküler yollarla ekosistemdeki başlıca işlevlerini yerine getirmek için başka mikrobik gruplarda olduğu gibi kesinlikle bir bağımlılıkları bulunmamaktadır. Bununla birlikte, birincil üretici rolüne bağlı olarak işlevsel veya metabolik yönleri, örneğin azotu düzeltme yeteneği, besin durumları, toksisiteleri veya gece metabolizmaları halen moleküler çalışmalarla açıkça en iyi şekilde sorgulanabilen sorular halindedir (Garcia-Pichel, 2008).

80'li yılların başında, öncü çalışmalar nükleik asitleri tarla örneklerinin dışına çıkarmıştır (Stahl vd., 1984; Weller ve Ward, 1989). Nihai polimeraz zincir reaksiyonu (Polimerise Chain Reaction, PCR) amplifikasyonunun uygulanması, nükleik asitlerin yetersizliği ile ilgili birçok sorunu önlemiştir. Doğal mikropların tespiti, parmak izi alma ve fonksiyonel sorgulamaya yönelik olarak tasarlanmış moleküler tekniklerin geliştirilmesiyle moleküler mikrobik ekoloji önemli ve yaygın hale gelmiştir. rRNA

işaretlerine dayanan erken yerinde teknikler ile, en umut verici mikroorganizmaların siyanobakteriler olduğu ortaya çıkmıştır (Olsen vd., 1986). Bunun nedeni, rRNA'ların ortak bir araç sunan tüm organizmalarda evrensel moleküller olmasıdır. Buna ek olarak rRNA, diğer nükleik asitlerle karşılaştırıldığında büyük kopya sayılarında bulunur; bu nispeten izolasyonu ve sıralamayı kolaylaştırmıştır. Mikrobiyal çalışmalar için rRNA en yaygın kullanılan moleküler genetik belirteç olmasına rağmen, liste genelde işlevsel olarak anlamlı olan diğer genleri de içine alacak şekilde gelişir.

Yüksek verimli DNA dizileme teknolojisindeki gelişmeler sayesinde iyi bir şekilde geliştirilen genomların, genomik kalıpların ve genomların koleksiyonlarının biyo-informatik çalışmaları çevre bilimlerinde yapılmaktadır. Birçok siyanobakteri de dahil olmak üzere giderek artan sayıda tam olarak sıralanmış mikrobiyal genomların mevcudiyeti, sahada doğrudan elde edilen dizileri yorumlamak için genişleyen bir genomik veritabanı oluşturur (Meeks vd., 2001).

Mikroorganizmaların çeşitliliği ve dağılımı hakkında bilinen bu moleküler yöntemlerin girişinden önce laboratuvarında üretilen kültürler, plaka sayımı ya da en olası sayı belirleme gibi ekim tabanlı teknikler içeren çalışmalardan türetilmiştir. Ancak, çoğu tür zenginleştirme ve izolasyon sırasında, seçim sürecinden sonra kültür haline getirilir fakat çoğunlukla doğal kökenli popülasyonu temsil etmez (Garcia-Pichel vd., 1996; Hugenholtz vd., 1998). Moleküler yöntemler bazıları tarafından, doğal ortamdaki mikrobik çeşitlilik, dağılım ve fonksiyonun belirlenmesi sürecinde saf kültürlerin izolasyona dayalı önyargılı yaklaşımı azaltma ve hatta yerine koymanın bir yolu olarak algılandılar (Pace, 1997). Ancak, moleküler sekans verilerine dayanılarak yapılan tüm ekolojik çıkarımların, saf kültürlerin kendileri üzerinde kurulan kimlikler veya işlevsel özellikler ile olan korelasyona dayandığı açık bir şekilde anlaşılmıştır. Çevresel moleküler verilerin yorumlanması için demirleme noktaları olarak kullanılacak yeterli sayıda bu tür kültürlerin bulunmaması, yalnızca çevresel DNA sekansları temelinde tanımlanan mevcut mikrobiyal ağda giderek artan sayıdaki dallar tarafından vurgulanmıştır; ekili izole edilmemiştir, doğadaki olası rolleri hakkında genel bir fikir yoktur (Rappe ve Giovannoni, 2003). Bu, mikrobik ekolojide ekim vurgusunda gerçek bir rönesansa yol açmıştır.

PCR, seçime bağlı oligonükleotidler, bir termostabil DNA polimeraz ile astarlama ve sıcaklık ayarlı astarlama, uzatma ve denatürasyon arasında tekrar eden bir anahtar vasıtasıyla, bir milyondan fazla kopya özellikle hedeflenen DNA dizilerinin birkaç saat

içinde sentezlenebilmesi, daha fazla genetik test için geniş miktarda nükleik asit materyali oluşturmasıdır (Saiki vd., 1988). Amplifikasyon için gerekli şablon DNA'nın az miktarda olması nedeniyle PCR, düşük biyokütlenin doğal numunelerine uygulanması için uygundur ve nükleik asitlerin miktarlarına göre analitik sınırlamanın üstesinden gelmek için çok değerlidir. Çevreyle ilgili DNA'nın sınırlandığı yerlerde değil, tüm uygulamalarda PCR, ekstraksiyon işleminden spesifik DNA parçalarının genetik analizine hızlı geçiş, hızlı tarama ve geniş veri kümelerinin karşılaştırması, replikasyon ve istatistiksel analizin yanı sıra mekansal eğilim analizlerine kolayca izin verir ve zamansal ölçekler. PCR, mikrobik ekolojide kullanılan birçok tekniğin bir parçası haline gelmiştir. Doğal örneklerde mevcut olabilecek doğal maddeler (metaller, asitler) tarafından engellenmeye duyarlıdır ve eşit şiddette veya özdeşlik ile olası tüm hedefleri çoğaltamayabilir. PCR'ın gücü, rutin genetik analizlerin birkaç hücreden veya filamentli siyanobakteriden oluşan mikroskopik örneklerden mümkün olduğu şekilde yapılır (Garcia-Pichel vd., 1996; Janson vd., 1999; Lodders vd., 2005)

2.3.8. Siyanobakterilerin Kullanım Alanları

Siyanobakteriler mavi renkli, kokusuz, toksisitesi olmayan, su içerisinde çözünebilen ayrıca güçlü floresan özelliğine sahip olan fikosiyanini üretirler. Fikosiyanin gıda, ilaç ve kozmetik sanayilerinde kullanılan doğal bir renklendiricidir. Ayrıca sahip olduğu floresan özelliği sayesinde mikroskopi, sitometri, bağışıklık ve doku kimyası konusundaki çalışmalarda prob olarak kullanılmakta ayrıca antioksidan ve radikal uzaklaştırıcı etkisinden dolayı farmasötik olarak kullanılma potansiyeli oldukça yüksektir (Akoğlu ve Çakmakçı, 2011).

Mikroalgler B12 ve E vitamini üretirler. Bu vitaminlerin hem insan hem hayvan tüketimi mümkün olduğundan büyük bir piyasa potansiyeli vardır. Mikroalgler ayrıca flokülant, viskozlaştırıcı ve yağlayıcı olarak kullanılır. Siyanobakteriler yüksek oranda hücre dışı polisakkarit üretmektedir ve bunların çoğu viskozlaştırıcı olarak kullanılmaktadır. Siyanobakterilerde azot açlığının artışı ile polisakkarit üretiminin arttığı belirlenmiştir. Viskozlaştırma özelliği fazla akıcılığı durdurmayı ve pigmentlerin fazla zarar görmesini önlemeyi sağlar.

Kozmetik sektöründe losyon, cilt temizleme maddeleri, cilt kremleri ve saç boyalarında kullanılırlar. Sabunlarda köpük artırıcı, şampuanların içinde temizleyici olarak kullanılırlar.

Mikroalglerden elde edilen gliserin kimya endüstrisinde ve patlayıcı madde üretiminde kullanılır.

Genellikle siyanobakterilerdeki hidrokarbonlar kuru kütlelerinin %5'inden azdır. Petrol kaynaklarının oluşumunda önemli rol aldığı bilinen *Botryococcus braunii* türünün kuru kütlelerinin %90'ı kadar hidrokarbon ürettiği belirlenmiştir.

Siyanobakteriler küçük ve büyükbaş hayvanların ve kümes hayvanlarının yemlerine katkı maddesi olarak eklenmektedir. Bu eklemenin hayvanlarda olumlu yönde gelişmeler sağladığı gözlenmiştir.

Azot fiksasyonu yapabilen siyanobakteriler pirinç tarımında gübre olarak kullanılmaktadır. Toprağı iyileştirir, erozyonu azaltır, havalandırma sağlar ve bitki gelişimini düzenlerler.

Siyanobakteriler endüstriyel ve evsel atıksuların arıtımında organik ve inorganik bileşiklerin, çözülmüş ya da askıda olmaları farketmeden, ortama oksijen sağlayarak arıtımını sağlarlar. Siyanobakteriler azot ve fosfor besin olarak kullandıkları için atıksu arıtımında azot ve fosfor içeren bileşenler alg bulunan tanklara alınarak uzaklaştırılabilirler.

Alkol sanayisinde, bira ve şarabı berraklaştırmada, kokteyllerin ve karışımların çökelmeleri engellemek için stabilizatör olarak kullanılırlar.

Kağıt ve kauçuk sanayisinde, yüzey cilalamak, su sızdırma ve mürekkep dağılımını önlemekte kullanılırlar. Başlangıçta doğal olan kauçuğa eklenerek kauçuğun yumuşaklık ve akıcılık kazanmasını sağlarlar.

İlaç sanayisinde tablet kaplama malzemesi olarak kullanılır. Ayrıca gram negatif ve gram pozitif bakterilere karşı etkili bazı antibakteriyel maddeler mikroalglerden elde edilir. Yine atıksulardan azot ve fosfat giderilmesinde *Chlorella vulgaris* türünden yararlanılmıştır (Shelknanloymilan vd., 2012).

Birçok mikroorganizma tek hücre yağları üretmektedir ve bu yağlar biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanılmaktadır. Siyanobakterilerden biyohidrojen, biyometan, biyoetanol, biyometanol, biyobütanol ve biyodizel üretilmektedir.

2.3.9. Siyanobakteriler Tarafından Üretilen Toksinler

Siyanobakteriler, hayvan zehirlenmelerine ve insan sağlığı riskine neden olan çok çeşitli toksinler üretir. Aynı zamanda ilaç potansiyelleri ve hücre reaktifleri potansiyeline sahip çok sayıda biyoaktif bileşik üretmektedirler. Bu siyanobakteriyel ürünlerin

toksinlere ve biyoaktif bileşiklere ayrılması biraz suni ve tarihsel kökene sahiptir. Siyanobakteriyel hepatotoksin ve nörotoksinler gibi toksinler, araştırma araçları (hücre biyolojik reaktifleri) olarak kullanılır ve reaktif tedarikçileri tarafından satılmaktadır. Siyanobakteriyel biyoaktif bileşikler için birçok ekran, memeli hücreleri üzerindeki etkilerine (antikanser bileşikleri) yöneliktir, diğer bir deyişle genellikle sitotoksinler için ekranlardır. Siyanobakteriler ökaryotik hücreler / organizmalar üzerinde etkili olan biyoaktif bileşikler üretirler, fakat virüslerde olduğu gibi diğer bakteri / siyanobakterileri de etkilerler. Ototrofik organizmalar olarak siyanobakteriler çok yönlüdürler ve çeşitli organizmalarda yetişirler ve bu organizmalar tarafından üretilen biyoaktif bileşiklerin çeşitliliğini kısmen açıklayabilir. Giderek artan bir şekilde, bu büyüleyici organizmaları ve biyoaktif bileşiklerini incelemek için mevcut kültür koleksiyonları kullanılmaktadır.

- Siyanobakteri hepatotoksinleri: Mikrosistinler ve nodülerinler

Dünyada, tatlı su bloğunda en sık bulunan siyanobakteriyel toksinler, siklik heptapeptid mikrosistinlerken, acı sularında siklik pentapeptid nodüler yaygındır. Bu toksinler çok güçlü hepatotoksinlerdir. Fare biyoanalizlerinde akut dozdaki bu toksinler, karaciğer yaralanması ve iç kanamalar yoluyla birkaç saat içinde ölüme neden olur. Otopside büyük, karanlık, kanla tıkanmış bir karaciğer bulunur; karaciğer üzerindeki etkisinden dolayı ve "hepatotoksinler" adını almaktadır. Bu toksinler, planktonik *Anabaena*, *Microcystis*, *Osilatör* / *Planktothrix*, *Nostoc*, *Anabaenopsis*'den tespit edilmiştir (Sivonen ve Jones, 1999).

- Silindrospermopsinler-siyanobakteriyel hepatotoksinler ve sitotoksinler

Silindrospermopsin molekül ağırlığı 415 olan siklik bir guanidin alkaloididir (Ohtani vd., 1992). *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Umezakia natans*, *Aphanizomenon ovalisporum*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Raphidiopsis curvata* ve *Anabaena bergii* tarafından üretilen tropik veya subtropik olarak ortaya çıkan bir siyanotoksindir. Bir hepatotoksin olmasının yanı sıra, cylindrospermopsin böbrekleri, dalakları, timusu ve kalbi de etkiler.

- Siyanobakteri nörotoksinleri

Siyanobakteriyel nörotoksinler hepatotoksin kadar yaygın değildir. Bu nörotoksinler çok hızlı bir şekilde etkileyen zehirlidir ve Kuzey Amerika, Avrupa ve Avustralya'da en sık rastlananlardır. Fare biyoaygıtlarında solunum durması ile ölüm 2-30 dakika arasında gerçekleşir (Hawser vd., 1991).

- Dermatotoksinler ve diğer deniz biyotoksinleri

Lyngbya, *Oscillatoria* ve *Schizothrix* gibi bentik siyanobakterilerin, Hawaii ve Okinawa'da siyanobakteri ile temas eden yüzücüler arasında şiddetli dermatiteye neden olan toksinler ürettiği bildirilmiştir. *Lyngbya*'nın toksinleri, güçlü tümör destekleyicileri ve protein kinaz C etkinleştiricileri olan aplysiatoksins ve debromoaplysiatoksins olarak tanımlanmaktadır (Moikeha ve Chu, 1971; Hashimoto vd., 1976).

3. MİKROALGLERİN BİYOYAKIT ÜRETİMİNDE KULLANILMASI

3.1. Biyohidrojen Üretimi

Hidrojen büyük bir potansiyeli olan alternatif yakıt olarak kullanılabilir temiz bir enerji taşıyıcısıdır. Hidrojen üretiminde çeşitli teknolojiler vardır. Biyolojik hidrojen üretim prosesleri geleneksel prosesler ile kıyaslandığında daha çevre dostu ve daha az enerji yoğunluktadır. Hidrojen biyolojik olarak biyofotoliz, foto-fermentasyon ve karanlık-fermentasyon veya bu proseslerin kombinasyonu ile üretilir. Bu proseslerin ticarileşmesinde en önemli engel düşük hidrojen üretim verimi ve hızıdır. Ticarileşmenin hızlanmasını genetik olarak modifiye edilmiş mikroorganizmalar, işletme şartları iyileştirilmiş prosesler ve kombine proseslerin bulunması sağlayacaktır.

Yeşil alg ve siyanobakteriler, su moleküllerini H⁺ iyonuna ve O₂'ye direkt ve indirekt biyofotoliz yolları ile parçalarlar.

- Direkt biyofotoliz

Bu proses ile güneş enerjisi direkt olarak fotosentetik reaksiyonlar ile suyu hidrojen iyonu ve oksijene ayırır. Üretilen H⁺ iyonları, hidrojenaz enzimi ile H₂ gazına dönüşür. Biyofotoliz sürecinde kullanılan demir-hidrojenaz aktivitesi oksijene karşı hassas olduğundan özel şartlar gereklidir. Yeşil alglerde suyun hidrojene dönüşümü reaksiyon (3.1) de verilmiştir.



Yeşil bitkilerde hidrojenaz enzimi olmadığından sadece CO₂ indirgenmesi meydana gelir. Siyanobakteriler hidrojenaz enzimine sahiptir ve uygun şartlar sağlandığında hidrojen üretebilirler. Direkt biyofotoliz reaksiyonunda elektronlar sudan Fotosistem 1 ve 2 aracılığı ile hidrojene yönlendirilir. Direkt biyofotoliz Fotosistem 2'de suyun parçalanması ve Fotosistem 1'de ferredoksinin indirgenmesinden meydana gelir.

Yeşil alglerden olan *Chlamydomonas reinhardtii* anaerobik şartlar altında hidrojen üretebilir veya hidrojeni elektron vericisi olarak kullanabilir. Üretilen hidrojen iyonları, hidrojenaz enzimi aracılığıyla hidrojen gazına dönüşür. Fotosistem 2'de üretilen elektronlar Fotosistem 1 tarafından tutulan ışık enerjisini kullanan ferredoksinine aktarılır. Hidrojen üretimi için indirgenen ferredoksinin direkt olarak elektronları hidrojenaz yakalar.



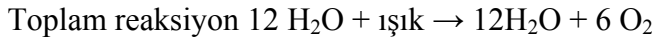
↓

O₂

- İndirekt biyofotoliz

İndirekt biyofotoliz şu adımlardan meydana gelir:

- a) Fotosistemde biyokütle oluşumu
- b) Hücrelerdeki glukozun 1 molu başına 2 mol asetat ve 4 mol hidrojenin aerobik karanlık fermentasyon ile üretimi
- c) 2 mol asetatın hidrojene dönüşümü (Genç, 2009).



3.2. Biyoetanol Üretimi

Biyoetanol buğday, mısır ve şeker pancarı gibi odunsu bitkilerden nişasta veya selüloz özlü ürünlerin fermantasyonu ile üretilen belirli karıştırma oranları ile benzin ile harmanlanarak kullanılan yakıttır. Berrak, renksiz ve karakteristik bir kokusu olan, 113 oktanlı, kaynama noktası 78,5 °C, donma noktası -114,1°C olan bir yakıttır. İçten yanmalı motorlara değiştirilmeye gerek duyulmadan %10 miktarında benzinle harmanlanarak kullanılabilir. Biyoetanolün en yaygın iki kullanım şekli vardır. Bunlar E-10 (%10 biyoetanol+ %90 benzin) ve E-85(%85 biyoetanol+ %15 benzin)'dir.

Biyoetanol benzinle karıştırıldığında;

- Biyoetanol akaryakıtlarda oktan artırmak için kullanılan metil tersiyer bütül eter (MTBE) veya benzen gibi kanserojen maddelere çevreci bir alternatiftir,
- Biyoetanol motorun performansını yükseltir,
- Biyoetanol düşük donma noktası sayesinde donmayı engeller ve motorun daha soğuk kalmasını sağlar.

Biyoetanol hammaddeleri

- Şeker Kamışı
- Şeker Pancarı
- Mısır
- Patates
- Tatlı Sorgum
- Tarımsal Atıklar
- Buğday
- Odunsular
- Alglerdir.

Biyoetanol üretiminde nişastanın önce şekere, sonra da şekerin doğrudan fermantasyon ile biyoetanole dönüştürülmesi ile sağlanır.

Biyoetanol Üretim Aşamaları

1-Hazırlama

Hazırlama sürecinde biyoetanol üretimi için kullanılacak olan nişasta kaynağı hammadde değirmende öğütülür ve enzim yardımı ile hücreler parçalanır. Bu şekilde içindeki nişasta ortaya çıkar ve daha iyi bir verim elde edilmesi sağlanır. Nişasta başka bir enzimin yardımı ile şekere çevrilir. Bu noktada parçalanmış nişasta kaynağı, enzim ve suyun içine maya konularak fermantasyon ünitesine aktarılır.

2-Fermantasyon

Fermantasyonda eklenen maya enzim-su bulamacında bulunan şeker moleküllerini biyoetanole çevirir. Bu işlem 60 – 80 saati bulur. İşlem sonunda bulamacın içinden %10-12 arası biyoetanol elde edilmesi hedeflenir. Ayrıca fermantasyon süresince açığa çıkan CO₂ gazı da ayrılmış olur.

3-Distilasyon

Fermantasyon işleminin sonucu elde edilen bulamaç distile edilerek biyoetanol bulamaçtan ayrıştırılır. Bu işlem distilasyon kulelerinde sıvının ısıtılmasıyla sağlanır. Distilasyon sonucunda bulamaçtan %95-96 oranında biyoetanol ayrıştırılmış olur.

Biyoetanolün Kullanım Alanları

Araç sektöründe tarım makinalarında, benzinle harmanlanarak, dizel motorlarda katkı maddesi olarak ve hibrid veya yakıt hücresel araçlarda kullanılır. Kojenerasyon ünitelerinde buhar enjeksiyonlu gaz türbinlerinde, fosil yakıtla çalıştırılan tesislerdeki NO_x emisyonlarının azaltılmasında, CO₂ ticaretinde, kombine çevrimli güç santrallerinde, dizel ile çalışan güç jeneratörlerinde, Stirling sistemlerinde, sudaki tuzluluğunun giderilmesinde kullanılır. Küçük ev aletlerinde ısıtma ve soğutma işlemlerini yapan fırınlarda ve dolaplarda ve aydınlatmada kullanılır. Kimya sanayisinde etilen, hidrojen, glikol eterler, etil akrilat, etil asetat, etil eter, etil klorü, asetik asit ve asetik aldehit üretiminde kullanılır.

Biyoetanolün Çevresel Faydaları

- Benzinle harmanlandığında yakıt içindeki oksijen seviyesi artırılmış olur. Yakıtın oksijen seviyesini arttırdığında yakıt daha verimli yanar ve egzoz çıkışındaki zararlı gazlar azalır.
- Akaryakıtlarda oktan artırmak için kullanılan metil tersiyer bütül eter (MTBE) veya benzen gibi kanserojen maddelere çevreci bir alternatiftir.
- Egzoz gazı emisyonlarını azaltır.
- Ozon tabakasının incelmeye neden olan hidrokarbon emisyonlarında büyük ölçüde düşüş sağlar.
- Yüksek seviyeli biyoetanol karışımları NO_x emisyonlarını %20'ye kadar azaltır.
- Yüksek seviyeli biyoetanol karışımlarının kullanılması ile Uçucu Organik Maddelerde (Volatile Organic Compounds, VOCs) %30'un üzerinde azalma sağlanmaktadır.

- Kanserojen etkisi bulunan benzen emisyonlarını %50 oranında azaltır.
- SO₂ ve partikül emisyonlarında düşüş sağlar.

Biyometanolün Toplumsal Faydaları

- Katma değeri yüksek yeni bir pazar oluşturarak tarım ürünlerinin değerini arttırır ve hammadde olarak kullanılan bitkilerin tarımının gelişmesine katkı sağlar.
- Yerli yatırım ve istihdam olanakları sağlar.
- Hammaddeleri üreten çiftçilerin gelirlerinde ve refah düzeylerinde artış görülür.
- İthal petrole alternatif yeni ve yerli bir enerji kaynağı oluşturur.
- Yenilenebilir bir yakıttır, doğada kirliliğe neden olmaz ve karbon dengesini bozmaz.
- Çözünürken doğaya zarar vermez.
- İçerdiği yüksek O₂ seviyesi sayesinde daha iyi bir yanma sağlayarak CO seviyesini %25-30 oranında azaltır.

3.3. Biyodizel Üretimi

Biyodizel soya, ayçiçek, kanola ve aspir gibi yağlı tohum bitkilerinden ve alglerden elde edilen bitkisel yağların veya hayvansal yağların katalizör yardımıyla kısa zincirli bir alkolle reaksiyonu sonunda açığa çıkan ve yakıt olarak kullanılan bir üründür. Evsel atık yağlar ve hayvansal yağlar da hammadde olarak kullanılabilir. Biyodizel üretiminde mikroalglerin ve özellikle siyanobakterilerin kullanımı oldukça yeni bir konudur.

Biyodizel petrol içermez; biyometanolden farklı olarak saf olarak veya her oranda petrol kökenli dizel ile karıştırılarak kullanılabilir. Saf biyodizel herhangi bir dizel motorunda değişiklik yapılmadan kullanılabilir (<http://www.eie.gov.tr/yenilenebilir/biyodizel.aspx>, 05.12.2017).

Biyodizel, dizel ile karışım oranları bazında aşağıdaki gibidir:

- B5 = %5 Biyodizel + %95 Dizel
- B20 = %20 Biyodizel + %80 Dizel
- B50 = %50 Biyodizel + %50 Dizel
- B100 = %100 Biyodizel

Biyodizel Üretim Yöntemi

Farklı biyodizel üretim yöntemleri olmakla birlikte, en yaygın olarak kullanılan yöntem transesterifikasyon yöntemidir. Transesterifikasyon reaksiyonunda hammadde olan yağ, tekil yapıdaki bir alkolle katalizör yardımıyla ana ürün olarak gliserin ve yağ asidi esterleri vererek esterleşir. Bu sırada yan ürün olarak monogliseridler ve digliseridler ve serbest yağ asitleri oluşur. Biyodizel üretiminde soya, kanola ve ayçiçek gibi yağlı tohum bitkilerinden elde edilen bitkisel yağlar, atık yağlar ve hayvansal yağlar ile metanol ve alkali katalizörler kullanılmaktadır.

Biyodizel Yakıt Özellikleri

- Alevlenme noktası 110 °C'den yüksektir. Bu özellik sayesinde kullanımı, taşınımı ve depolanması daha güvenlidir.
- Dizel ile her oranda tam olarak harmanlanabilmektedir. Bu özellik dizelin kalitesini yükseltir. Emisyon değerlerini düşürür ve motordaki yağlanmayı arttırır.
- Yüksek setan sayısı sayesinde motor daha az vuruntulu çalışmaktadır.
- Çözücü özelliğe sahip olduğundan yakıt deposu duvarlarındaki ve borulardaki kalıntıları-tortularını çözer bu nedenle filtrelerin tıkanmaması için önlemler alınmalıdır.

Biyodizel Çevresel Özellikleri

- Hammadde olarak tarımsal ürünler kullanıldığından sera gazı etkisini arttırıcı yönde etki göstermez.
- Suya karıştığında 30 gün içerisinde biyodizelin %95'i çözülürken, dizelde bu oran %40'a kadar düşmektedir. Bu nedenle, özellikle ABD'nin birçok eyaletinde göl ve nehir gibi sucul alanlarda kullanılan ulaşım araçlarında saf biyodizel kullanımı zorunludur.
- Bakteriler tarafından kolayca ayrıştırılabilir ve kükürt içeriği dizelden daha azdır.
- Biyodizel biyolojik karbon döngüsü içinde fotosentez ile karbondioksiti dönüştürür, karbon döngüsünü hızlandırır, ayrıca sera gazı emisyonunu arttırıcı yönde etkisi yoktur.
- Hammadde olarak kullanılan ürünler fotosentez kabiliyetine sahip oldukları için biyodizel ile karbon salınımı ve sera gazı emisyonu azalırken, hammaddeler azot tuttukları için NO_x emisyonları artar.
- Sülfür emisyonu saf biyodizel kullanımında tamamen giderilmektedir.
- Dizel yakıtlara kıyasla CO emisyonu %48 daha azdır.
- Dizel yakıtlara kıyasla partikül emisyonu %47 daha azdır.

- Dizel yakıtlara kıyasla yanmamış hidrokarbon oranı %67, CO₂ emisyonu %80, aromatik hidrokarbonlar ise %75-90 oranında daha azdır.

- Biyodizel kükürt içermez. Bu sayede NO_x kontrol teknolojileri bu sistemlerde rahatlıkla uygulanabilir. Kükürt dioksit emisyonu oluşmaz. Asit yağmurlarına neden olmaz.

- Dizel yakıtlara kıyasla ozon tabakasına olan etkileri %50 daha azdır.

- Muhtemel kanser nedeni olan polisiklik aromatik hidrokarbon ve türevlerinin (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon, PAH) emisyonlarında %80-90 oranlarında azalmalar belirlenmiştir.

Biyodizelin Depolama Koşulları

Dizel yakıtların dağıtım ve depolamasında kullanılan yöntem ve kurallar biyodizel için de geçerlidir. Biyodizelin depolandığı ortam temiz, kuru ve karanlık olmalı ve aşırı sıcak olmamalıdır. Depolama tankı malzemesi olarak çelik, florlanmış polietilen ve polipropilen seçilebilir. Aşamaların tamamında bakır, kurşun ve çinko kullanılmamalıdır. Biyodizel çözücü bir yakıt olduğundan elastomer ve kauçuk kullanımı sakıncalıdır.

Biyodizelin Dizel Motorlarda Kullanımı

Biyodizelin alevlenme sıcaklığı 110 °C'den yüksek olduğundan taşınması ve depolanması daha güvenlidir. Biyodizel motorine yakın ısı değeri, motorinin setan sayısından daha yüksek setan sayısı, motorine yakın özgül yakıt tüketimi, güç ve moment değerlerine, daha iyi temizleme ve yağlayıcılık özelliklerine sahiptir ve motor daha az vuruntulu çalışır.

Kimyasal olarak dizel yakıtlara benzerliği sayesinde bir dizel aracın yakıt deposuna doğrudan biyodizel eklenebilir. 1996 yılından önce üretilen araçlarda iç aksamda kullanılan kauçukların biyodizel kullanımı ile erimesinden dolayı biyodizel bu araçlar için uygun değildir. Mevcut teknoloji dizel araçlarda ufak değişiklikler veya değişiklik yapılmadan biyodizel kullanımı mümkündür.

Biyodizel Yakıtın Toplumsal Faydaları

- Kırsal kesime istihdam ve ekonomik katkı
- Kentlere göçün önlenmesine katkı
- Yeni iş alanı oluşturması
- İthal yakıt bağımlılığının azalmasına katkı

- Daha temiz yanma ürünleri ile toplum sağlığına katkı
- Ekonomiye yeni bir alandan katma değer sağlaması
- Yan sanayilerin gelişmesine katkı
- Üretim sanayisinin gelişmesine katkı
- Çevrenin ve doğal enerji kaynaklarının korunması
- Sürdürülebilir enerjiye destek sağlanması
- Enerji tarımının geliştirilmesi
- Fosil yakıtlara alternatif
- Sera gazları emisyonunda azalmadır.

3.4. Konuyla İlgili Yapılmış Çalışmalar

3.4.1. Biyoyakıt Üretimi Üzerine Yapılan Çalışmalar

Alternatif yakıt üretimi için yeni teknolojilerin geliştirilmesi, sınırlı petrol kaynaklarını, ilgili yükselen maliyetleri ve yükselen fosil yakıt CO₂ emisyonları nedeniyle çevresel kaygıları önlemek için gereklidir. Sürdürülebilir endüstriyel toplum geliştirmek ve sera emisyonlarını azaltmak için çeşitli alternatifler önerilmiştir. CO₂'nin güneş enerjisiyle doğrudan doğruya, mikroalg ve siyanobakterler gibi fotosentetik mikroorganizmalar tarafından biyoyakıtla dönüştürülmesi, bitki biyokütlesi kaynaklı geleneksel biyoyakıt üretimine kıyasla birçok avantaja sahiptir. Fotosentetik mikroorganizmalar bitkilerle karşılaştırıldığında daha yüksek büyüme oranlarına sahiptir ve üretim sistemleri ekilebilir olmayan araziye dayanır. Sentetik biyolojinin ve genetik manipülasyonun ilerlemesi, bu organizmalar tarafından doğal olmayan kimyasallar üretmek için siyanobakteriler üzerinde araştırmalar yapılmasına olanak sağlamıştır (Machado ve Atsumi, 2012).

Daha yüksek petrol fiyatları ve uzun vadeli enerji güvenliğinin gereği, biyoyakıt üretimine ilgiyi artırmıştır. Biyoenerji, fosil esaslı yakıtlardan çok daha temiz, daha güvenli ve ekonomik enerji kaynağıdır. Çeşitli organizmalardan, siyanobakteriler genetik yetkinlikleri, fotosentez kabiliyeti ve verimli topraklara bağımlılığın olmaması nedeniyle cazip bir biyoyakıt kaynağıdır. Sentetik biyoloji ve metabolik mühendislik yaklaşımları etanol, bütanol, biyodizel ve hidrojen de dahil olmak üzere biyoyakıt üretiminde başarıyla kullanılmıştır (Singha vd., 2016).

Rodionova ve arkadaşlarına göre enerji sektöründe mikroalgler biyohidrojen, biyometan, biyoetanol, biyometanol, biyobütanol, biyodizel, pigment, biyokimyasal, karbonhidrat, aminoasit, protein, yağ, gliserol ve yağ asidi vb. üretiminde kullanılmaktadır (Rodionova vd., 2017).

3.4.2. Farklı Biyoyakıt Üretim Yöntemleri ve Hammaddeleri Üzerine Yapılan Çalışmalar

Tavuk artıklarından kalan yağlar ve kuyruk yağları da biyodizel üretiminde kullanılmaktadır (Bhatti vd., 2008).

Biyoyakıt üretiminde mantar selülozları da kullanılabilir. Mantar selülozları biyokütlelerinin hidrolizi ile şeker salınımı yapmaktadır. Bu şeker fermente edildiğinde biyohidrojen ve biyoetanol elde edilmektedir (Srivastava vd., 2017).

Soya fasulyesi ham yağı ve sap kalıntıları da dahil olmak üzere bir bütün olarak biyo-rafineride kullanılabilir bir üründür. Diğer geleneksel hammaddelerle karşılaştırıldığında soya fasulyesi gereken tüm rafineri hammaddelerini içermektedir. Soya fasulyesi biyoyakıt ve biyokimyasalları üretmek için yeterli miktarda selüloz, hemiselüloz ve lignin içerir. Soya fasulyesinin ham yağı transesterifikasyon ile biyodizel üretilirken, sap kalıntısının selülozlarından sakkarifikasyon ile biyoetanol üretilir (Abdulkhani vd., 2017).

Algler de biyoyakıt üretimi için kullanılan biyokütle kaynaklarından biridir. Burada başlıca adımlardan biri biyokütle yetiştiriciliğidir. Bu amaçla ışık biyoreaktörleri ve açık hava sistemleri kullanılır. Biyodizel üretimi için trigliseritle zenginleştirilmiş biyokütle transesterifikasyona uğrar. Biyoalkol üretimi için biyokütle fermentasyona tabi tutulur. Mikroalg hücrelerde biyolojik hidrojen üretimi için üç yöntem vardır: doğrudan biyofotoliz, dolaylı biyofotoliz, fermentasyondur (Voloshin vd., 2016).

Huang ve diğerleri (2010) tarafından yapılan çalışmada mikroalg yağlarının avantajları ve dezavantajları belirtilmiştir.

Avantajları;

- Genel bitkisel yağlara benzer yağ asidi yapıları vardır.
- Belirli koşullar altında kuru ağırlığın %85'i kadar yüksek olabilir.
- Büyüme döngüsü kısa bir süredir.
- Mikroalglerde bileşenler görecelidir.

Dezavantajları;

- Çoğu alg lipidlerinin dizel yakıtta göre daha az yakıt potansiyeli vardır.
- Mevcut yaygın bitkisel yağlara kıyasla yetiştirme maliyeti daha yüksektir.

3.4.3. Mikroalglerin Biyoyakıt Üretiminde Kullanılması Üzerine Yapılan Çalışmalar

Oliver ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmaya göre siyanobakteriler biyoyakıt ve 2,3-butanediol, etanol, isopropanol, isobütanol, etilen, yağ asitleri, yağ alkolleri, yağ hidrokarbonları, glikojen, mannitol, laktat, glikosilgliserol, 3-hidroksipropiyonik asit, kafeik asit vb. kimyasal üretiminde kullanılmaktadır (Oliver vd., 2016).

Siyanobakteriler ve mikroalgler trigliseritlerinden biyodizel ve karbonhidratlarından da biyoetanol üretimi için kullanılabilecek fototrofik canlılardır (Baroukh vd., 2015).

Siyanobakterilerin biriktirdikleri yağlar genellikle triaçilgliserol formundadır. Ortalama olarak yağ içeriği %1-70 arasında değişirken, kaliteli ortam şartları sağlandığında %90 oranında yağ içeren siyanobakteriler vardır (Meng vd., 2009).

Scragg ve diğerleri (2003) yaptıkları çalışmada *Chlorella vulgaris* üzerinde çalışarak kanola yağı-sürfektant ve *Chlorella vulgaris* bulamacı elde etmiş ve bu yakıt dizel yakıtla kıyaslandığında yüksek CO düşük NO_x emisyonuna sahip olduğu bildirilmiştir.

Xu ve diğerleri (2006) çalışmalarında *Chlorella protothecoids* mikroalg türünü geliştirerek en yüksek %55,2 yağ içeriği elde etmişlerdir. Hetetrofik olarak büyük ölçekte geliştirdikleri hücrelerden n-hekzan ile elde ettikleri yağı asidik bir katalizörle transesterifikasyona uğratıp biyodizel üretmişlerdir.

Samori ve diğerleri (2010) *Botryococcus braunii* türünde çalışmış ve n-hekzan ile yağ ekstrakte ettiklerinde %5.6 yağ biriktirirken; 1,8-diazabicyclo-[5.4.0]-undec-7-ene solventi ile yağ ekstrakte ettiklerinde ise %8.2 yağ biriktirebilmişlerdir. Aynı tür dondurularak kurutulduğunda aynı yöntemlerle sırasıyla %7,8 ve %16 yağ verimi elde etmişlerdir.

Converti ve diğerleri (2009) *Nannochloropsis oculata* ve *Chlorella vulgaris* türleri üzerinde 14 günlük inkübasyon süresi boyunca yağ içeriğini incelemişlerdir. *Nannochloropsis oculata* türünde ortam sıcaklığı 20 °C iken %7,9, 25 °C iken %14,92 yağ içeriği çıkarılmıştır. *Chlorella vulgaris* türünde ortam sıcaklığı 25 °C iken %14,71, 30 °C iken %5,9 yağ içeriği çıkarılmıştır. Elde edilen yağın metanol ile

transesterifikasyonu sonucunda molce %60 miktarında çok yüksek palmitik asit gözlenmiştir.

Morowwat ve diğeri (2010) ise *Chlamydomonas* kullanmıştır. Hücreler durgun faza ulaştıktan sonra yağ ekstraksiyonları yapılmıştır. Çıkarılan yağ esterifiye edilmiş ve gaz kromatografi cihazında yağ asidi metil esterlerine bakılmıştır. İzole edilen susta toplam yağ asidi içeriği %25 olarak bulunmuştur. Çalışmada *Chlamydomonas* türü pirinç tarlasından elde edildiği için bu türün gelişiminin ucuz ve besiyerinin basit olması bu türün biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

4. DENEYSSEL ÇALIŞMALAR

Ökaryotik ve prokaryotik mikroalglerin fotosentez yaparak dünyadaki oksijen döngüsüne katkı sağladığı bilinmektedir. Mikroalgler fotosentez yapmalarının yanı sıra biyoyakıt üretebilecek potansiyele de sahiptir. İçerdikleri yağ çeşitli yöntemlerle biyodizele dönüştürülerek yakıt elde edilmektedir. Türlerin yaşadığı su ortamının besin değerleri, ışık miktarı, sıcaklık ve pH değerleri tür gelişimini etkilemektedir. Bu çalışmada bahsedilen 4 türün farklı parametrelerle biyoyakıt üretimi için yağ karakterizasyonu incelenmiştir.

4.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Çizelge 4.1’de deneysel çalışmalarda analizlerde kullanılan kimyasallar, Çizelge 4.2, 4.3 ve 4.4’te farklı türler için hazırlanan farklı besiyerleri verilmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışmalarda kullanılan kimyasallar

NaNO ₃	ZnSO ₄ .7H ₂ O	NaHCO ₃
K ₂ HPO ₄	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	KH ₂ PO ₄
MgSO ₄ .7H ₂ O	CuSO ₄ .5H ₂ O	FeCl ₃ .6H ₂ O
CaCl ₂ .2H ₂ O	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	(NH ₄).Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O
C ₆ H ₈ O ₇	CH ₃ OH	ZnCl ₂
C ₆ H ₈ FeNO ₇	CHCl ₃	NaCl
Na ₂ EDTA	NaCl	Na ₂ EDTA-KOH
Na ₂ CO ₃	MgCl ₂ .6H ₂ O	FeSO ₄ .7H ₂ O
H ₃ BO ₃	KCl	MoO ₃
MnCl ₂ .4H ₂ O	KNO ₃	C ₆ H ₅ OH
H ₂ SO ₄	Hcl	

4.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çalışmada örnek alımı, besiyeri hazırlanması ve sterilizasyon için saf su ihtiyacı bulunmaktadır. Bu nedenle saf su cihazı (NÜVE HS104) kullanılmıştır. Besiyerlerinin sterilize edilmesi için otoklav (MEDNIF) kullanılmıştır. Besiyerlerinin hazırlanmasında ve biyokütlenin tartımında hassas terazi (SARTORIUS) kullanılmıştır. Mikroalglerin büyüme grafiklerinin oluşturulması ve ortam koşullarının izlenmesi için spektrofotometre (SHIMADZU UV-1201) ve Ph metre (EUTECH) kullanılmıştır. Mikroalg biyokütlelerinin ekstrakte edilmesi için santrifüj cihazı (NÜVE NF200) kullanılmıştır. Tüm deneysel çalışmalar ve analizler sırasında kontaminasyonu engellemek için çeker ocakta (DELTA) çalışılmıştır. Türlerdeki gelişmelerin incelenmesi ve tür teşhisleri

sırasında mikroskoptan (OLYMPUS BİNOKÜLER CX22) yararlanılmıştır. Elementel analiz için C, H, N, O ve S içerikleri (THERMOSCIENTIFIC FLASHSMART) okunmuştur. PCR analizi (CFX96 TOUCH™ REAL-TIME PCR DETECTION SYSTEM) için saflaştırma yapılmıştır. Son olarak DNA dizi analizi (ABI 310) yapılmıştır.

Deneysel çalışmalar ve analizlerde kullanılan tüm cihazların resimleri EK-1'de verilmiştir.

4.3. Numune Alımı

Mikroalgler mezofilik şartlarda yaşayan, sudaki H⁺ iyonunu elektron vericisi olarak kullanan türler olduğundan bu türleri barındırabilecek toprak ve sıcak su kaynaklarından örnek alınmıştır. Su örneği için Ankara ili Sincan ilçesinde bulunan bir termal kaplıcanın sıcak su çıkış noktasından örnek alımı yapılmıştır. Burada yerin 600 m altından sondajla çıkartılan sıcak su bir kısmı kaplıcaya verilmekte ve diğer kısmı da Çubuk Çayı'na verilmektedir. Çayın ısı dengesini bozmamak adına sıcak kaplıca suyu önce bir tanka aktarılıp burada soğutulmakta ve sonrasında çaya dökülmektedir. Örnek tankın su yüzeyinde oluşan yosun tabakalarından bıçakla kesilip saf su dolu numune şişesine alınmıştır. Burada örnek alınırken tank çevresine yapışan yosunlardan alınmamaya özen gösterilip örnek steril edilmiş bir maşa ile alınmıştır.



Şekil 4.1. Sıvı numune alım noktası

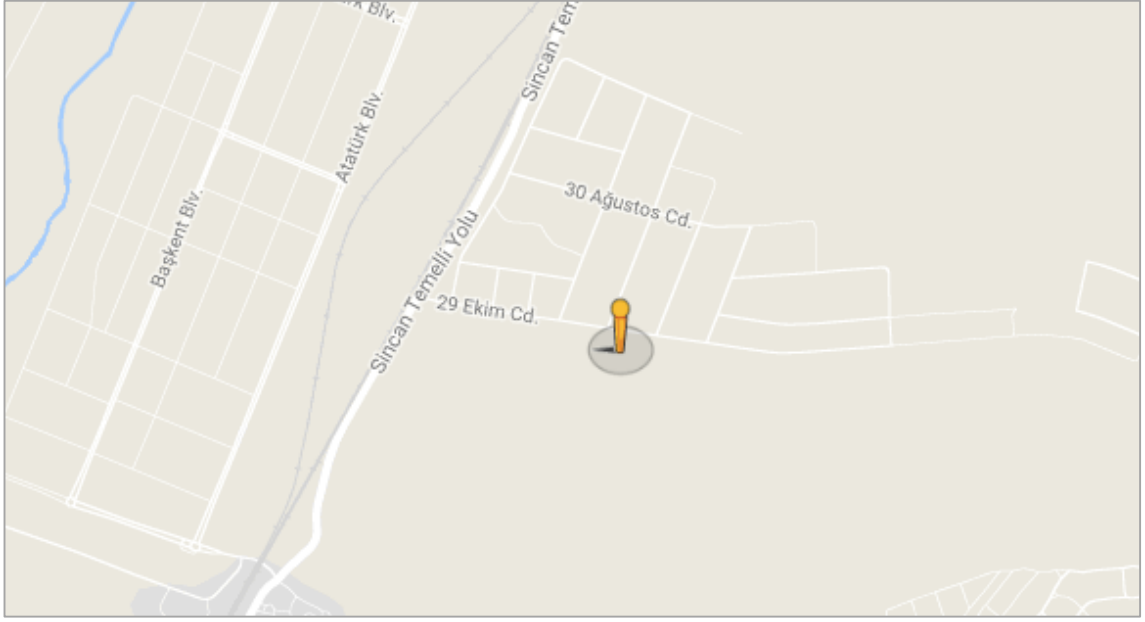


Şekil 4.2. Sıvı numune alım noktasının uydu görüntüsü

Toprak örneği için ise Ankara ili Sincan ilçesinde bulunan ve uzun bir yağışlı dönem geçiren Malıköy sanayisinde yeşilimsi ve balçık haline gelmiş topraktan alınmıştır. Örnek steril spatül ile toprak yüzeyinin üst kısmından alınarak steril numune şişesine aktarılmıştır.



Şekil 4.3. Katı numune alım noktası



Şekil 4.4. Katı numune akım noktası uydu görüntüsü

Hem su hem toprak örnekleri alındıktan sonra numune şişeleri parafilm ile kaplanarak sızma ve kontaminasyonlar engellenmiştir. Örnekler aynı gün içerisinde laboratuvar ortamına getirilerek doğal yaşam koşullarına benzer ortam oluşturmak amacıyla şişeler pamuk ile kapatılıp ışıklı tablaya yerleştirilmiştir.

4.4. Mikroalg Türlerinin Ekimi

Numuneler daha fazla çalışma için özenle laboratuvara aktarılmıştır. Büyüme ortamı, algal mikroorganizmalar için BG11 standart ortamına göre hazırlanmıştır. BG11 bileşiminin ayrıntısı Çizelge 4.2’de verilmektedir. Yeterince çalkalandıktan sonra sıvı numuneler için yaklaşık 20 ml numune, 500 ml’lik erlenmeyer içine 200 ml BG11 solüsyonuna ilave edilmiş ve dört adet 30 w flüoresanla sağlanan yeterli ışığın altında tutulmuştur. Yaklaşık bir iki hafta sonra, besiyerlerinde önemli miktarda büyüme gözlenmiştir (Şekil 5.1). Yosun, mikroalgler, sarı-yeşil yosunlar, diyatomlar ve diğer birçok algal bölünmeleri içeren mikroorganizmaların bir karışımının varlığını gösteren ışık mikroskopu kullanılarak büyüme gözlemlenmiştir. Şekil 5.2, bu çeşitliliği göstermektedir.

Tür tespitleri yapılmadan önce bütün türler için BG11 besiyeri kullanılmış, tür tespiti yapıldıktan sonra her tür en iyi geliştiği besiyeri ortamında geliştirilmiştir. Çalışmada kullanılan BG11 dışındaki iki besiyerinin bileşimi Çizelge 4.3 ve 4.4’te verilmiştir.

Çizelge 4.2. BG11 besiyeri

BG11 Besiyeri		
Stok 1 (1000 ml)	NaNO ₃	15.0 g
Stok 2 (500 ml)	K ₂ HPO ₄	2.0 g
Stok 3 (500 ml)	MgSO ₄ .7H ₂ O	3.75 g
Stok 4 (500 ml)	CaCl ₂ .2H ₂ O	1.80 g
Stok 5 (500 ml)	Citric acid	0.30 g
Stok 6 (500 ml)	Ammonium ferric citrate green	0.30 g
Stok 7 (500 ml)	Na ₂ EDTA	0.05 g
Stok 8 (500 ml)	Na ₂ CO ₃	1.00 g
Stok 9 (1000 ml)	H ₃ BO ₃	2.86 g
	MnCl ₂ .4H ₂ O	1.81 g
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.22 g
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.39 g
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.08 g
	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.05 g
BG11 (1000 ml)	Stok solüsyonu 1	100.0 ml
	Stok solüsyonu 2 - 8	10.0 ml her biri
	Stok solüsyonu 9	1.0 ml

Çizelge 4.3. Johnson besiyeri

Johnson Besiyeri	
NaCl	%10-30
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,5 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g/L
KCl	0,2 g/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,2 g/L
KNO ₃	1,0 g/L
NaHCO ₃	0,043 g/L
KH ₂ PO ₄	0,035 g/L
Fe solüsyonu	10 ml
Eser elementler solüsyonu (1L)	10 ml
Distile su	980 ml
Fe Solüsyonu	
Na ₂ EDTA	189 mg/L
FeCl ₃ .6H ₂ O	244 mg/L
Eser Elementler Solüsyonu (1L)	
H ₃ BO ₃	61 mg/L
(NH ₄) ₂ MoO ₇ .4H ₂ O	38 mg/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	6 mg/L
ZnCl ₂	5,1 mg/L
MnCl ₂ .4H ₂ O	4,1 mg/L

Çizelge 4.4. BBM besiyeri

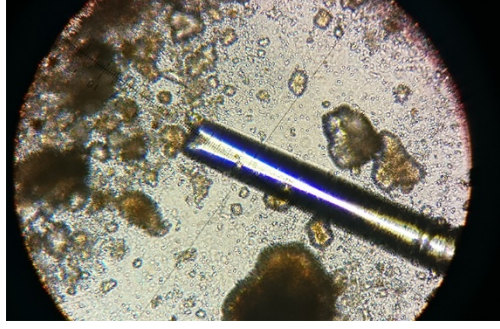
Bold's Basal Medium (BBM) Besiyeri		
Stok 1 (1000 ml)	NaNO ₃	25,0 g
Stok 2 (1000 ml)	CaCl ₂ x2H ₂ O	2,5 g
Stok 3 (1000 ml)	MgSO ₄ x7H ₂ O	7,5 g
Stok 4 (1000 ml)	K ₂ HPO ₄	7,5 g
Stok 5 (1000 ml)	KH ₂ PO ₄	17,5 g
Stok 6 (1000 ml)	NaCl	2,5 g
Stok 7 (1000 ml)	Na ₂ EDTA-KOH	50,0 g- 31,0 g
	FeSO ₄ .7H ₂ O	4,98 g
Stok 8 (999 ml distile su+ 1 ml konsantre H ₂ SO ₄)		
Stok 9 (1000 ml)	H ₃ BO ₃	11,42 g
Stok 10(1000 ml)	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,82 g
	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,44 g
	MoO ₃	0,71 g
	CuSO ₄ .5H ₂ O	1,57 g
	Co(NO ₃)2.6H ₂ O	0,49 g
BBM	Stok 1-6	10 ml her biri
	Stok 7-9	1 ml her biri
	Stok 10	2 ml

Hazırlanan çözeltiler erlen ile ağzı sıkıca alüminyum folyo ile kapatılarak otoklava koyulur. 121°C'de 45 dakika sterilize edilir. Oda sıcaklığına kadar soğuması için bekletildikten sonra buzdolabında saklanarak kullanılır.

Türler besiyerlerine aktarıldıktan sonra ışık aldıkları cam tezgahlar üzerine yerleştirilerek gelişmeleri gözlenir.

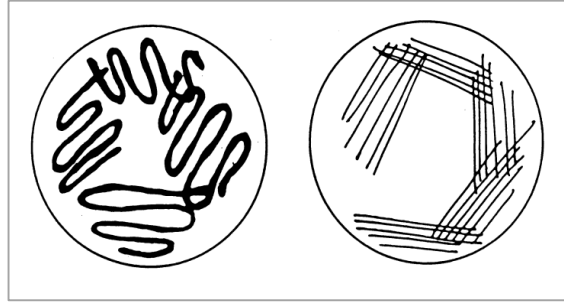
4.5. Mikroalg Türlerinin İzolasyonu ve Tanımlanması

İzolasyon yapabilmek için karışık kültürlerdeki gelişme gözlendikten sonra uygun şekilde seyreltilmiş bir kültür ortamının birkaç küçük damlası, kılcal damıtık steril bir pipetle steril cam lamelleri üzerine konulmuştur. Mikroskop altındaki her damla yalnızca bir mikroorganizma içeren bir damla bulunana kadar incelenmiştir. Bu damla Şekil 4.5'te gösterildiği gibi steril bir kılcal pipetle taze besiyeri ortamına alınmıştır. Damla içerisinde bulunan bireysel mikroalglerin çoğalması ve saf kültür oluşturması izlenmiştir.



Şekil 4.5. Kulcal pipetle tek tür izolasyonu

İzolasyon yapıldıktan sonra tüpte gelişen türler katı besiyeri (agar) ortamına aktarılarak koloni oluşumu gözlenmiştir. Şekil 4.6’da katı besiyerinde çizgi ekimi gösterilmiştir. Buradaki koloniler invert mikroskopta incelenerek tek bir noktadan öze ile alınan türler kendilerine uygun erlenlerdeki sıvı besiyerlerine aktarılmıştır. Böylelikle izolasyon işlemi iki basamakta uygulanmış ve kesin olarak saf kültür elde edilmesi sağlanmıştır.

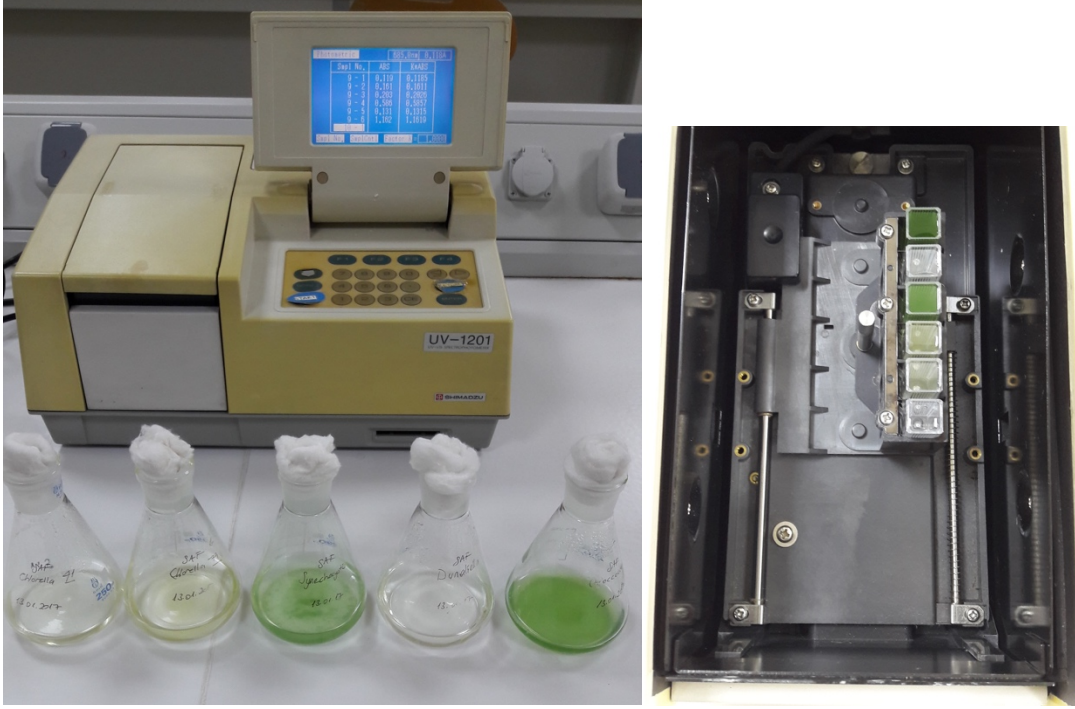


Şekil 4.6. Katı besiyerinde çizgi ekimi

Her tür incelendikten sonra “Common Freshwater Algae of the United States, An Illustrated Key to the Genera (Excluding the Diatoms)” (Dillard, 2008), “Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification” (Wehr VD., 2003) ve “Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators” (Bellinger ve Sigeo, 2010) kaynakları incelenerek mikroskopta görüntülenen türler ile eşleşme sağlanan türler adlandırılmıştır.

4.6. Büyüme Eğrisinin Oluşturulması

Erlenler de gelişme gözlendikten sonra türlerin düzenli olarak spektrofotometre ile büyümeleri 685 nm’de ölçülerek kaydedilmiştir. Şekil 4.7’de mikroalg türlerinin spektrofotometreye yerleştirilmesi ve spektrofotometrede okunması gösterilmiştir. Buradan elde edilen değerler ile büyüme eğrileri çizilmiştir. Değerler kaydedilirken her türün kendi sıvı besiyerinin spektrofotometrede okunan değeri kör olarak alınıp sonradan okunan değerler bu değer kadar düşürülmüştür.



Şekil 4.7. Türlerin spektrofotometrede okunması

4.7. Büyük Hacimde Ekim

Biyokütlenin biyokimyasal içeriğinin belirlenmesi için daha fazla analiz için yeterli biyokütle üretilmesi gerekmektedir. Tür tespitleri yapıldıktan ve büyüme eğrileri çizildikten sonra büyüme hızı en yüksek olan *Synechocystis* sp. büyük hacim ekimi için kullanılmıştır. Büyük hacimde ekim için 5 litrelik hacimdeki balon jodelerde ekim yapılmış ve uygun bağlantı parçaları takılarak açmaya gerek kalmadan örnekler alınmıştır. Kurulum Şekil 4.8’de gösterilmiştir. Çözelti, herhangi bir ekstra karbon kaynağı olmaksızın BG11 ortamında maksimum konsantrasyona ulaşan eşit miktarda iyi yetiştirilmiş çözelti kullanılarak inoküle edilmiştir. 400 ml yüksek konsantrasyonlu biyokütle çözeltisi kaplara aktarılmış ve hacim BG11 ile 4 litreye kadar doldurulmuştur. pH %37’lik HCl kullanılarak nötr pH 7’ye ayarlanmıştır. Aşağıdaki eklemeler ile 3 farklı ortam oluşturulmaya çalışılmış ve değişiklikler kaydedilmiştir.

- Yeterli miktarda NaHCO_3 eklenen ortam
- Ek karbon eklenmeyen ortam
- Çözelti içine hava verilen ortam



Şekil 4.8. Büyük hacimli ekim

4.8. Biyokütlenin Yağ İçeriği Analizi

Çalışmada başlangıçta farklı üç yaygın yağ ölçme yöntemi incelenmiştir. En iyi yöntem üzerinde karar vermeden önce düşünülmesi gereken kısıtlamalar vardır. Bunlar şu şekilde listelenebilir:

- Yüksek verimlilikte yağ çıkarabilmelidir.

Çıkarılan yağ miktarı için her yöntem verimli değildir. Farklı yöntemler farklı çözücüler ve ayırma stratejileri kullanır.

- Az miktarda biyokütle ile çalıştırılabilir olmalıdır.

Kullanılan hassas terazinin doğruluğu 1 mg olduğundan hataları minimize etmek için, en az 5 mg yağ ekstrakte edilmelidir. Yağ içeriğini biyokütlenin %20'si varsayarsak, gerekli biyokütle en az 25 mg olmalıdır. 1 L biyokütle solüsyonundan elde edilen maksimum biyokütle miktarı 700 gr olmalıdır. Bu nedenle maksimum büyüme durumunda 40 mL yeterlidir. Ancak güvence için analizlerde 100 ml'lik bir çözelti hacmi alınmıştır.

- Yağ analizi için önemli bir diğer parametre analiz için gerekli süredir. Sürenin uzunluğu analizin uygulanabilirliğini etkilemektedir.

4.8.1 Folch Yöntemi

Uygun yağ içeriği analizi yönteminin seçimi için yukarıda sayılan özelliklerden dolayı en uygun yöntem olarak Folch yöntemi seçilmiştir. Folch yöntemi daha fazla yağ ekstraktı çıkarması ve bu ekstraktın daha kolay tartılabilir olması üstünlüklerinden dolayı biyokütlenin yağ içeriği analizinde kullanılmıştır.

Standart bir Folch yöntemi aşağıdaki adımlarla uygulanmıştır.

I. 5-10 mg yağ elde edilmesi için seçilen bir mikroalg hacmi, santrifüleme (3600 rpm'de 6 dakika) ile konsantre edilmiş ve bir cam tüp içine aktarılmıştır.

II. Santrifüj edildikten sonra, üst sıvı alınmış ve 1 saat süreyle 2 mL metanol ile özütlenme başlatılmıştır.

III. Daha sonra 4 mL kloroform ilave edilerek ve 2 saat karıştırılmıştır.

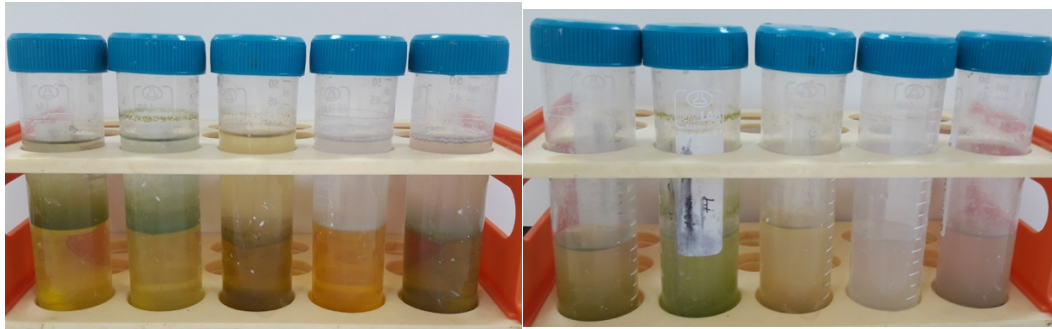
IV. Santrifüj edildikten sonra yağ içeren süpernatant başka bir tüpe aktarılmış ve tortu ½ oranında metanol/kloroform karışımı ile 30 dakika boyunca ikinci kez özü çıkarılmıştır.

V. Tekrar Santrifüj edildikten sonra süpernatant ilaveten toplanmış ve 2,25 mL %0,88 KCl çözeltisi ile yıkanmıştır. İki fazdaki ayrışma santrifüj ile hızlandırılmış ve ikinci bir yıkama 0,75 ml metanol ve 0.75 ml %0,88 KCl çözeltisi ile yapılmıştır.

VI. Santrifüj işleminden sonra, alt tabaka başka bir cam tüpüne aktarılmış ve su ve katı maddelerin tamamen ortadan kaldırılması için 3600 rpm'de 6 dakika santrifüj edilmiştir.

VII. Solvent önceden tartılmış bir alüminyum folyo tabağına aktarılmış ve 40 ° C'de buharlaştırılmış ve sabit ağırlığa gelene kadar kurutulmuştur (Converti vd., 2009).

Şekil 4.9'de Folch yöntemiyle yağ analizi sırasında 5 türdeki faz oluşumu ve Şekil 4.10'da analiz sonucunda kurutulmak için folyolara dökülen türler verilmiştir.



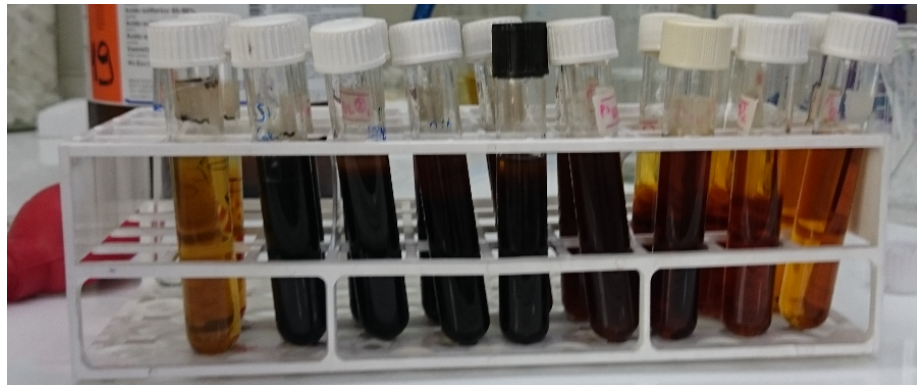
Şekil 4.9. Yağ analizi sırasında 5 türdeki faz oluşumu



Şekil 4.10. Yağ analizi sonunda kurutulmak üzere folyolara dökülen türler

4.9. Biyokütlenin Karbonhidrat İçeriği Analizi

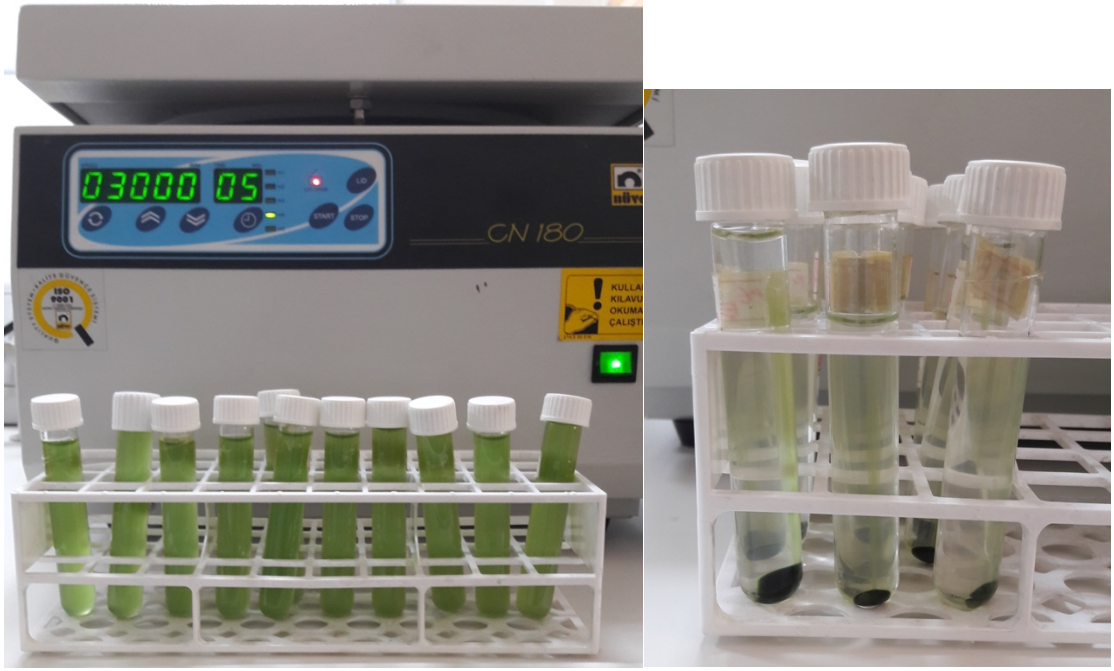
Karbonhidrat içeriğinin tayini için fenol-sülfürik asit yöntemi uygulanmıştır. Önerilen Kochert metodolojisi uygulanmıştır. Bu yöntem sulu solüsyonlarda karbonhidrat konsantrasyonunun tayininde bugüne kadar en çok kullanılan kolorimetrik yöntemdir. Bu yöntemin temel ilkesi, karbonhidratların, konsantre sülfürik asit ile reaksiyona girmesi sonucu kurutulduğunda, furfural türevleri üretmesidir. Furfural türevleri ile fenol arasındaki reaksiyon, tespit edilebilir renkte geliştirmektedir. Bu yöntemin standart prosedürü şöyledir: Mikroalg çözeltilisinin 2 mL'si, bir test tüpünde 1 mL %5 sulu fenol çözeltisi ile karıştırılır. Ardından 5 mL konsantre sülfürik asit karışıma hızla eklenir. Test tüpleri 10 dakika bekletildikten sonra, 30 saniye vortekslenir ve renk gelişimi için oda sıcaklığında bir su banyosu içine 20 dakika yerleştirilir. Su banyosundan çıkarılan test tüplerindeki renk gelişimi Şekil 4.11'de verilmiştir. Sonra, spektrofotometrede 490 nm'de ışık emilmesi kaydedilir. Referans çözeltisi örnek yerine 2 mL'lik distile su kullanılarak hazırlanır. Bu işlemde kullanılan fenol yeniden damıtılmış ve ölçümlerden hemen önce su içindeki %5 fenol (w/w) hazırlanmıştır (Dubois vd., 1956).



Şekil 4.11. Fenol-sülfürik asit ilavesi ile renk gelişimi

4.10. Biyokütlenin Elementel Analizi

Elementel analiz için 5 tür santrifüjle Şekil 4.12’de gösterildiği gibi alınarak Şekil 4.13’deki gibi krozelerde kurutulmuştur. Sonrasında elementel analiz yapılmıştır. Elementel analiz için Thermoscientific FlashSmart cihazı kullanılmış; C, H, N, O ve S içerikleri okunmuştur.



Şekil 4.12. Santrifüj öncesi ve sonrası bir mikroalg türü



Şekil 4.13. Elementel analiz için türlerin etüvde kurutulması

4.11. Biyokütlenin Protein İçeriği Analizi

Protein içeriği elementel analiz sonuçlarından elde edilen N içeriğinin literatürdeki kaynaklarda verilen denklikleri incelenmiş ve aşağıdaki denklik ile protein içeriği hesaplanmıştır.

Protein (% , kütlev/kütlev) = N içeriği (% , kütlevce) x 5,95 (López vd., 2010).

4.12. DNA Dizi Analizi ve PCR Analizleri

Elimizdeki 5 tür örnek Gerçek Zamanlı PCR saflaştırma ve DNA dizi analizleri hizmet analizi ile dış laboratuvarlarda yapılmıştır.

Gerçek Zamanlı PCR nedir?

Geleneksel PCR'de, amplifiye edilmiş DNA ürünü veya amplifikonu bir son nokta analizinde tespit edilir. Gerçek zamanlı PCR'de, amplifikasyon ürününün birikimi, reaksiyonun her döngüden sonra ürün kantifikasyonu ile birlikte gerçek zamanlı ilerledikçe ölçülür.

PCR ürünlerinin gerçek zamanlı saptanması, artan miktarda ürün DNA'sı ile birlikte artan floresans veren bir floresan aracı molekülünün eklenmesi ile sağlanır. Floresans algılama modülleri ile donatılmış uzmanlaşmış termal döngüler, amplifikasyon oluştuğu zaman floresan sinyalinizi izlemek için kullanılır. Ölçülen floresans, amplikonun toplam miktarı ile orantılıdır. Floresanstaki zaman içindeki değişim, her çevrimde üretilen amplikon miktarını hesaplamak için kullanılır.

PCR üzerinden gerçek zamanlı PCR'ın en büyük avantajı, gerçek zamanlı PCR'ın, geniş bir dinamik aralıkta ve yüksek hassasiyet ile şablon DNA'nın başlangıç kopyasının belirlenmesine izin vermesidir. Gerçek zamanlı PCR sonuçları ya niteliksel (bir dizinin varlığı ya da yokluğu) ya da niceliksel (kopya numarası) olabilir. Dolayısıyla, nicel gerçek zamanlı PCR, qPCR (quantitative PCR) analizi olarak bilinir. Buna karşılık, PCR en iyi yarı kantitatifdir. Ek olarak, gerçek zamanlı qPCR verileri, jel elektroforezi olmadan değerlendirilebilir; bu da deney süresinin kısaltmasına ve verim artışına neden olur. Son olarak, gerçek zamanlı qPCR reaksiyonları çalıştırıldığından ve veriler birleşik, kapalı tüp qPCR sisteminde değerlendirildiğinden, kontaminasyon riski azaltılır ve post-amplifikasyon manipölasyonuna olan ihtiyaç, qPCR analizinde ortadan kaldırılır.

Gerçek Zamanlı PCR / qPCR Testleri Uygulamaları

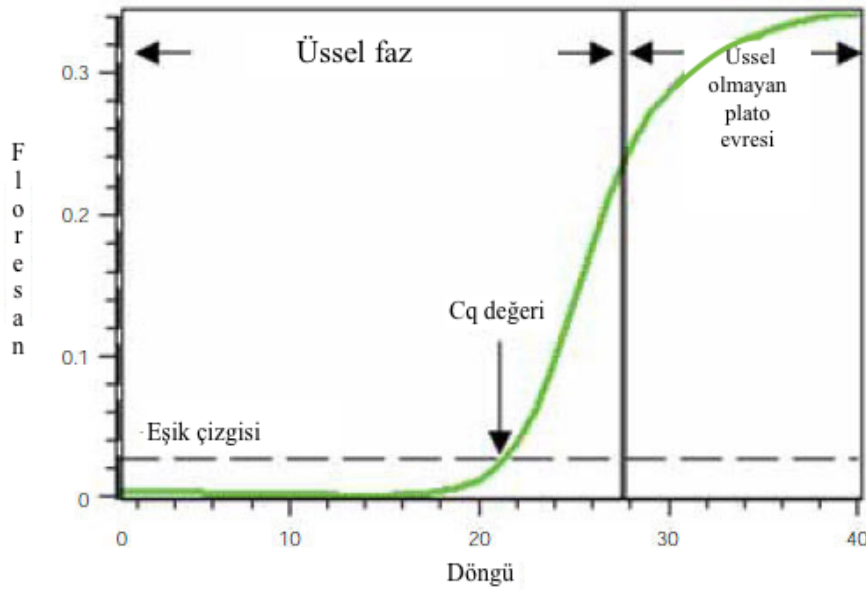
Gerçek zamanlı PCR / qPCR analizleri, çeşitli biyolojik numunelerde nükleik asidin hızlı ve hassas tespiti ve nicelendirilmesi için, gen ekspresyon analizi, gıdada genetiği değiştirilmiş organizmaların saptanması ve kanser fenotiplendirme gibi çeşitli uygulamalarla tercih edilen bir araç haline gelmiştir.

Araştırma laboratuvarlarında, qPCR analizleri, dönüştürülmüş hücre hatlarındaki gen kopyalama sayısının nicel olarak ölçülmesi veya mutant genlerin varlığı için yaygın olarak kullanılır.

Gerçek Zamanlı PCR nasıl çalışır?

Gerçek zamanlı PCR'in nasıl çalıştığını anlamak için, tipik bir amplifikasyon grafiğini kullanarak bir qPCR analizi Şekil 4.13'te gösterilmektedir. Bu çizimde, PCR döngülerinin sayısı x ekseninde gösterilir ve tüp içindeki güçlendirilmiş ürünün miktarı ile orantılı olan amplifikasyon reaksiyonundaki floresan y ekseninde gösterilir.

Amplifikasyon grafiği, bir üstel fazın ardından bir üstel olmayan plato fazının izlediği iki fazı gösterir. Üstel fazda PCR ürün miktarı, her çevrimde yaklaşık iki katına çıkar. Ancak reaksiyon ilerledikçe, reaksiyon bileşenleri tüketilir ve nihai olarak bileşenlerin bir veya daha fazlası sınırlayıcı olur. Bu noktada, reaksiyon yavaşlar ve plato fazına girer (Şekil 4.13'te 28-40 arasındaki döngüler).



Şekil 4.14. PCR döngülerinin sayısına karşı taban çizgisinden çıkartılan floresanı gösteren amplifikasyon grafiği

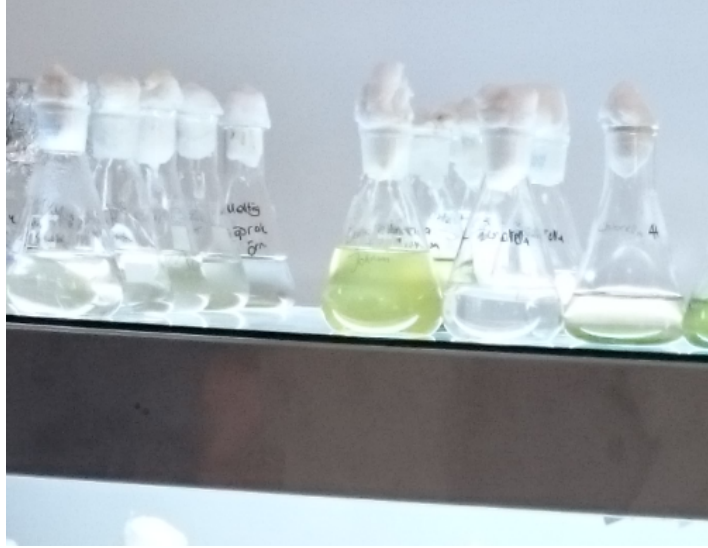
Başlangıçta, floresans arka plan seviyelerinde kalır ve floresanstaki artışlar ürün katlanarak birikirse bile saptanamaz (Şekil 4.13. 1-18 arasındaki döngüler). Sonunda, yeterli amplifiye edilmiş ürün, saptanabilir bir floresan sinyali vermek üzere birikir. Bunun meydana geldiği döngü sayısına, yenileme çevrimi veya Cq değeri denir.

Reaktifler sınırlandırılmadığında üstel fazda C_q değeri ölçülür olduğundan, gerçek zamanlı qPCR, tepkime ilerlemesini açıklayan bilinen üstel fonksiyona dayanarak tepkimedeki mevcut şablonun başlangıç miktarını güvenilir ve doğru bir şekilde hesaplamak için kullanılabilir.

5. BULGULAR VE YORUM

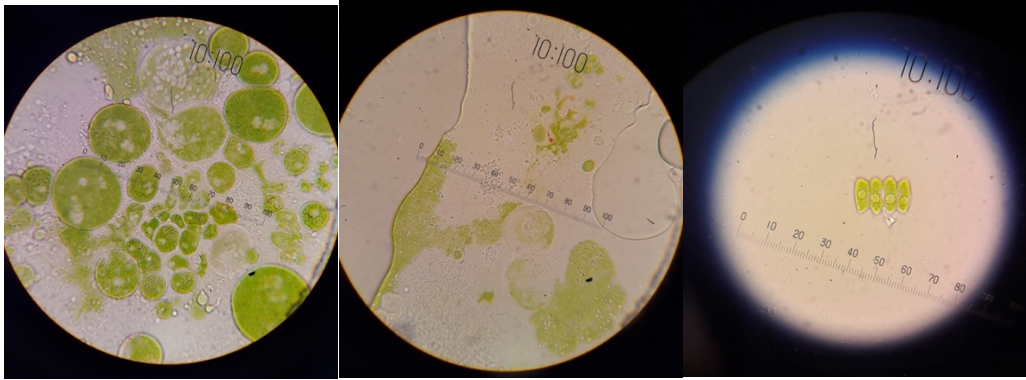
5.1. İzolasyon Bulguları

Kendilerine uygun besi ortamlarına aktarılan türlerde kısa bir süre sonra Şekil 5.1'deki gelişmeler gözlenmiştir.



Şekil 5.1 Besiye ekim yapılan kültürler

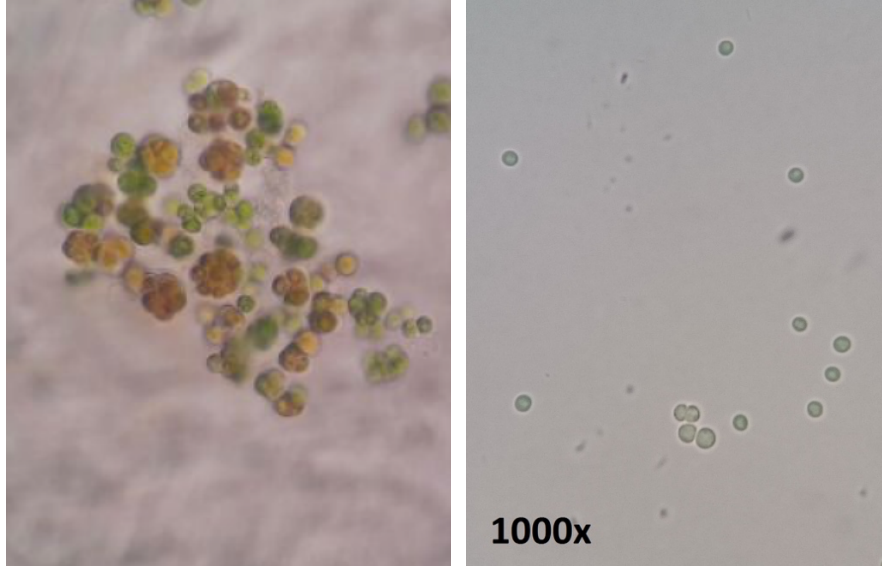
İzolasyon öncesi karışık kültürlerin mikroskoftaki görünüşleri Şekil 5.2'deki gibidir.



Şekil 5.2. İzolasyon öncesi karışık kültürler

5.2. Tanımlama Bulguları

Saflaştırma sonrasında türlerin mikroskop altındaki görüntüsü Şekil 5.3'teki gibidir.



Şekil 5.3. Türlerin izolasyon sonrası mikroskop görüntüleri (soldan sağa *Chlorella sp.*, *Synechocystis sp.*)

Saf türler erlenlerde geliştikten sonra tür tespitleri için mikroskop altında incelenmiştir. Saf türler mikroskop altında incelenip siyanobakterilerin morfolojik özelliklerinden akinet, hormogonyum ve heterosistlerinin var olup olmaması gibi özellikler belirlenerek tanımlama yapılmıştır.

“Common Freshwater Algae of the United States, An Illustrated Key to the Genera (Excluding the Diatoms)” (Dillard, 2008), “Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification” (Wehr VD., 2003) ve “Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators” (Bellinger ve Sigeo, 2010) kaynaklarına göre türler sırasıyla

- 1 numaralı mikroalg *Scenedesmus sp.*
 - 2 numaralı mikroalg *Chlorella sp.*
 - 3 numaralı mikroalg *Chroococcooccus sp.*
 - 4 numaralı mikroalg *Chlorella sp.*
 - 5 numaralı mikroalg *Synechocystis sp.*
- olarak tanımlanmıştır.

5.3. Büyüme Eğrisi Bulguları

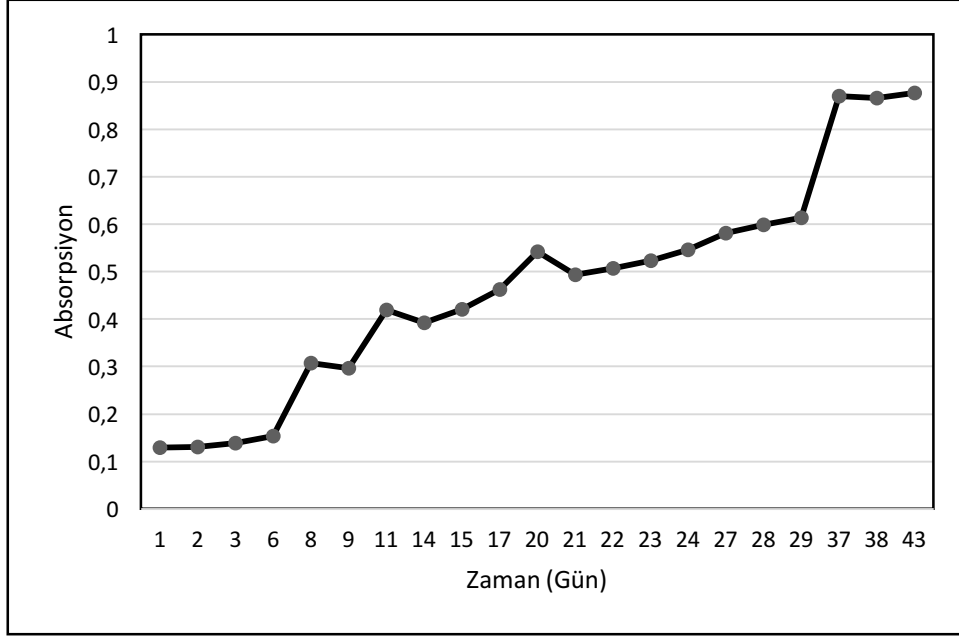
Büyüme eğrisi, mikroorganizmaların ne kadar hızlı büyüdüğünü gösterir. Bir organizmanın gelişimi sırasında hücre büyüklüğü ve hücre kütlesi artışı büyüme olarak adlandırılır. Tüm organizmaların benzersiz özelliklerinden biridir. Organizma, enerji üretimi ve hücresel biyosentez için bazı temel parametreler gerektirir. Organizmanın

büyümesi hem fiziksel hem de beslenme faktörlerinden etkilenir. Fiziksel faktörler, organizmanın büyüdüğü ortamın pH, sıcaklık, ozmotik basıncı, hidrostatik basınç ve nem içeriğini içerir. Beslenme faktörleri, büyüme ortamında sağlanan karbon, azot, kükürt, fosfor ve diğer eser elementleri içerir. Bakteri, ortam bileşenlerini kullanmaya başlar ve boyutunu ve hücre kütlesini artırır. Bakteriye büyümenin dinamikleri, hücrenin büyümesine (absorbans) karşı kuluçka süresi veya zamana karşı hücre sayısının logaritması çizilerek incelenebilir. Bu şekilde elde edilen eğri bir sigmoid eğrisidir ve standart bir büyüme eğrisi olarak bilinir. Organizmanın hücre kütlesi içindeki artış spektrofotometre kullanılarak ölçülür. Spektrofotometre, bakteri süspansiyonu tarafından emilen ışık miktarının ölçüsü olan bulanıklığı veya optik yoğunluğu ölçer. Besiyeri kültürünün bulanıklık derecesi, yaşayan ya da ölü hücreler bulunan mevcut mikroorganizma sayısı ile doğrudan ilişkilidir ve bir organizmanın hücre büyüme oranını ölçmek için uygun ve hızlı bir yöntemdir. Böylelikle ortamın bulanıklığının artması mikrobiyal hücre kütlesinin arttığını gösterir. Bulanık sıvı içerisinden geçen ışığın miktarı, emilim değerinde artan artış ile birlikte azalır. Bu çalışmadaki türlerin büyüme tablosu Çizelge 5.1'de gösterilmektedir.

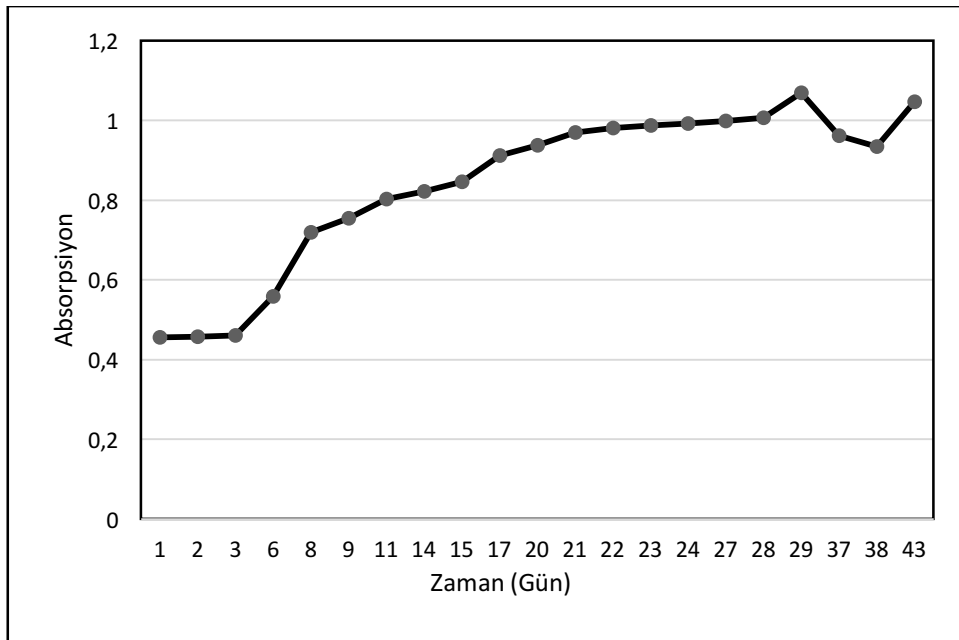
Çizelge 5.1. 685 nm'de 5 türün büyüme tablosu

ABSORPSİYON					
Gün	Scenedesmus	Chlorella 1	Chroococcus	Chlorella 2	Synechocystis
1	0,129	0,456	0,456	0,002	1,147
2	0,131	0,458	0,458	0,027	1,177
3	0,139	0,46	0,46	0,05	1,206
6	0,153	0,559	0,559	0,112	1,298
8	0,307	0,72	0,72	0,101	1,516
9	0,297	0,755	0,755	0,136	1,831
11	0,42	0,802	0,802	0,249	1,96
14	0,392	0,822	0,822	0,195	1,637
15	0,421	0,846	0,846	0,235	1,673
17	0,463	0,912	0,912	0,28	1,712
20	0,542	0,937	0,937	0,227	1,673
21	0,494	0,97	0,97	0,239	1,67
22	0,507	0,981	0,981	0,29	1,672
23	0,523	0,988	0,988	0,357	1,678
24	0,546	0,993	0,993	0,412	1,68
27	0,581	0,999	0,999	0,529	1,681
28	0,599	1,006	1,006	0,644	1,683
29	0,614	1,069	1,069	0,652	1,691
37	0,87	0,961	0,961	0,857	1,663
38	0,866	0,935	0,935	0,871	1,623
43	0,877	1,047	1,047	0,899	1,555

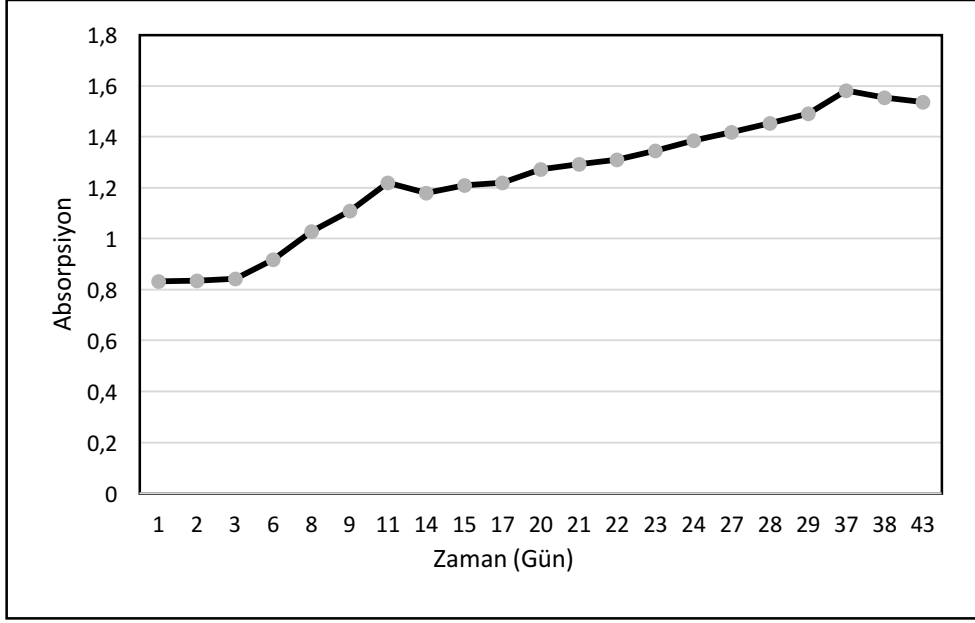
Şekil 5.4.-5.8’de 685 nm’de spektrofotometrede absorpsiyon değerleri okunan 5 türün büyüme eğrileri verilmiştir.



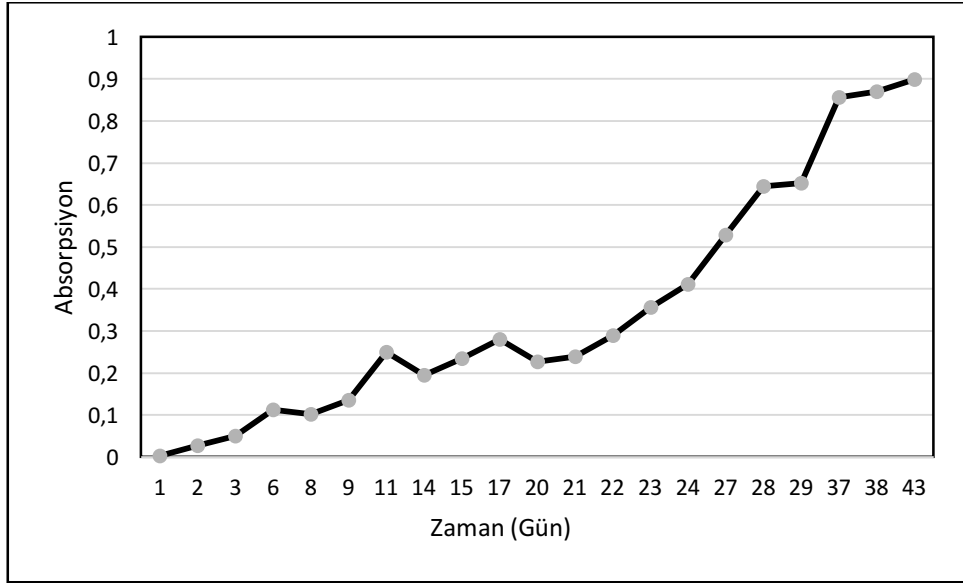
Şekil 5.4. *Scenedesmus* büyüme grafiği



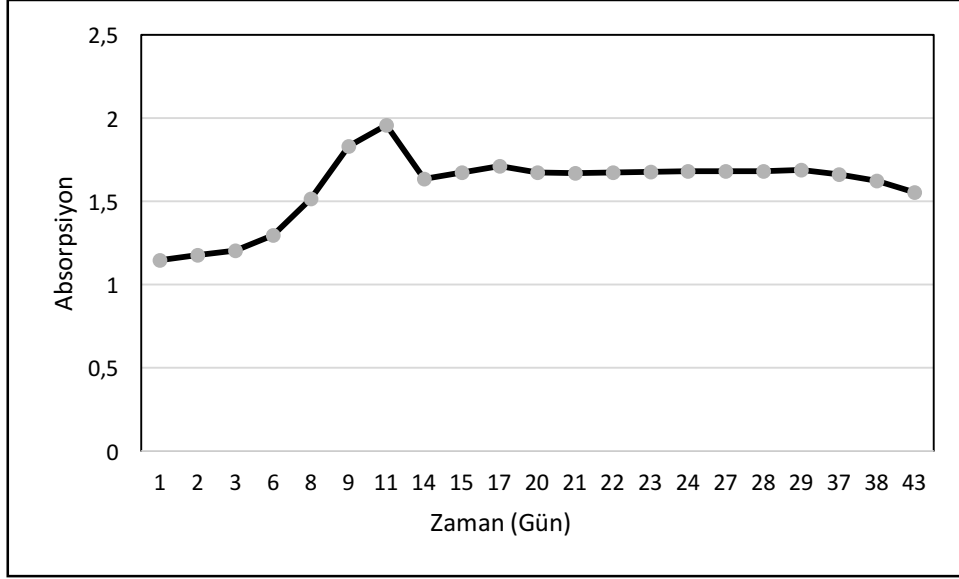
Şekil 5.5. *Chlorella 1* büyüme grafiği



Şekil 5.6. *Chroococcus* büyüme grafiği



Şekil 5.7. *Chlorella 2* büyüme grafiği



Şekil 5.8. *Synechocystis* büyüme grafiği

5.4. Büyük Hacimde Ekim Bulguları

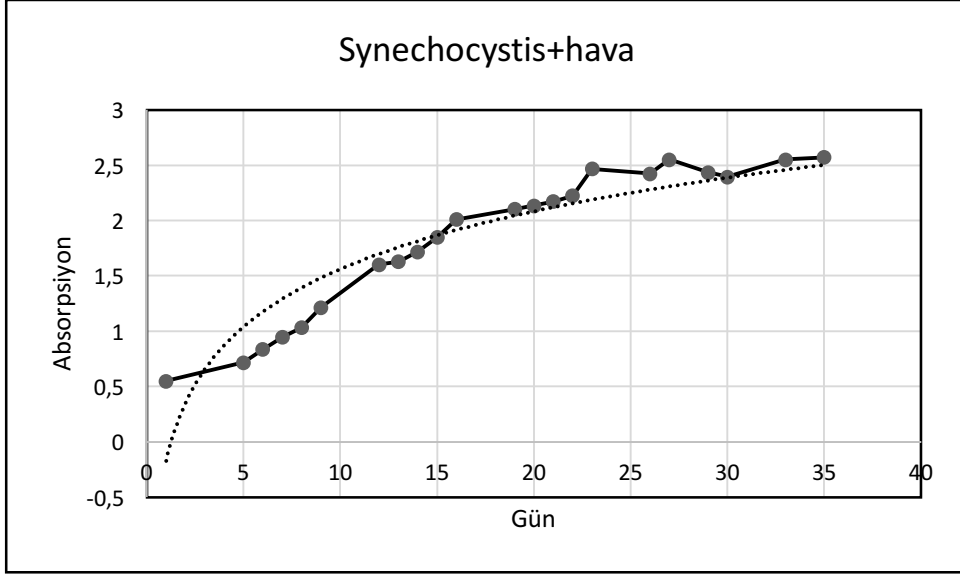
5 türün spektrofotometre okuması sonrasında *Synechocystis* sp. türündeki gelişimin diğer türlerden daha fazla olduğu gözlenince bu tür farklı koşullarda büyük hacimde üretilerek gelişmesi gözlenmiştir.

Çizelge 5.2. farklı üreme şartlarında *Synechocystis* sp. için karbon arzının mevcudiyetinin çok önemli bir faktör olduğunu göstermektedir. Karbon arzlarının karşılaştırılması için bir balon jojeye hava akımı verilmiş, bir balon jojeye NaHCO_3 ilave edilmiş ve bir balon jojeye herhangi bir karbon kaynağı eklenmemiştir.

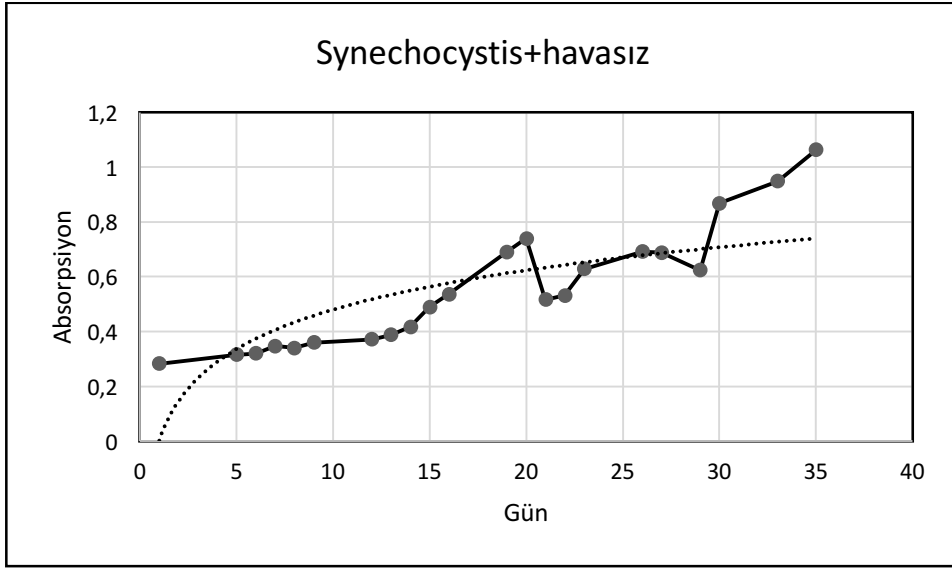
Çizelge 5.2. Farklı koşullarda büyütülen *Synechocystis sp.* türünün spektrofotometre okumaları

Gün	Synechocystis+Hava		Synechocystis+Havasız		Synechocystis+NaHCO ₃	
	Absorpsiyon	pH	Absorpsiyon	pH	Absorpsiyon	pH
1	0,549	9,1	0,283	9,1	0,235	7,8
5	0,717	9,14	0,315	9	0,605	7,7
6	0,836	9,97	0,32	9,9	0,785	8,82
7	0,944	10	0,347	10,31	0,992	8,97
8	1,032	10,1	0,34	10,36	1,163	9,2
9	1,213	9,9	0,36	9,9	1,34	8,32
12	1,602	9,43	0,371	9,72	1,623	8,36
13	1,628	9,37	0,388	9,57	1,681	9,57
14	1,719	9,4	0,417	9,5	1,732	9,62
15	1,849	9,53	0,489	9,56	1,84	9,78
16	2,011	9,99	0,536	10,14	1,884	9,85
19	2,102	9,87	0,69	10,07	1,927	9,98
20	2,135	10,17	0,74	9,57	2,094	9,92
21	2,173	10,22	0,516	10,22	2,114	10,1
22	2,223	10,43	0,531	9,5	2,189	10,2
23	2,466	10,4	0,628	9,65	2,242	10,28
26	2,422	10,36	0,692	9,72	2,26	10,32
27	2,552	10,3	0,688	9,78	2,382	10,45
29	2,436	10,27	0,624	9,86	2,395	10,43
30	2,395	10,22	0,868	10,45	2,346	10,44
33	2,552	10,25	0,949	10,52	2,408	10,75
35	2,571	9,87	1,063	10,23	2,408	10,74

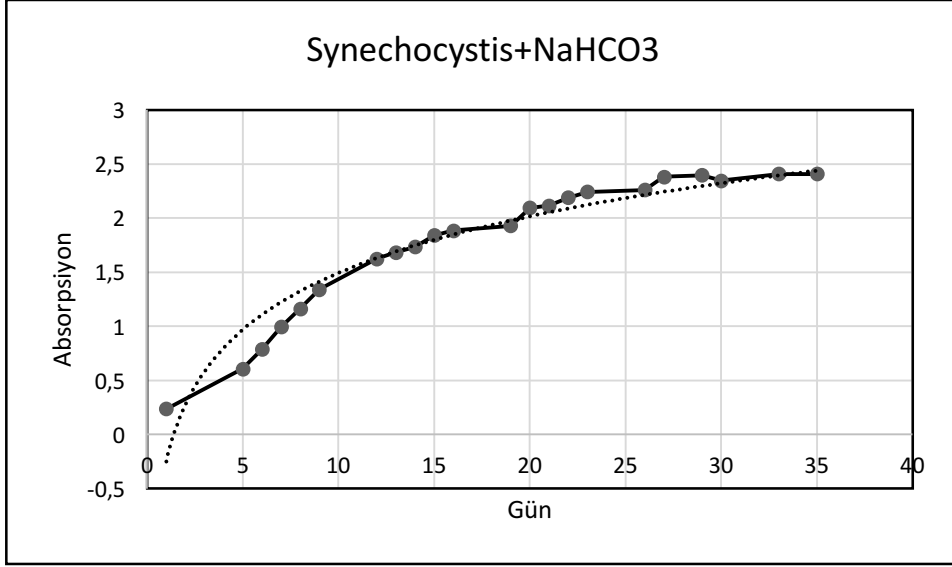
Şekil 5.9-11’de büyük hacimlerde ekimi yapılan *Synechocystis sp.* türünün 3 farklı koşuldaki büyüme grafikleri verilmiştir.



Şekil 5.9. Hava verilen Synechocystis türünün büyüme grafiği

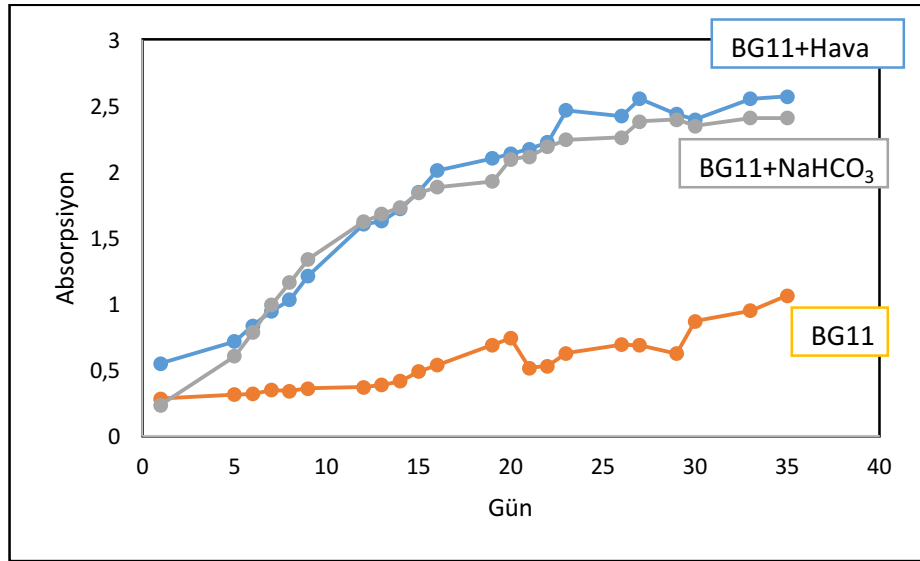


Şekil 5.10. Hava verilmeyen Synechocystis türünün büyüme grafiği



Şekil 5.11. NaHCO_3 ilavesi yapılan *Synechocystis* türünün büyüme grafiği

Hava akımı verilen balon jöle ile NaHCO_3 eklenen balon jölede spektrofotometre okumaları sonucunda çok az fark olduğu gözlemlenmiştir. Şekil 5.12’te bu büyüme grafiklerinin karşılaştırması yapılmıştır.



Şekil 5.12. *Synechocystis*'in karşılaştırmalı büyüme grafiği

5.5. Yağ İçeriği Analizi Bulguları

50'şer mL hacimler alınarak yapılan yağ analizi sonucunda *Scenedesmus*'da 7,4 mg, *Chlorella 1*'de 21,4 mg, *Chroococcus*'ta 16 mg, *Chlorella 2*'de 19,1 mg ve *Synechocystis*'te 24 mg yağ çıkartılmıştır.

Yağ içeriklerinin % kütlege miktarları sırasıyla *Scenedesmus*'da %5,83, *Chlorella 1*'de %16,85, *Chroococcus*'ta %12,59, *Chlorella 2*'de %15,03 ve *Synechocystis*'te %18,90'dır.

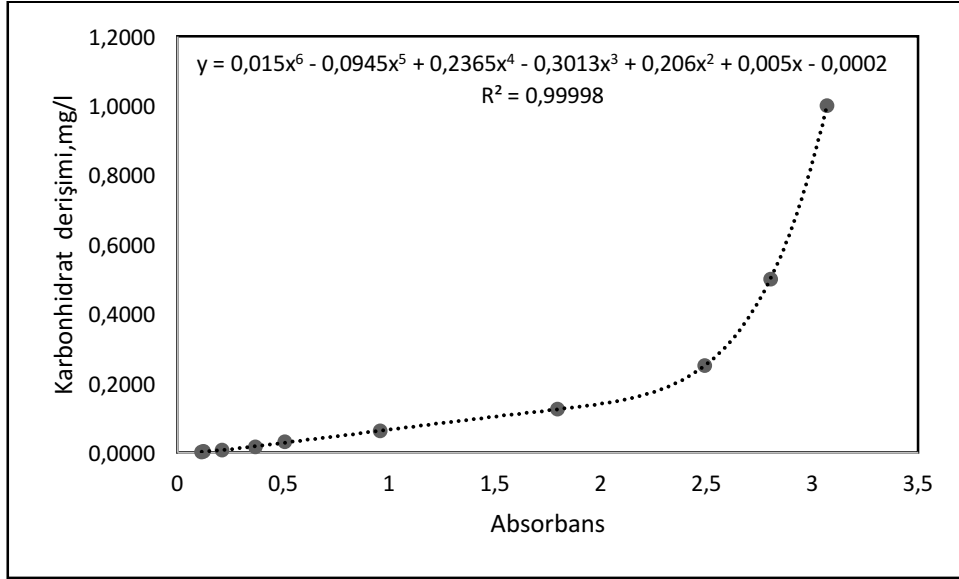
5.6. Karbonhidrat İçeriği Analizi Bulguları

Çizelge 5.3'te 5 tür ve büyük hacimde ekimlerin karbonhidrat analizi absorpsiyon değerleri verilmiştir.

Çizelge 5.3. Karbonhidrat Analizi Absorpsiyon Değerleri

Karbonhidrat Analizi Absorpsiyon Değerleri		
1	Synechocysits+Hava	3,068
		3,068
2	Synechocysits+Havasız	2,834
		2,767
3	Synechocysits+NaHCO ₃	2,498
		2,482
4	Scenedesmus	1,741
		1,849
5	Chlorella 1	0,909
		1,007
6	Chrooccooccus	0,518
		0,494
7	Chlorella 2	0,403
		0,33
8	Synechocysits	0,214
		0,204
9	Saf su	0,099
		0,06
10	Biyokütle örneği	1,576
		1,576

Şekil 5.13'te karbonhidrat analizi sonucunda elde edilen Kochert grafiği verilmiştir.



Şekil 5.13. Karbonhidrat içeriğini gösteren Kochert grafiği

5.7. Elementel Analiz Bulguları

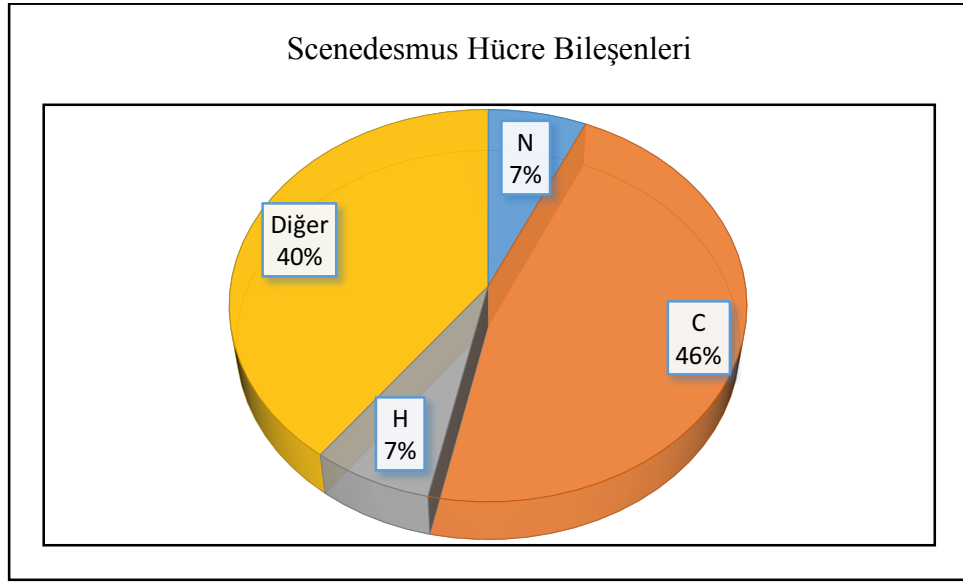
Çizelge 5.4'te 5 mikroalg türünün elementel analizi sonucunda N, C, H, S ve diğer içerikleri verilmiştir. Burada "Diğer" sütunu mikroalg hücrelerinin sahip olduğu O₂ ve eser elementleri içermektedir.

Çizelge 5.4. 5 türün yüzde kütlece elementel analiz sonuçları (alındığı gibi)

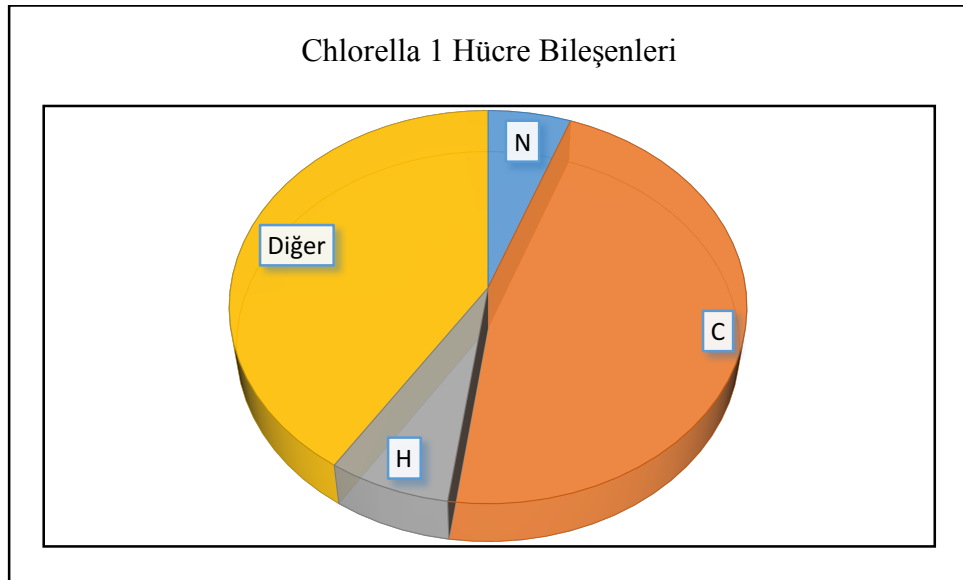
	Elementel Analiz (% kütle)				
	N	C	H	S	Diğer
Scenedesmus	6,852253437	46,48316956	6,81872797	0	39,84584903
	6,705587864	46,72403336	6,897358418	0	39,67302036
Chlorella 1	5,670260906	46,89763641	7,04910326	0	40,38299942
	5,716770649	46,24393463	6,875596046	0	41,16369868
Chroococcus	10,96674728	45,28276062	6,730723858	0	37,01976824
	10,70006085	43,11155701	6,675570011	0	39,51281213
Chlorella 2	5,734289646	37,21627426	5,942872047	0	51,10656405
	5,712797165	37,8362999	5,748279572	0	50,70262336
Synechocystis	7,281270027	40,58692169	6,274565697	0	45,85724259
	7,274532318	40,34711838	6,16831255	0	46,21003675

5 tür mikroalg için arazi ve laboratuvar çalışmaları; örneklerin ekimi ve izolasyonu en uygun yöntemlerle yağ, karbonhidrat analizleri, protein içeriği tespiti ve elementel analizleri; tam tür tespiti için PCR saflaştırması ve DNA dizi analizi yapılmıştır.

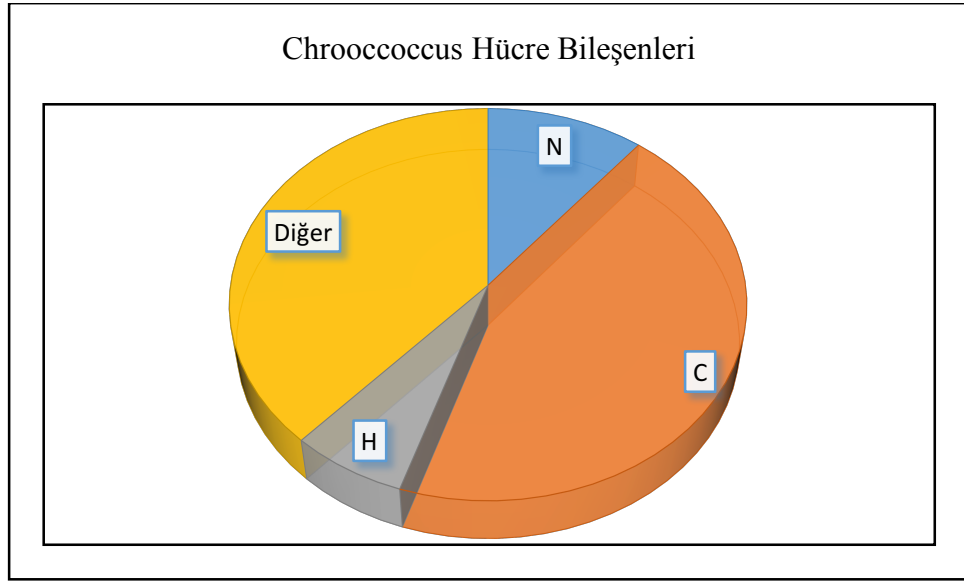
Elementel analizler sonrasında çalışılan 5 türün hücre bileşenleri aşağıdaki şekillerde verilmiştir.



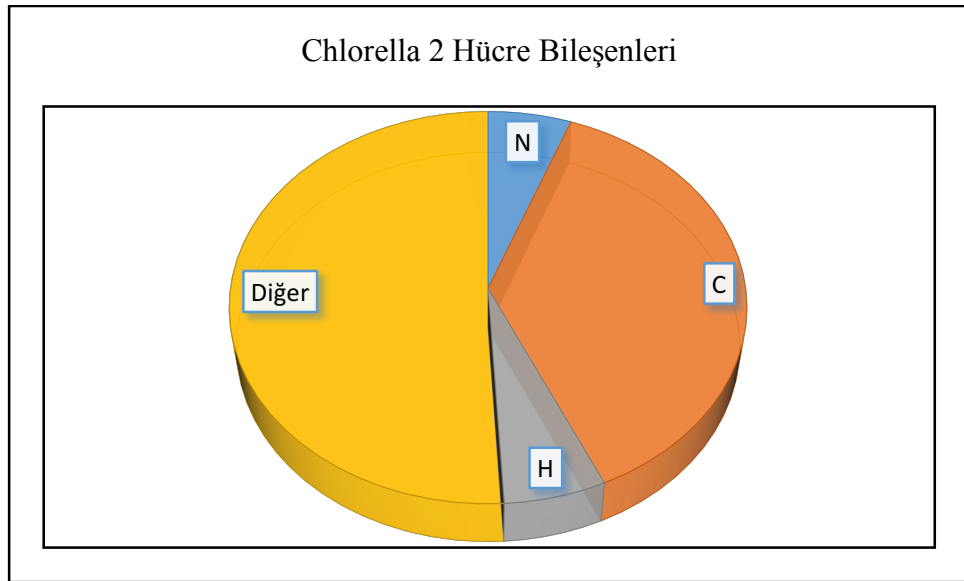
Şekil 5.14. *Scenedesmus* hücre bileşenleri



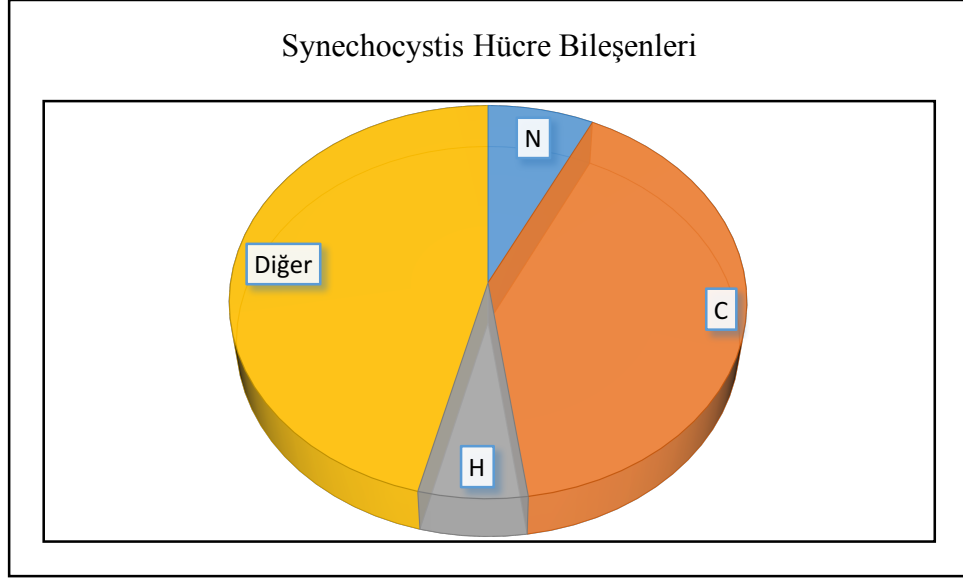
Şekil 5.15. *Chlorella 1* hücre bileşenleri



Şekil 5.16. *Chroococcus* hücre bileşenleri



Şekil 5.17. *Chlorella 2* hücre bileşenleri



Şekil 5.18. *Synechocystis* hücre bileşenleri

5.8. Protein İçeriği Hesaplaması Bulguları

Protein (% , kütle/kütle) = N içeriği (% , kütlece) x 5,95 (López vd., 2010.)

Çizelge 5.5. Protein içeriği tespiti

	Elementel Analiz	
	N	Protein içeriği
Scenedesmus	6,852253437	40,77090795
	6,705587864	39,89824779
Chlorella 1	5,670260906	33,73805239
	5,716770649	34,01478536
Chroococcus	10,96674728	65,25214632
	10,70006085	63,66536206
Chlorella 2	5,734289646	34,11902339
	5,712797165	33,99114313
Synechocystis	7,281270027	43,32355666
	7,274532318	43,28346729

5.9. Tür Seçimi ve Yorumlamaları

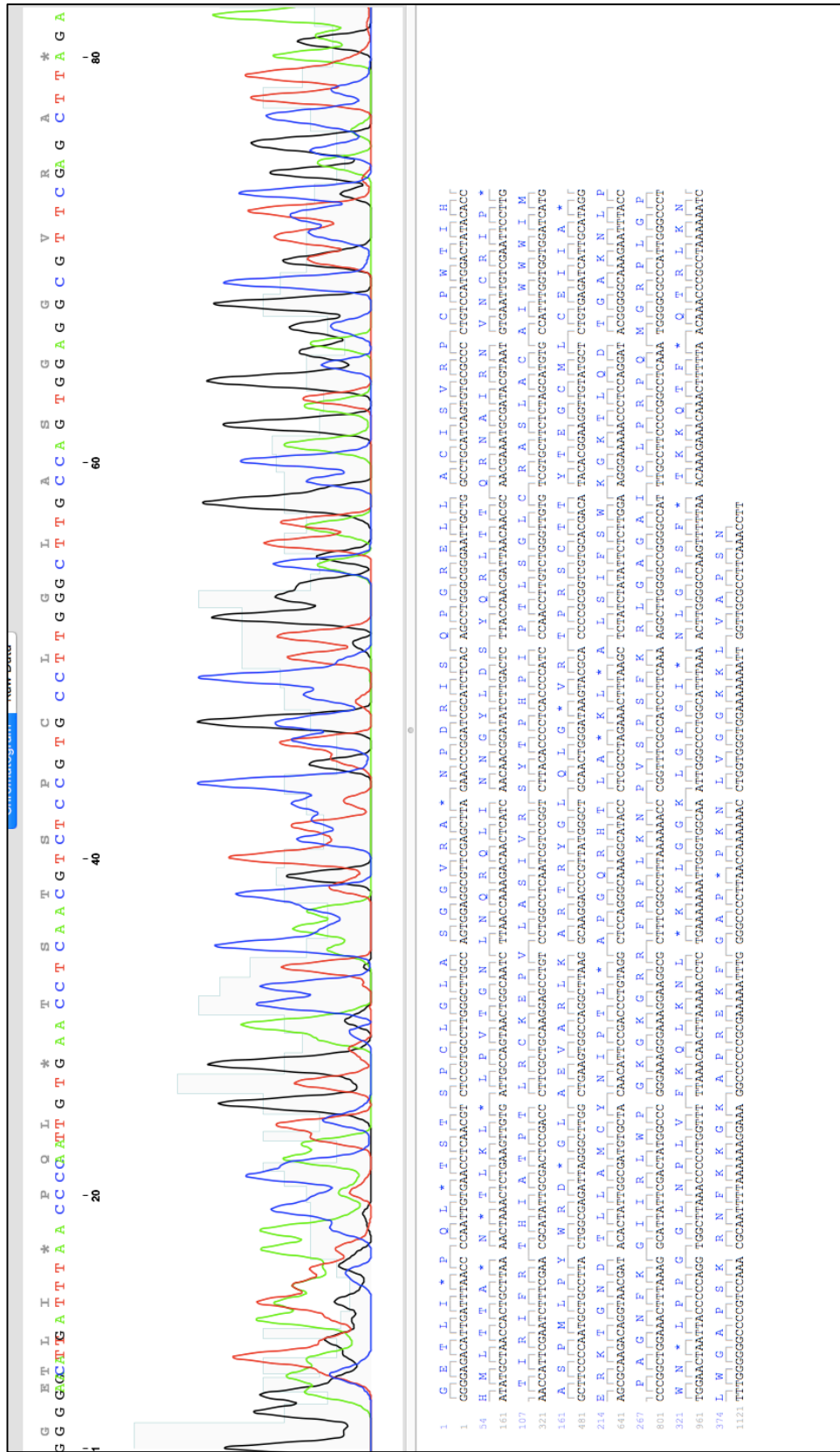
Deneyle sonuçunda siyanobakterilerde en çok yağ içeriği *Synechocystis* türüne aittir. İkinci olarak en çok yağ içeriği *Chroococcus* türünüdür. Deneyle sonuçunda mikroalglerde en çok yağ içeriği *Chlorella 1* türüne aittir. Biyoyakıt üretimi için önemli olan kriter yağ içeriği olduğundan siyanobakteriler arasından *Synechocystis*, mikroalgler arasından *Chlorella 1* türleri uygundur.

5.10. DNA Analizi Yorumları

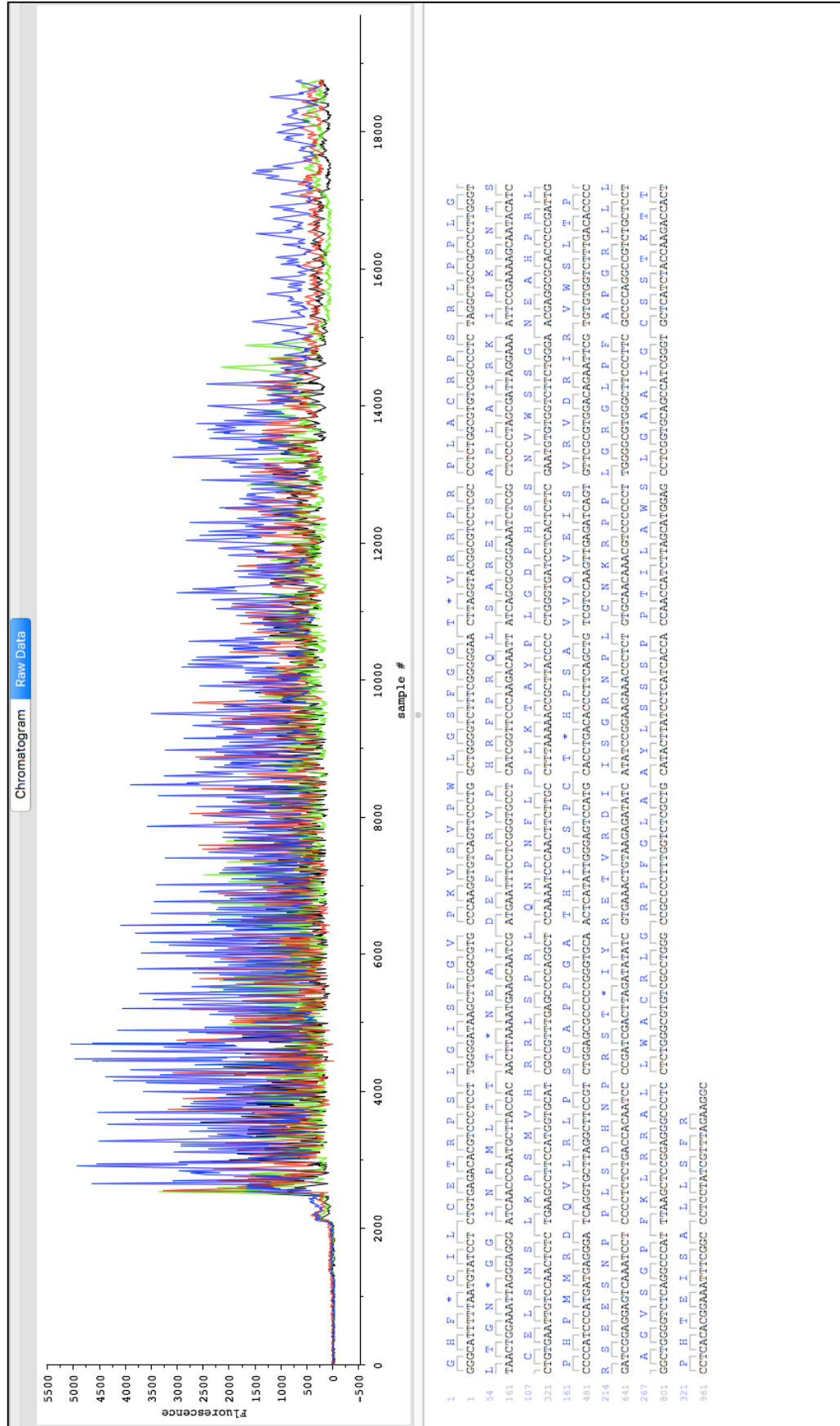
5 türün öncelikle PCR ile saflaştırılması yapıp sonrasında DNA dizi analizi ile DNA sarmalı açık bir şekilde kromotogramlar ile verilmiştir.

Şekil 5.19.'de *Scenedesmus*, Şekil 5.21.'de *Chlorella 1*, Şekil 5.23.'de *Chroococcus*, Şekil 5.25.'te *Chlorella 2* ve Şekil 5.27.'de *Synechocystis* türlerinin kromotogram sonuçları verilmiştir.

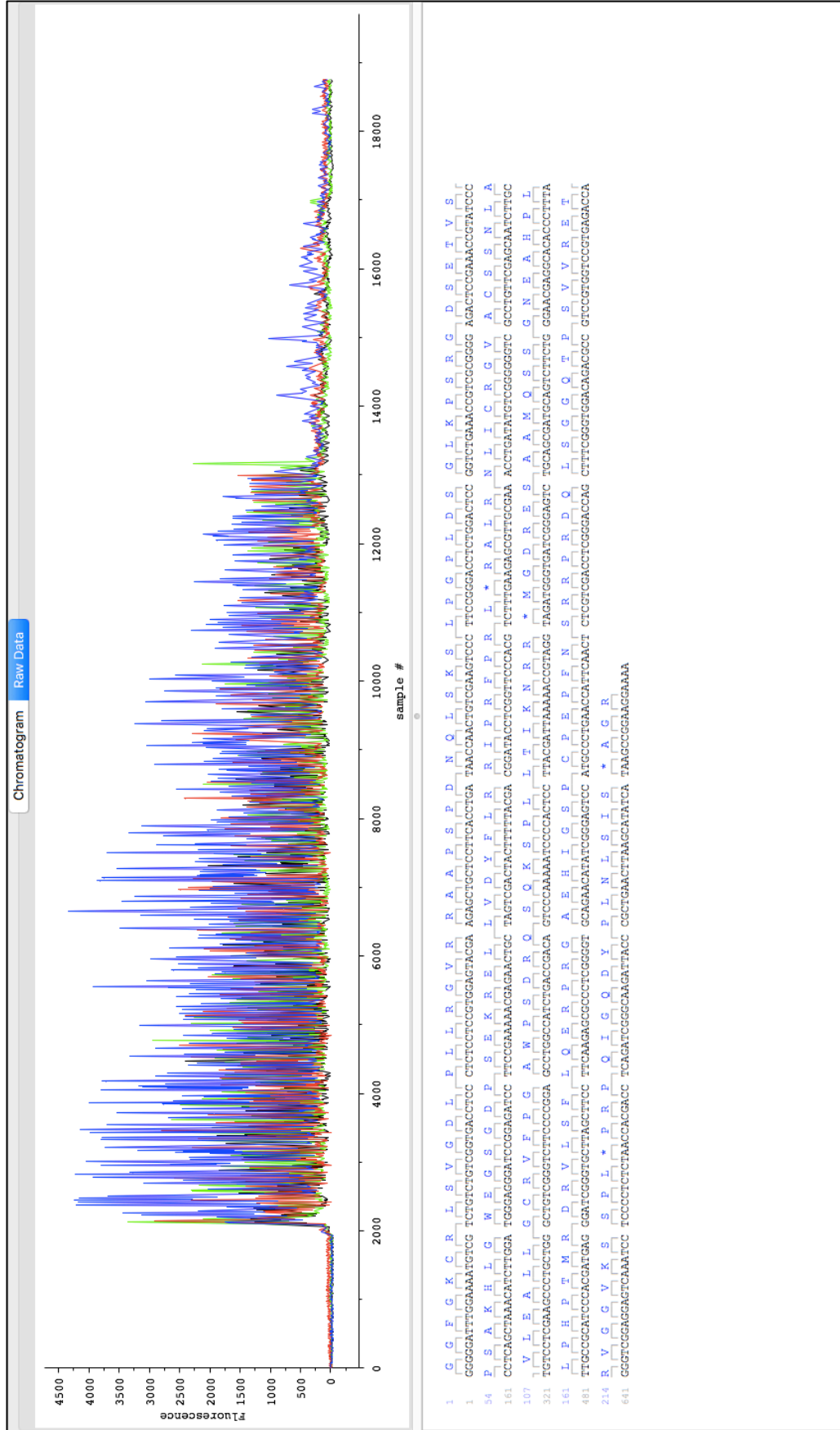
Şekil 5.20.'de *Scenedesmus*, Şekil 5.22.'de *Chlorella 1*, Şekil 5.24.'de *Chroococcus*, Şekil 5.26.'de *Chlorella 2* ve Şekil 5.28'de *Synechocystis* türlerinin ham verileri verilmiştir.



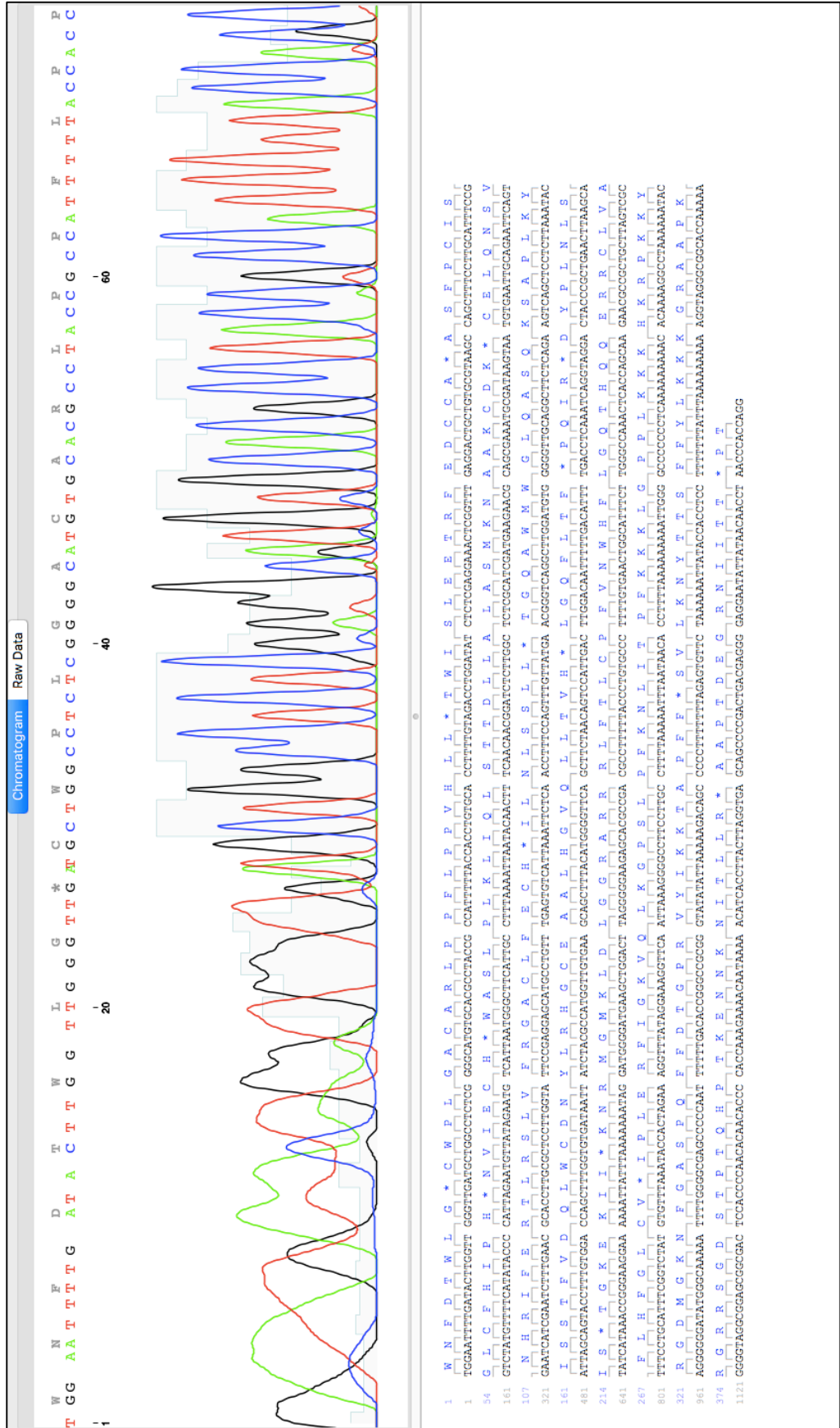
Şekil 5.19. *Scenedesmus* kromotogram sonuçları



Şekil 5.22. *Chlorella 1* ham veriler



Şekil 5.24. *Chroococcus ham veriler*



Şekil 5.27. *Synechocystis* kromotogram sonuçları

6. SONUÇ, TARTIŞMA ve ÖNERİLER

Mavi yeşil alglerin yetiştirilmesinde üst ve alt sıcaklık limiti arasında büyük farklar vardır. Üst sıcaklık limiti genelde optimum sıcaklığın birkaç derece üzerindeyken alt sıcaklık limiti daha esnektir. Hamam suyu gibi sıcak kaynaklarda bulunan mavi yeşil alglerden bazıları optimum 45°C’de yetiştirilebilirken bu tez çalışmasında hamam suyu çıkışında 35°C’de yaşayan mezofilik mikroalgler kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasında kullanılan mikroalglerin biyoyakıt üretiminde hammadde olarak kullanımıyla ilgili literatürde çalışmalar mevcuttur ancak çalışmadaki siyanobakterilerle ilgili literatürde bir çalışma mevcut değildir. Siyanobakteriler yağlarını tilakoid membranlarında biriktirirler ve genetik manipülasyonlara daha uygundur bu nedenlerden ötürü mikroalgal biyodizel üretiminde kullanımları daha avantajlı olsa da literatürde konuyla ilgili çalışma yoktur. Çalışmamızda literatürde incelenmemiş *Chroococcoccus* sp. ve *Synechocystis* sp. türleri çalışılmıştır.

Literatür çalışmalarında ökaryotik mikroalglerin yağ içeriğini belirlemede en yaygın olarak *Chlorella* sp. kullanılmıştır. Bu çalışmada yaygın olarak kullanılan *Chlorella* sp. türünün yanı sıra daha az kullanılan *Scenedesmus* sp. mikroalgi de kullanılmıştır.

Ökaryotik mikroalglerle yapılan literatür çalışmalarında tek pH değeri kullanılmıştır. Besiyerleri genellikle 4.9-8.3 pH aralığındayken çalışılmıştır (Chinnasamy vd., 2010; Damiani vd., 2010; Widjaja vd., 2009; Samori vd., 2010). Bu tez çalışmasında başlangıçtaki ekimlerde pH 7.5-8 aralığında iken, büyük hacimde ekimlerde 9-10.5 aralığındadır. Çalışmalar sırasında pH değerini etkileyecek bir ilave yapılmamıştır, ölçülen pH değerleri ortamın kendi pH’ıdır.

Siyanobakterilerin taksonomik çeşitliliği ve yetersiz veriler bu organizmalar üzerinde yapılacak çalışmaları çekici hale getirmektedir. Çalışmada numune alınan bölgelerde daha önce filoristik bir çalışma yapılmamıştır. Bundan dolayı çalışmada seçilen alan literatüre katkı sağlamaktadır. Siyanobakterilerin sıvı ve katı ortamlarda üretilmeleri zor olduğu için bölgedeki sıcak su kaynaklarının yüzey sularından örnek alınmıştır.

Siyanobakterilerde BG11 kullanılması ile prokaryotik ve ökaryotik heterotrof mikroorganizmalar engellenmiştir.

Bitkileri etkileyen tuzluluk ve ozmotik stresler zirai açıdan önemli bakteriler için de stres kaynağıdır ve ürün verimini sınırlamaktadır. Siyanobakteriler çevresel streslere karşı

daha dayanıklı olmalarına rağmen (Fogg vd., 1973), tuzluluk ve ozmotik streslere farklı hassasiyetler gösterirler (Fernandes vd., 1993).

Işık şiddeti arttıkça mikrobiyel gelişimin arttığı; azaldıkça da mikrobiyel gelişimin azaldığı bilinmektedir. Ökmen ve Dönmez (2007) yaptıkları çalışmada en az 300 lükste mikrobiyel gelişim olduğunu belirtmektedir. Bu çalışmada floresan lambalar ile 500 lüks ışık sağlanmış, ayrıca ışıklı tabla güneş ışığı alabilecek şekilde konumlandırılmıştır.

Guillard ve Morton (2003) tarafından yapılan çalışmada prokaryot algleri saflaştırma basamakları belirtilmiştir. Burada bir saflaştırma yapılmıştır. Ancak bu tez çalışmasında alınan örnekler iki izolasyon yönteminden geçirilmiş ve böylelikle istenmeyen türlerin gelişmesine olanak sağlanmamıştır. Yaygın izolasyon yöntemlerinden biri olan agar plakaya çizgi ekim yöntemi ve daha az kullanılan kılcal pipetle tek tür izolasyonu yapılmıştır.

Saf türler tanımlanırken sadece 2-40 µm çaplarında veya tek hücreli yapılarda olmaları yeterli görülmeyip konuda yazılmış iki ana kaynağa başvurulmuştur.

Saf türlerin tespitlerinde kesin sonuç almak için DNA analizi yapılmıştır. Türlerin DNA'ları DNA kiti kullanılarak izole edilip, PCR işlemi 27F-809R primer dizileri kullanılarak yapılmıştır.

Elementel analizler sonrasında çalışılan 5 türün hücre bileşenleri Şekil 5.14-18'de verilmiştir. Bu şekillerden ve Folch yöntemiyle elde edilen yağ miktarlarından yola çıkılarak yağ içeriği en çok mikroalgler arasında *Chlorella 1* türüne, siyanobakteriler arasında ise *Synechocystis* türündedir.

Synechocystis türü küçük hücre yapısı nedeniyle zor parçalanmaktadır. Bu da yağ içeriğini çıkartmaya çalışırken deneysel anlamda zorluklar çıkartmaktadır. Uygulanan metodolojinin bazı aşamalarında farklı teknikler kullanılması durumunda hücre yapısı kolayca parçalanıp daha çok yağ üretimi sağlanabilir.

Synechocystis gibi küçük hücre çapına sahip siyanobakterilerin ekstrakte edilebilmesini kolaylaştıracak yöntemler geliştirilebilir veya ince hücre zarına sahip siyanobakteriler tercih edilebilir. Filamentli siyanobakteriler de araştırılabilir. Kullanılan yöntemler geliştirilerek farklı alg türlerinden de yağ eldesi sağlanabilir.

KAYNAKÇA

- Abdulkhani, A., Alizdeh, P., Hedjazi, S., Hamzeh, Y. (2017). Potential of Soya as a raw material for a whole crop biorefinery. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 75, 1269-1280.
- Akoğlu, A., akmakçı, M.L. (2011). Siyanobakterilerden Elde Edilen Fikosiyaninin Kullanım Alanları, *Su Ürünleri Dergisi*, 28, 137-141.
- Aksay, C. S. Ketenoğlu, O. ve Kurt, L. (2005). “Küresel Isınma ve İklim Değişikliği”, *Selçuk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, 25. 29-42.
- Alper, D. ve Anbar, A. (2008). İklim Değişikliğinin Finansal Hizmet Sektörüne Etkileri, *Elektronik Sosyal Bilimler Dergisi*, 7, 223-253.
- Andersen, A.R., (2005). *Algal Culturing Techniques*, Elsevier Academic Press 30 Corporate Drive, Suite 400, Burlington, MA 01803, USA, 100-250 pp.
- Atay, D. (1974). A study on variations in the chemical composition of *cystoseira barbata* (seaweed) from Eastern Black Sea and using them as supplements for rations for chicks and chickens, *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi yayınları*, 540, Ankara, 104s.
- Baroukh, C., Munoz-Tamayo, R., Steyer, J.P., Bernard, O. (2015). A state of the art of metabolic networks of unicellular microalgae and cyanobacteria for biofuel production. *Metabolic Engineering*, 30, 49-60.
- Becker, E.W., (1995). *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*, Cambridge University Press, 158-160 pp.
- Bellinger, E.G., ve Sigeo, D.C. (2010). *Freshwater Algae Identification and Use as Bioindicators*, Wiley-Blackwell.
- Berman-Frank, I., Lundgren, P., ve Falkowski, P., (2003). Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Res. Microbiol.* 154, 157-164.
- Bhatti, H.N., Hanif, M.A., Qasim, M. and Rehman, A. (2008). Biodiesel production from waste tallow. *Fuel*, 87, 2961-2966.
- Boyer, S.L., Flechtner, V.R., ve Johansen, J.R. (2001). Is the 16S-23SrRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in cyanobacteria. *Mol. Biol. Evol.* 18, 1057-1069.
- BP Statistical Review of World Energy, (2012). British Petroleum (BP), London, UK.

- Brown M.V., Schwalbach M.S., Hewson I., Fuhrman J.A. (2005). Coupling 16S-ITS rDNA clone libraries and automated ribosomal intergenic spacer analysis to show marine microbial diversity: development and application to a time series. *Environ. Microbiol.* 7, 1466-1479.
- Bryant, D.A., (2006). *Advances in Photosynthesis The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Vol. 2, CPI, USA.
- Burlew, S. J., (1953). *Algal Culture From Laboratory to Pilot Plant*, Carnegie Institution of Washington Publication 600 Washington D.C., 200-450 pp.
- Carioca, J.O.B., Filho, J.J.H., Leal, M.R.L.V. and Macambira, F.S., (2009). The hard choice for alternative biofuels to diesel in Brazil, *Biotechnology Advances*, 27, 1043-1050.
- Casamatta, D.A., Johansen, J.R., Vis, M.L. ve Broadwater, S.T. (2005). Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the Oscillatoriales (Cyanobacteria). *J. Phycol.* 41, 421-438.
- Chinnasamy, S., Bhatnagar, A., Hunt, R. W. and Das K.C. (2010). Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresource Technology*, 101, 3097–3105.
- Chisti, Y., (2007). Biodiesel from microalgae, *Biotechnology Advances*, 25, 294–306.
- Ciccarelli, F.D., Doerks, T., von Mering, C., Creevey, C.J., Snel, B., ve Bork, P. (2006). Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science*. 311, 1283-1287.
- Cirik, Ş., (1981). Algae in Turkish sea and their means of evaluation, *Çevre Haberleri Boğaziçi Üniversitesi Yayınları*, İstanbul, 9, 65-68.
- Converti, A., Casazza, A.A., Ortiz, E.Y., Perego.P. and Borghi, M.D. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing*. 48, 1146–1151.
- Çanka Kılıç, F. (2011). Biyogaz, Önemi, Genel Durumu ve Türkiye’deki Yeri, *Mühendis ve Makina*, 52 (617), 94-106.
- Damiani, M.C., Popovich, C.A., Constenla, D. and Leonardi, P.I. (2010). Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock. *Bioresource Technology*, in press.

- Dillard, G.E. (2008). Common Freshwater Algae of the United States An Illustrated Key of the Genera (Excluding the Diatoms), J.Cramer Publishing.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., ve Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- Fernandes, T.A., Iyer, V. ve Apte, S.K. (1993) Differential Responses of Nitrogen Fixing Cyanobacteria to Salinity and Osmotic Stresses, *Appl Environ Microb*, 59, 899-904.
- Fogg, G.E., Stewart, W.D.P., Fay, P. ve Walsby, A.E. (1973) *The Blue-green Algae*. Academic Press, London and New York. 450s.
- Fox, G.E., Wisotzkey, J.D., ve Juttshuk, P., Jr. (1992). How close is close: 16S Rna sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 166-170.
- Gadagkar S.R., Rosenberg M.S., Kumar S. (2005). Inferring species phylogenies from multiple genes: concatenated sequence tree versus consensus gene tree. *J. Exp. Zool.* 304B, 64-74.
- Garcia-Pichel F. (2008). Molecular ecology and Environmental Genomics. In: *The cyanobacteria: molecular biology, genomics and evolution*, A. Herrero, (Ed), Horizon Sci.Press, London.
- Garcia-Pichel, F., Prufert-Bebout, L., Muyzer, G. (1996). Phenotypic and phylogenetic analyses show *Microcoleus chthonoplastes* to be a cosmopolitan cyanobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3284-3291.
- Garczarek, L., van der Staay, G.W.M., Hess, W.R., Le Gall, F., ve Partensky, F. (2001). Expression and phylogeny of the multiple antenna genes of the low-light-adapted strain *Prochlorococcus marinus* SS120 (Oxyphotobacteria). *Plant Mol. Bol.* 46, 683-693.
- Genç, N. (2009). Biyolojik hidrojen üretim prosesleri, BAÜ FBE Dergisi, 11, 17-36.
- Gogarten, J.P., Doolittle, W.F., ve Lawrence, J.G. (2002). Prokaryotic evolution in light of gene transfer. *Mol. Biol. Evol.* 19, 2226-2238.
- Grula, J.W. (2005). Evolution of the photosynthesis and the biospheric oxygenation contingent upon nitrogen fixation. *Int. J. Astrobiol.* 4, 251-257.

- Guillard, R.R.L. ve 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, 77-97s.
- Güner, H., ve Aysel., V., (1999). The systematic of Cryptogams, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No: 108, 249s.
- Hansmann, S., ve Martin, W. (2000). Phylogeny of 33 ribosomal and six other proteins encoded in an ancient gene cluster that is conserved across prokaryotic genomes: influence of excluding poorly alignable sites from analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 1655-1663.
- Hashimoto, Y., Kamiya, H., Yamazato, K., ve Nowaza, K. (1976). Occurrence of a toxic blue-green alga inducing skin dermatitis in Okinawa. In *Animal, Plant, and Microbial Toxins*, Vol. 1, A., Ohsaka, K., Hayashi, ve Y., Sawai, ed. (New York: Plenum Publishing), 333-338.
- Hawser, S.P., Codd, G.A., Carpenter, E.J., ve Capone, D.G. (1991). A neurotoxic factor associated with the bloom-forming cyanobacterium *Trichodesmium*. *Toxicon* 29, 277-278.
- Henson, B.J., Hesselbrock, S.M., Watson, L.E. ve Barnum, S.R. (2004). Molecular phylogeny of the heterocystous cyanobacteria (subsections IV and V) based on *nifD*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 493-497.
- Honda D., Yokota A., Sugiyama J. (1999). Detection of seven major evolutionary lineages in cyanobacteria based on the 16S rRNA gene sequence analysis with new sequences of five marine *Synechococcus* strains. *J Mol Evol.* 48, 723-739.
- Huang, G.H., Chen, F., Wei, D., Zhang, X.W., Chen, G. (2010). Biodiesel production by microalgal biotechnology, *Applied Energy*, 87, 38-46.
- Hugenholtz, P., Goebel, B.M., Pace, N.R. (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180, 4765-4774.
- <http://www.eie.gov.tr/yenilenebilir/biyodizel.aspx>, Erişim tarihi: 05.12.2017.
- Janson, S., Wouters, J., Bergman, B., Carpenter, E.J. (1999). Host specificity in the *Richelia*-diatom symbiosis revealed by *hetR* gene sequence analysis. *Environ. Microbiol.* 5, 431-438.

- Kaplan, A., Hagemann, M., Bauwe, H., Kahlon, S., ve Ogawa, T. (2008). Carbon Acquisition by Cyanobacteria: Mechanisms, Comparative Genomics and Evolution, *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution* (Edited by: Antonia Herrero and Enrique Flores). Caister Academic Press, U.K.
- Kaykaç, O. G., Cirik, Ş., Tekinay, A. A. (2008). Yeşil deniz alglerinden *Ulva rigida* C. Agardh' nın besin kompozisyonu ve aminoasit içeriklerinin mevsimsel Değişimi, *Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 25, 9-12.
- Kharecha, P., Kasting, J., ve Siefert, J. (2005). A coupled atmosphere-ecosystem model of the early Archean Earth. *Geobiology* 3, 53-76.
- Knoll, A.H. (1989). The paleomicrobiological information in Proterozoic rocks. In *Microbial Mats: Physiological Ecology of Benthic Microbial Communities*, Y. Cohen ve E. Rosenberg düzenlemesi. Washington, DC: ASM Press, 469-485.
- Knoll, A.H. (2003). *Life on a Young Planet*. Princeton: Princeton University Press.
- Knoll, A.H. (2008). *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution* (Edited by: Antonia Herrero and Enrique Flores). Caister Academic Press, U.K.
- Koski, L.B., Golding, G.B. (2001). The closest BLAST hit is often not the nearest neighbor. *J Mol Evol.* 52, 540-542.
- Lamour V, Quevillon S, Diriong S, N'Guyen VC, Lipinski M, Mirande M. (1994). Evolution of the Glx-tRNA synthetase family: the glutaminyl enzyme as a case of horizontal gene transfer. *Proc Natl Acad Sci. USA* 91, 8670-8674.
- Lodders, N., Stackebrandt, E., Nübel, U. (2005). Frequent genetic recombination in natural populations of the marine cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*. *Environ Microbiol.* 3, 434-442.
- Lopez, C.V.G., Garcia, M.D.C.C., Fernandez, F.G.A., Bustos, C.S., Chisti, Y., Sevilla, J.M.F. (2010). Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass, *Biosource Technology*, 101, 7587-7591.
- Machado, M.P.I., Atsumi, S., (2012). Cyanobacterial biofuel production. *Journal of Biotechnology*, 162-1, 50-56.
- Meeks, J.C., Elhai, J., Thiel, T., Potts, M., Larimer, F., Lamerdin, J., Predki, P., Atlas, R. (2001). An overview of the genome of *Nostoc punctiforme*, a multicellular, symbiotic cyanobacterium. *Photosynth. Res.* 70, 85-106.

- Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., ve Xian, M. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, *34*, 1-5.
- Moikeha, S.N., ve Chu, G.W. (1971). Dermatitis-producing alga *Lyngbya majuscula* Gomont in Hawaii. II. Biological properties of the toxic factor. *J. Phycol.* *7*, 8-13.
- Morowvat, M.H., Rasoul-Amini, S. ve Ghasemi. Y. (2010). Chlamydomonas as a new organism for biodiesel production. *Bioresource Technology*. *101*, 2059– 2062.
- N. Schuergers, T. Lenn, R. Kampmann, M.V. Meissner, T. Esteves, M. Temerinac-Ott, J.G. Korvink, A.R. Lowe, C.W. Mullineaux, A. Wilde, (2016). Cyanobacteria use micro-optics to sense light direction. *eLife*, *5* p. e12620.
- Nakamura, Y., Kaneko, T., Sato, S., Mimuro, M., Miyashita, H., Tsuchiya, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Kawashima, K., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Takeuchi, C., Yamada, M., Tabata, S. (2003). Complete genome structure of *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, a cyanobacterium that lacks thylakoids (supplement). *DNA Res.* *10*, 181-201.
- Ohtani, I., Moore, R.E., ve Runnegar, M.T.C. (1992). Cyindrospermopsin, a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cyindrospermopsis raciborskii*. *J. Am. Chem. Soc.* *114*, 7941-7942.
- Oliver, N.J., Rabinovitch-Deere, C., Carroll, A.L., Nozzi, N.E., Case, A.E., Atsumi, S. (2016). Cyanobacterial metabolic engineering for biofuel and chemical production. *Current Opinion in Chemical Biology*, *35*, 43–50.
- Olsen, G.J., Lane, D.J., Giovannoni, S.J., Pace, N.R., Stahl, D.A. (1986). Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.* *40*, 337-365.
- Ökmen G. ve Dönmez G. (2007). Işık şiddetlerinin Çeltik Alanlarından İzole Edilen Siyanobakterilerde Üremeye ve Nitrojenaz Aktivitesine Etkisi, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, *37*, 5-10.
- Pace, N.R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*. *276*, 734-740.
- Rappé, M.S., Giovannoni, S.J. (2003). The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* *57*, 369-94.
- REN21, (2012). Renewables 2012 Global Status Report, Renewables Energy Policy Network for the 21st Century (REN21), Paris, France.

- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., ve Stainer, R.Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* *111*, 1-61.
- Rocap, G., Distel, D.L., Waterbury, J.B., ve Chisholm, S.W. (2002). Resolution of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* ecotypes by using 16S-23S ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* *68*, 1180-1191.
- Rodionova, M.V., Poudyal, R.S., Tiwari, I., Voloshin, R.A., Zharmukhamedov, S.K., Nam, H.G., Zayadan, B.K., Bruce, B.D., Hou, H.J.M. ve Allakhverdiev, S.I. (2017). Biofuel production: Challenges and opportunities. *Int. Journal of Hydrogen Energy.* *42*, 8450-8461.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. ve Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* *239*, 487-491.
- Samori, C., Torri, C., Samori, G. Fabbri, D., Galletti, P., Guerrini, F., Pistocchi, R. ve Tagliavini E. (2010). Extraction of hydrocarbons from microalga *Botryococcus braunii* with switchable solvents. *Bioresource Technology.* *101*, 3274-3279.
- Sanchez-Baracaldo, P., Hayes, P.K., ve Blank, C.E. (2005). Morphological and habitat evolution in the Cyanobacteria using a compartmentalization approach. *Geobiology.* *3*, 145-165.
- Sasson A., (1997). Microalgal biotechnologies: Recent developments and prospects for developing countries, Biotec Publication, 1, 76s.
- Scragg, A.H., Morrison, J. ve Shales S.W. (2003). The use of a fuel containing *Chlorella vulgaris* in a diesel engine. *Enzyme and Microbial Technology* *33*, 884–889.
- Sharma, N., et al., (2011). Sustainability and cyanobacteria (blue-green algae): facts and challenges. *Journal of Applied Phycology*, *23*, 1059-1081.
- Shelknanloymilan, L., Atıcı, T. ve Obalı, O. (2012). Removal of nitrogen and phosphate by using *Chlorella vulgaris* on synthetic and organic materials waste water, *Biological Diversity and Conservation*, *5*, 89-94.
- Singha, V., Kumar, D.C., Mani, I., Dhar, P.K., (2016). Recent advances and challenges of the use of cyanobacteria towards the production of biofuels, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *60*, 1-10.
- Sivoven, K., ve Jones, G.J. (1999). Cyanobacterial toxins. In *Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to Public Health. Significance, Monitoring and Management. I.*

- Chorus, ve J. Bertram, ed. (London: The World Health Organization. E. And F.N. Spon.) 41-111.
- Srivastava, N., Srivastava, M., Mishra, P.K., gupta, V.K., Molina, G., Rodriguez-Couto, S., Manikanta, A., Ramkete, P.W. (2017). Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.
- Stahl, D.A., Lane, D.J., Olsen, G.J., Pace, N.R. (1984). Analysis of hydrothermal vent-associated symbionts by ribosomal RNA sequences. *Science*. 224, 409-411.
- Stainer, R.Y., Siström, W.R., Kondratieva, E.N., Eimhjellen, K.E., Hansen, T.A., Whitton, B.A., Phennig, N., Castenholz, R.W., Gorlenko, V.N., ve Whittenbury, R. (1978). Proposal to place nomenclature of cyanobacteria (blue-green algae) under rules of International Code of Nomenclature of Bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 28, 335-336.
- Sukatar, A., (2002). Alg Kültür Yöntemleri, Ege Üni. Fen Fak. Kitaplar Serisi No:184.
- Swingle, W.D., Blankenship, R.E., Raymond, J., Herrero, A., ve Flores, E. (2007). Insights into cyanobacterial evolution from comparative genomics, *Genomics and Molecular Biology of Cyanobacteria*. Norwich (UK) Horizon Scientific Press, 22-43.
- Tatusov R.L., Koonin E.V., Lipman D.J. (1997). A genomic perspective on protein families. *Science*. 278, 631-637.
- Tatusov R.L., Natale D.A., Garkavtsev I.V., Tatusova T.A., Shankavaram U.T., Rao B.S., Kiryutin B., Galperin M.Y., Fedorova N.D., Koonin E.V. (2001). The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Res.* 29, 22-28.
- Tomitani, A., Knoll, A.H., Cavanaugh, C.M., ve Ohno T. (2006). The evolutionary diversification of cyanobacteria: molecular phylogenetic and paleontological perspectives. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103, 5442-5447.
- Tomitani, A., Okada, K., Miyashita, H., Mattijs, JCP, Ohno, T., ve Tanaka, A. (1999). Chlorophyll b and phycobilins in the common ancestor of cyanobacteria and chloroplasts. *Nature*, 400, 159-161.
- Türkeş, M. (2008). Küresel iklim değişikliği nedir? Temel kavramlar, nedenleri, gözlenen ve öngörülen değişiklikler. *İklim Değişikliği ve Çevre, 1*, 45-64.

- Türkeş, M. (2012). Küresel İklim Değişikliği ve Çölleşme İçinde: Günümüz Dünya Sorunları – Disiplinlerarası Bir Yaklaşım (ed. N. Özgen): 1-42. Eğiten Kitap, Ankara.
- Voloshin, R.A., Rodionova, M.V., Zharmukhamedov, S.K., Veziroğlu, T.N., ve Allahverdiev, S.I. (2016). Review: Biofuel production from plant and algal biomass. *Int. Journal of Hydrogen Energy*, *41*, 17257-17273.
- Wedding, H. (1968). Dünyanın İklim Tarihi, Ankara Devlet Meteoroloji Enstitüsü Konferansı, Maden Tetkik ve Arama Enstitüsü, Ankara.
- Wehr, J.D., Sheath, R.G. ve Kociolek, J.P. (2003). *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification*, Michigan, Elsevier.
- Weller, R., Ward, D.M. (1989). Selective Recovery of 16S rRNA Sequences from Natural Microbial Communities in the Form of cDNA. *Appl. Environ. Microbiol.* *55*, 1818-1822.
- Widjaja, A., Chien, C.C. ve Ju, Y.H. (2009). Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, *40*, 13–20.
- Whitton, B.A., ve Potts, M. (2000). *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*, Kluwer Academic Publishers, 2-13.
- Xu, H., Miao, X. ve Wu, Q. (2006). High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*. *126*, 499–507.

EK-1



Şekil Ek 1. NÜVE HS104 saf su cihazı



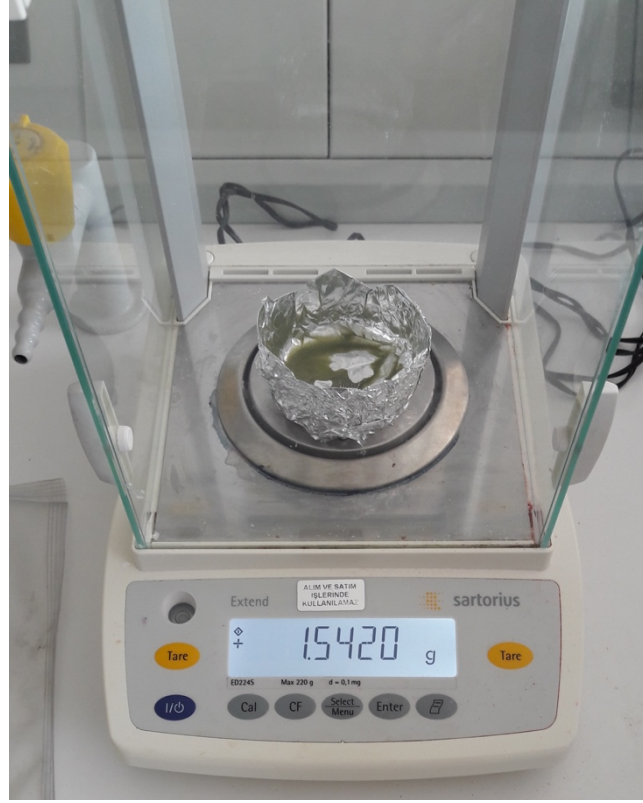
Şekil Ek 2. MEDNIF Otoklav



Şekil Ek 3. EUTECH ph metre



Şekil Ek 4. SHIMADZU UV-1201 spektrofotometre



Şekil Ek 5. SARTORIUS hassas terazi



Şekil Ek 6. NÜVE NF200 santrifüj



Şekil Ek 7. DELTA çekme ocak



Şekil Ek 8. OLYMPUS BİNOKÜLER CX22 mikroskop



Şekil Ek 9. ThermoScientific FlashSmart Elementel Analiz Cihazı

EK - 2. Tez Hazırlama Kontrol Listesi

	Evet	Hayır
Tez, “Tez Yazım Kılavuzu”na uygun olarak yazıldı.	<input checked="" type="checkbox"/>	
Dış kapak ve iç kapak sayfası eklerde belirtilen şekilde düzenlendi.	<input checked="" type="checkbox"/>	
Ön sayfalar i, ii, iii şeklinde Romen rakamları ile numaralandırıldı.	<input checked="" type="checkbox"/>	
Dizinler, “Tez Yazım Kılavuzu”na göre sıralandı ve metin içindeki yerleşime göre sayfa numaraları verildi.	<input checked="" type="checkbox"/>	
Özet ve Abstract hazırlandı.	<input checked="" type="checkbox"/>	
Onay sayfası “Tez Yazım Kılavuzu”na uygun olarak hazırlandı ve imzalatıldı.	<input checked="" type="checkbox"/>	
Etik İlke ve Kurallara Uygunluk Beyannamesi sayfası imzalandı.	<input checked="" type="checkbox"/>	
Simgeler, kısaltmalar, tablolar ve şekillerin tamamı kontrol edilerek ilgili dizinde gösterildi.	<input checked="" type="checkbox"/>	
Ana metinde harf karakteri, harf büyüklüğü ve satır aralıkları “Tez Yazım Kılavuzu”na uygun olacak şekilde düzenlendi.	<input checked="" type="checkbox"/>	
Görsel öğeler, tablolar (çizelgeler), şekiller ve denklemler metin içine “Tez Yazım Kılavuzu”na uygun olacak şekilde yerleştirildi.	<input checked="" type="checkbox"/>	
Kaynakça “Tez Yazım Kılavuzu”na göre düzenlendi.	<input checked="" type="checkbox"/>	
Kaynakların tamamına tez içerisinde atıfta bulunularak kaynakça bölümünde yer verildi.	<input checked="" type="checkbox"/>	
Etik Kurul onayı gerekli ise teze eklendi. (Etik Kurul onayı gerekmiyorsa yandaki “HAYIR” kutucuğunun altına “YOK” yazılacak).	<input checked="" type="checkbox"/>	
Anket, görüşme veya veri formları kullanıldıysa ilgili kurumlardan alınan izin yazıları ve formlar teze eklendi. (Bu formlar kullanılmadıysa yandaki “HAYIR” kutucuğunun altına “YOK” yazılacak).		<input checked="" type="checkbox"/> YOK
Ekler “Tez Yazım Kılavuzu”nda belirtildiği şekilde sunuldu. (Ek kullanılmadıysa yandaki “HAYIR” kutucuğunun altına “YOK” yazılacak).	<input checked="" type="checkbox"/>	
Güzel Sanatlar Enstitüsüyle ilgili anasanat dallarında sergi, konser, gösterim vb. sunumları hazırlandı.		<input checked="" type="checkbox"/>

“TATLI SU VE TOPRAKTAN İZOLE EDİLMİŞ MİKROALGLERİN BİYOYAKIT ÜRETİMİ İÇİN KARAKTERİZASYONU” başlıklı Tez, yukarıdaki listede yer alan konularla ilgili olarak tarafımızca kontrol edilmiş ve gerekleri yerine getirilmiştir.

...../...../.....

.....

(İmza)

.....

(Öğrencinin Adı-SOYADI)

.....

(İmza)

.....

(Danışmanın Unvanı, Adı-SOYADI)