

CHLORELLA VULGARIS'İN HÜCRE SAYISI, KLOROFİL MİKTARI VE BÜYÜME HIZINA AYDINLANMA SÜRESİNİN ETKİSİ

Yazar
GÖKÇE KENDİRLİOĞLU ŞİMŞEK



BİDGE Yayınları

***CHLORELLA VULGARIS*'İN HÜCRE SAYISI, KLOOROFİL MİKTARI VE BÜYÜME HIZINA AYDINLANMA SÜRESİNİN ETKİSİ**

Yazar: GÖKÇE KENDİRLİOĞLU ŞİMŞEK

ISBN: 978-625-372-795-6

1. Baskı

Sayfa Düzeni: Gözde YÜCEL

Yayınlama Tarihi: 25.06.2025

BİDGE Yayınları

Bu eserin bütün hakları saklıdır. Kaynak gösterilerek tanıtım için yapılacak kısa alıntılar dışında yayıncının ve editörün yazılı izni olmaksızın hiçbir yolla çoğaltılamaz.

Sertifika No: 71374

Yayın hakları © BİDGE Yayınları

www.bidgeyayinlari.com.tr - bidgeyayinlari@gmail.com

Krc Bilişim Ticaret ve Organizasyon Ltd. Şti.

Güzeltepe Mahallesi Abidin Daver Sokak Sefer Apartmanı No: 7/9 Çankaya /
Ankara



İçindekiler

1. Giriş.....	4
2 Materyal ve Method.....	17
2.1. <i>Chlorella vulgaris</i>	17
2.2. Sıvı Besi Ortamının Hazırlanması	18
2.3. Kültürlerde <i>Chlorella vulgaris</i> ' in Hücre Sayılarının belirlenmesi.....	22
2.4. Klorofil Analizi	22
2.5. Protein Analizi.....	23
3. BULGULAR.....	25
3.1. <i>Chlorella vulgaris</i> ' in Hücre Sayılarındaki Değişim.....	25
3.2 <i>Chlorella vulgaris</i> ' in Pigment Miktarındaki Değişim	30
3.3. <i>Chlorella vulgaris</i> ' in Protein Miktarındaki Değişim	37
4. Tartışma ve Sonuç	41
5. Kaynaklar	45

1. Giriş

Sucul ekosistemlerde organik madde üretiminin temel kaynağını oluşturan fitoplanktonlar ya da mikroalgler, fotosentetik aktiviteleri sayesinde birincil üreticiler olarak ekosistemin enerji döngüsünde kritik bir rol oynamaktadır. Bu organizmalar, karasal bitkilere kıyasla daha kompleks karbon bileşikleri sentezleme yeteneğine sahiptir. Çevresel ortamlardan çeşitli besin elementlerini (nutrientleri) bünyelerine alarak, ışık enerjisinin yardımıyla bu bileşenleri yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmek için gerekli olan kompleks moleküllere dönüştürürler.

Pelajik sularda yaygın olarak bulunan planktonlar, bulundukları ortamla sürekli bir etkileşim içerisinde olup çevresel koşullardaki değişimlere karşı duyarlı tepkiler göstermektedirler. Bu özellikleriyle fitoplanktonlar, sadece üretici canlılar olarak değil, aynı zamanda çevresel değişkenliklerin biyolojik göstergeleri olarak da ekolojik açıdan büyük öneme sahiptir. Bu sucul ortamlar pek çok fiziksel ve kimyasal faktörün etkisi altında olup ekolojik faktörler olarak da adlandırılan bu etmenler, su içerisindeki organizmaları doğrudan ya da dolaylı olarak etkilerler (Özel, 1992). Tüm organizmaların yaşam sürecini etkileyen, görünebilirliği yıllarca tartışma konusu olmuş ışığı tanımlamak oldukça zor olmuştur. Tanımlama ile ilgili süreçte bilim insanları pek çok kuramı ortaya koymuşlardır.

Hollandalı fizikçi Willebord Snell ilk olarak 1621’ de ışığın belirli özelliklerini keşfetmiştir. Bu kuramla beraber keşfedilen özelliklerden biri; saydam bir ortamdan başka bir saydam ortama geçerken ışığın doğrultusunun değişiyor olmasıdır.

Snell’ in kırılma yasasını açıklamasından sonra Francesco Gramaldi ise ışığın en önemli davranış özelliklerinden olan kırınım olayını ortaya çıkarmıştır. Tüm bu özelliklerin belirlenmesinin yanında Newton parçacık kuramını ortaya atmış ve Tayf olayıyla beyaz ışıqla aydınlatıldığında tayfin en çok bitkilerin yapraklarında yeşil rengi yansıtır diğer renkleri soğurması sebebiyle yeşil görüldüğünü ortaya koymuştur.

Fotoelektrik etkinin bulunmasından sonra bilim adamları ışığın parçacıklara çok benzeyen bir özelliğinin varlığını daha kabul etmiş ve foton kuramı kanıtlanmıştır. Dalgalanma kuramı da parçacık (foton) kuramıyla birlikte pek çok tartışmaya konu olmuştur.

Tüm evren için pek çok açıdan önemi yadsınamaz olan ışık; ‘Maddenin fiziksel yapısındaki atomik etkileşim sonucu meydana gelen bir enerji türüdür’ şeklinde tanımlanmıştır.

Aynı zamanda Işık; doğrusal dalgalar halinde yayılan elektromanyetik dalgalara verilen soyut kavram olarak da tanımlanmıştır. 380 - 750 nm dalga boyları arası gözle görülebilir olarak nitelendirilir ancak bilimsel terminolojide gözle görünmeyen dalga boylarına da ışık denilebilmektedir.

Tüm fiziksel özelliklerinin yanında ışık evrende canlılar için vazgeçilmez bir kaynak oluşturur. Fotosentetik canlılar açısından ışık; türlerin dağılımı, gelişimi, organik madde sentezi, fotosentez hızı gibi pek çok faktöre yön vermektedir.

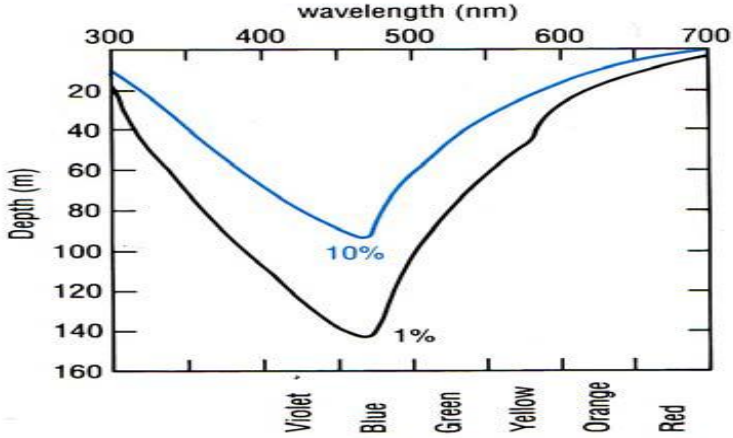
Bitki ve hayvanların çoğunda izlenen fizyolojik aktiviteler gece-gündüz periyoduna ve mevsimlere bağlı olarak değişir. Gece gündüz süresi mevsimlere göre değişim gösterir ve bu değişime bağlı olarak canlıların hayatsal faaliyetlerinde mevsimsel biyolojik ritimler görülür.

Işık etkisiyle bitkilerde fotosentez, fotoperiyodizm, terleme, çimlenme ve çiçeklenme, hayvanlarda ise üreme ve diapoza girme gibi biyolojik ritimler görülür. Günlük (sirkadiyen) ritimler 24 saat veya ona yakın olan ritimlerdir.

Canlılarda gece gündüz periyoduna bağlı olarak niktemeral ritim ortaya çıkar. Ayrıca özellikle deniz organizmalarında yaygın olarak aylık ritimler görülür. Bitkilerde fotosentez ile aynı şekilde hayvanlarda yaşam faaliyetleriyle ışık şiddeti arasında yakın ilişki bulunmaktadır. Bunun yanında canlılar değişik dalga boyundaki ışığa duyarlılıkları da farklılık gösterir. Fitoplankton türleri öncül üreticilerdir ve pelajik besin zincirinin temelini oluştururlar. Temel kaynakları ise ışık ve besin olmakla beraber bu faktörler fitoplankton kominitelerinin yapısında, dağılımında oldukça önemli rol oynarlar. Ayrıca; Işık fotosentez olayında, besin ise metabolizma ve hücre yapısı ile ilgili fonksiyonlarda görev alır.

Akuatik ortamlarda farklı derinliklerde farklı kırınımalar sonucu renk oluşumu değişim gösterir (Campell & Reece,2005).

Şekil.1.Farklı derinliklerde görülen renkler ve dalga boyları



Yeşil bitkiler, klorofil sayesinde güneşten aldıkları ışık yardımı ile havadan aldıkları karbondioksiti, kökleri ile aldıkları su ve diğer mineral tuzlarla birleştirerek beslenmelerindeki organik maddeleri hazırlarlar. Diğer bir ifadeyle bitkiler, fotosentez olayında ışık enerjisini kullanarak havanın karbondioksitini şekere dönüştürmekte ve çeşitli besin maddeleri oluşturmaktadır.

Denizel bitkiler biyolojik ve ekolojik fonksiyonları ile deniz ekosisteminin en önemli canlı gruplarından. Fotosentez olayı ile ortamın oksijenini sağlayan bu bitkiler oluşturdıkları topluluklar ile diğer canlıların beslenme, barınma ve üreme ortamlarını oluştururlar. Işık, bitkilerin büyüme ve gelişebilmeleri için gerekli bir fiziksel çevre faktörüdür.

Işık şiddetinin artması ile fotosentezin de buna paralel olarak artışı belirli bir ışık şiddetine kadar devam eder, bu sınırdan sonra ışık artsa bile fotosentez artmaz; sabit kalır veya azalır. Işık şiddeti sınır değeri, ışık ve gölge bitkilerine göre değişmektedir.

Bir bitkinin en yüksek derecede gelişebilmesini sağlayan ışık miktarına o bitkinin "ışık optimumu" veya "optimum ışık şiddeti" denir. Fitoplanktonik formlar su ve karbondioksit gibi düşük enerjili inorganik bileşiklerden yüksek enerjili organik bileşiklerini sentezleyebilirler. Bu organizmaların enerji kaynağı ya güneş enerjisidir ya da inorganik maddelerin oksidasyonu sonucu açığa çıkan kimyasal enerjidir. Dolayısıyla organik bileşiklere gereksinim duymazlar. Fitoplanktonik formlar fotosentez yoluyla kendi besinini üreten organizmalardır. Işık, fotosentez için en önemli ihtiyaçların başında gelmektedir (Harris, 1987).

Fotosentez, fotosentetik bakteriler ve yüksek bitkiler gibi bütün fototrofik organizmalar tarafından gerçekleştirilen, ışık enerjisinin kimyasal enerjiye dönüştüğü metabolik bir işlemdir. Fotosentez olayı iki evreyi içerir. Işık reaksiyonları, ışık enerjisinin yakalanmasını ve ATP' ye dönüşümünü gerektirir. Bu işlem, ışık aracılığı ile H_2O 'dan $NADP$ ' ye elektron taşınımı ile gerçekleşir.

Elektron taşınımında reaksiyonların olduğu yer hücre içindeki tilakoid zarlarıdır. Yüksek bitkilerden farklı olarak, bu zarlar siyanobakterilerde organize bölgeler değildir.

Bu reaksiyonlar yüksek bitkilerde kloroplast içinde gerçekleşirken siyanobakterilerde sitoplazma içinde oluşmaktadır. Tilakoidler klorofil a içerirlerken klorofil b ve c bulunmaz. Cyanophyta bölümünde rezerv polisakkarit, glikojene benzer siyanofise nişastasıdır (Round, 1984)

Işık, foto sistem I ve foto sistem II de bulunan pigmentler tarafından absorbe edilir. Rakhimberdieva ve ark.'nın bildirdiğine göre *S. platensis*'te fikobilizomların PSI ve PSII arasındaki dağılımı, %60 enerji transferi PS I trimerlerine ve kalan %20'nin PS I monomerleri ile gerçekleşirken fikobilizomların yaklaşık % 20'sinin PSII ye bağlı olduğunu gösterilmiştir (Raund, 1975)

Sucul ortamda organik madde sentezleyen temel üreticiler mikro alglerdir. Çeşitli kaynaklardan gelen basit molekülleri ışık kaynağı yardımıyla yaşamları için gerekli olan kompleks moleküllere dönüştürürler.

Algler, güneş ışığı altında atmosferdeki karbondioksiti büyük bir jeneratör gibi almakta ve insan ile diğer canlıların yaşamı için hayati öneme sahip olan oksijeni üretmektedirler. Alglerden elde edilen biyomasın yanı sıra hücresel olarak bünyelerinde biriktirdikleri değerli metabolitlerin yüksek ticari değere sahip olması ve bazı türlerin çevre ile ilgili uygulamalarda kullanılabilmesi mikro alglere mevcut ilgiyi daha da arttırmakta ve biyoteknolojide yoğun araştırmaların yapıldığı bir alan haline getirilmektedir (Raund, 1984).

Fitoplanktonlar, fotosentetik organizmalar olarak tanımlanırlar. Açık denizler, göller, nehir ve havuzlarda kısmen ya da tamamen pelajik yaşama uyum sağlamışlardır. Mevcut pelajik besin ağlarındaki organik karbonların çoğu bu uyuma katkıda bulunmuştur. Pelajik ekosistemde fitoplankton komiteleri dünya yüzeyinin %70'inde baskındır ve yaklaşık dünyadaki fotosentezin %45' i akuatik çevrede meydana gelir.

Algal biyoteknolojideki gelişmelere rağmen mikro alg türlerinin kültürlerinde çeşitli güçlüklerle karşılaşmaktadır. Mikro alg kültürlerinde biyomasın biyokimyasal kompozisyonu ve yağ asitleri değerleri, çevresel faktörler, besin ortamı, sıcaklık, tuzluluk, pH, ışık gibi büyüme koşullarına bağlıdır (Richmond, 1986; Richmond, 2004).

Temel üreticiler olarak nitelendirilen fitoplanktonun vertikal dağılımına etki eden etmenler; biotik ve abiyotik etmenlerdir. Abiyotik etmenlerden en önemlilerinden biri ışık faktörüdür.

Göllerde ışık ve ısının hâkim olduğu bölge epilimniondur. Bu bölgede bazı olayların gerçekleşmesinde sadece ışık etmeninin etkisinin olduğu görülür. Daha alt tabakalarda ise ışığın sınırlayıcı bir faktör olduğu gözlemlenir. Işığın dalga boyu planktonun vertikal dağılımında rol oynamaktadır (Davis, 1997)

Üst tabakalarda kısa dalga boyları absorbe edilirken alt tabakalarda ise uzun dalga boyları ilerleme göstermektedir.

Bu nedenle üst tabakalarda kısa dalga boyunu absorbe eden yeşil kromatoforlu bitkiler yayılmaktadır. Bunun tersi olarak derinlerde kırmızı ve kahverengi kromatoforlu bitkilere rastlanılmaktadır. Fotosentez ışık enerjisinin hapsedildiği, biyokimyasal enerjiye dönüştüğü ve organik karbon bileşenlerinin depolandığı biyolojik bir süreçtir.

Işık alan bölgelerinde toplanan ışık enerjisi fotosentetik pigmentler tarafından taşınılır. Bu pigmentler 400 ile 700’nm dalga boyundaki ışığı tutabilecek şekilde düzenlenmişlerdir. Fitoplanktonun ışığı tutabilme yeteneği, pigmentlerin ışığı depolama yeteneğiyle doğrudan ilgilidir (Reynolds,2006)

Fotosentetik organizmalar, yaşam ortamlarında uygun olmayan çevresel etkenlere, fotosentetik aparatlarını korumak ve optimize etmek, başka bir deyişle canlılığını sürdürebilmek için adapte olmak zorundadırlar. Fotosentetik hücreler tarafından absorplanan ışık, saturasyon değerlerini geçtiği takdirde bu adaptasyon işlemi çok daha kritik bir duruma gelebilir.

Fotosentez işlemi sırasında hücrelerde devam eden enerji akışını düşürmek için hücresel pigmentlerin (klorofil ve karotenoidler) içerik ve kompozisyonlarında birtakım değişiklikler meydana gelir.

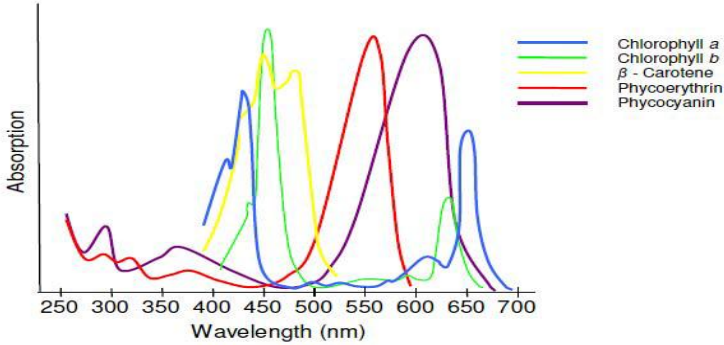
İşte bu nedenle karotenoidler, fotosentez işleminde fotonların yakalanması ve ışığın zararlı etkilerinden hücrenin korunması gibi iki temel fonksiyona sahiptir.

Alglerin en belirgin ve dikkat çekici özellikleri renkleridir. Farklı bölümlere mensup alglerin ihtiva ettikleri pigment çeşitleri primer sınıflandırma da önemli yer tutmaktadır. Değişken olan renklilikleri sebebiyle daha hassas sınıflandırmalarda fotosentetik pigmentlerin kimyasal analizi istenmektedir.

Her divisio kendi özel pigment kombinasyonuna sahiptir. Ve genellikle yüksek bitkilerin kombinasyonu Chlorophyta' nın kine çok benzer. Alglerin belli başlı divisiolarında beş klorofil, yirmi ksantofil, beş karoten ve yedi fikobilin bulunur. Fikobilinler diğer adı ile biloproteinler globülinin proteine tutturulmuş formu olarak da tarif edilmektedirler (Round ,1975).

Kendisine renk veren pigmentlerin tümünün bilgisi o bitkinin DNA'sında kodludur. Bu yüzden bir bitki türü dünyanın neresine gidilirse gidilsin genellikle aynı özellikleri taşımaktadır. Bitki rengini etkileyen başlıca genetik durum olmak üzere, besin maddeleri, sıcaklık ve ışık gibi çevresel faktörler, bitki renklenmesinde etkili olan pigmentlerin etkinlik derecesini belirleyerek rol oynamaktadırlar.

Şekil.2 Üç ana pigment sınıfının(Klorofil, Karotenoid ve Fikobilin) farklı spektrumlardaki absorpsiyon miktarları



Bütün fotosentetik organizmalar ışık enerjisini kullanabilmek için organik pigmentler içerirler. Üç ana pigment sınıfı bulunmaktadır; Klorofiller, Karotenoidler ve Fikobilinler. Klorofiller (yeşil pigmentler) ve Karotenoidler (sarı ve turuncu pigmentler) lipofilik olup alkol, dietil eter, benzen ve aseton içinde çözünürken, Fikobilinler hidrofilitirler ve suda çözünürler [13].

Klorofiller bitkiye yeşil rengi veren suda çözülmeyen sadece organik çözücülerde eriyen bir pigment tipidir. Kimyasal yapı olarak bilinen bütün klorofil çeşitleri aynı porfirin yapısına ve tetrapireol nükleusuna sahiptirler. Bu nükleusta Mg iyonlaşamayan şekilde mevcut olup dört kolla pirollere bağlanmıştır.

Klorofil mor ötesi de dahil olmak üzere çeşitli dalga uzunlukları ile ışıklandırıldığında, kırmızı ışıktaki parlak bir floresans özelliği göstermektedir. Bu klorofilin en önemli karakteridir. Birbirinden kolaylıkla ayırt edilebilen en az sekiz farklı klorofil tipi olduğu bilinmektedir.

Bunlar klorofil a, b, c, d, e, bakteri klorofil a, b ve klorobium klorofildir. Klorofillerin fotosentez açısından en önemli iki tipi klorofil a ve b'dir. Klorofil a mavimsi yeşil ve klorofil b sarımsı yeşil renkte olup, klorofil a fotosentezin ışık reaksiyonunu başlatırken, klorofil b fotosentezde yardımcı pigment olarak rol almaktadır. Klorofil pigmenti genel olarak C, H, O, N ve Mg elementlerinden oluşur. Klorofil a ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$), klorofil b ($C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$) kapalı formülleriyle gösterilirler. Her iki klorofil için de maksimum ışık absorpsiyonu mavi-mor ışınlar bölgesinde olup klorofil a için en yüksek 429 nm, klorofil b için 453 nm dalga boyundadır.

Karotenoidler olarak sınıflandırılan bileşikler çoğu bitkide oluşan renkli terpenler veya terpen türevleridir. Pek çok bitkinin yapraklarında mavi-yeşil ve mavimsi ışığı absorbe etmektedirler ve sarı ışığı yansıtması nedeniyle bu şekilde görünmektedirler. Karotenoidler tarafından absorbe edilen ışık enerjisi fotosentezde kullanılmak üzere klorofile taşınmaktadır. Karotenoidler iki esas gruba ayrılırlar. Başlıca α karoten β karoten E karoten y karoten flavicin lycopene olarak adlandırılan birbirinden farklı çeşitli karotenler vardır. Bütün alg gruplarında β karoten mevcuttur.

Ancak Rhodophyta da β karotenin yerini α karoten almıştır. Diğer bir karoten olan e karoten ise Bacillariophyta' nın karakteristik pigmentidir.

Ksantofiller; Alglerde birçok farklı ksantofil vardır. Bu ksantofillerin çoğu sadece özel alg gruplarında bulunur. Myxoxanthin Cyanophyta da antheraxanthin Euglenophyta da bulunan ksantofil tipleridir. Ksantofiller suda erimezler yağda ve diğer çözücülerde çözünebilirler. Farklı ışık dalgalarının enerjilerini klorofile transfer ederler. Mavi ve ötesi bantların ucunda kuvvetli absorbsiyon gösterirler.

Fikobilinler; Suda çözünen pigmentlerdir. Kloroplastların stroma veya sitoplazmasında bulunur. Yalnızca Cyanobacteria ve Rhodophyta bakterilerinde bulunur. Zararlı ışıklardan canlıları koruyucu etkilerinin yanı sıra kimyasal deneylerde kullanılmaktadırlar. Fikoeritrin ve fikosiyanin olmak üzere iki çeşittir. Bu pigmentlerden fikoeritrin; Rhodophyta' nın, fikosiyanin ise Cyanophyta' nın karakteristiğidir. Fikobilinler suda çözünebilir pigmentlerdir. Ekstraksiyon işlemi esnasında serbest pigmentler protein parçasından kolayca ayrılmaz bundan dolayı pigmentin ismi fikobilin; biloproteinler olarak değiştirilmiştir (Round,1975).

Bir günlük zaman dilimi içindeki gün (gündüz) uzunluğu, aydınlık süresi veya ışık süresi olarak tanımlanan fotoperyot, dünyanın kendi eksenini ve güneşin etrafında dönmesi sonucu oluşan bir doğa olayıdır.

Doğal foto periyot enlem, gün, ay ve mevsimlere bağlı olarak düzenli bir değişim gösterir. Aydınlik süresi, dünyanın eksenindeki 23°27' 'lik eğime de bağlı olarak enlemlerdeki artışla, günlük (sirkadian), aylık (sirkalunar) ve mevsimlik (sirkannual) değişimlerle periyodik olarak artar veya azalır.

Sıcaklık ve besin maddeleri gibi çevresel etmenlerde yıldan yıla az veya çok değişimler gözlenirken, foto periyodik değişimler her yıl aynıdır. Dolayısıyla foto periyot, doğada yılın zamanını gösteren en belirgin dışsal bir göstergedir (Gwinner,1986; Randall et al.,1991). Sözü edilen bu etmenlere bağlı olarak oluşan foto periyodik değişimin stabilitesi ve tahmin edilebilirliğiyle biyolojik döngüsel değişimleri, onlar daha oluşmadan önce sonucu gösteren bir ilk ipucudur. Özellikle yıldan yıla beslenme, hayatta kalma ve üreme için ışık dışında diğer çevresel şartların düzensiz değiştiği orta ve yüksek enlemlerde (subtropikal kuşak ve kutup kuşağı) yaşayan organizmalarda biyolojik aktivitelerin düzenlenmesi ve zamanlaması, fotoperiyotla senkronize olmuş içsel biyolojik saate bağlıdır ve yıllık ritimlere sahiptir.

Dolayısıyla, gün (veya gecenin) uzunluğunun artması ya da azalması veya ikisinin arasındaki kombinasyonu da kapsayabilen foto periyota ilişkin direkt değişiklikler, beslenme, üreme gibi bazı biyolojik olaylar için bir başlangıç işareti olarak kabul edilmektedir (Reynolds,2006).

Oldukça yüksek protein, vitamin ve aminoasit içeriğine sahip *Chlorella vulgaris*' in laboratuvar şartlarında değişik aydınlatma sürelerine tutularak hücre sayılarında, klorofil ve protein içeriğinde meydana gelebilecek değişikliklerin neler olduğunu araştırmak çalışmamızın temel amacını oluşturmaktadır.

2 Materyal ve Method

2.1. *Chlorella vulgaris*

Yeşil algler (Chlorophyta) bölümüne ait *Chlorella vulgaris*, 2-8µ çapında, tek hücreli mikroskopik bir alg türüdür. Çok eski dönemlerden beri *Chlorella* türlerinin besin kaynağı olarak kullanıldığına dair bilgiler mevcuttur. Tek hücreli bu alg türünün besin kaynağı olarak kullanılmasının en önemli nedeni; hücreli yapısı, vitamin, protein, mineral, aminoasitler, nükleik asitler (RNA, DNA), temel yağ asitleri, enzimler ve karotenoidlerin yoğun bir kaynağı olmasından kaynaklanmaktadır. *Chlorella* organik ve inorganik maddeleri saf, katkısız ve doğal olarak mükemmel bir denge içerisinde barındırır ve tek başına bile tam bir besin kaynağı olarak bilinir. *Chlorella*, %50-60 oranında proteinden oluşmakta olup klorofilin doğada bilinen en yüksek oranlı kaynağıdır. Ayrıca demir, iyot, çinko, magnezyum, fosfor ve kalsiyum da içermektedir. *Chlorella*, sığır karaciğerinin içermekte olduğu B12 vitamininden daha fazla B12 vitamini içerir (Jensen, 1987; Singh, 1998).

Sucul ortamlarda yaygın olarak bulunan ve fitoplanktonun önemli bir üyesi olan *Chlorella* türlerini de içerisinde bulunduran plankton örnekleri, plankton ağı kullanılarak araziden toplanarak Fırat Üniversitesi araştırma laboratuvarına getirildi.

Inverted mikroskop altında mikro pipetler yardımı ile karma fitoplankton örnekleri içerisinde *Chlorella vulgaris* izole edildi. Laboratuvarında *Chlorella vulgaris* örneklerini çoğaltabilmek amacıyla hazırlanan Jaworski's besiyeri ortamı kullanıldı.

2.2. Sıvı Besi Ortamının Hazırlanması

Jaworsky sıvı besiyeri ortamı özellikle Chlorophyta üyelerinin gelişimi için en iyi besiyeri ortamı olarak belirtilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda, yeşil alglerin önemli bir üyesi olan *Chlorella vulgaris*' in laboratuvarında çoğaltılmasında Jaworski's sıvı besiyeri ortamını kullanılmıştır (Thompson et al.,1998).

Tablo 1. Jaworski's Besiyeri Ortamı Bileşenleri

<u>Stok Çözelti</u>	<u>200 ml.</u>
1. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4.00 gr.
2. KH_2PO_4	2.48 gr.
3. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10.00 g	10.00 gr.
4. NaHCO_3	3.18 gr.
5. EDTA FeNa	0.45 gr.
EDTA Na	0.45 gr.
6. H_3BO_3	0.496 gr.
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.278 gr.
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.20 gr.
7. Cyanocobalamin	0.008 gr.
Thiamine HCL	0.008 gr.
Biotin	0.008 gr.
8. NaNO_3	16.0 gr.
9. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	7.2 gr.

Hazırlanan stok çözeltilerden 1 er ml alınıp saf su ile 1000 ml'ye tamamlanarak *Chlorella vulgaris* örneklerinin çoğaltılmasında kullanılan sıvı besi ortamı hazırlanmıştır. Hazırlanan sıvı besi ortamı daha sonra sterilizasyon işlemi için otoklava konmuştur. 100 ml Jaworski sıvı besi ortamından 250 ml. lik erlenmayere konmuş ve bu ortama 1.5 gr. agar-agar (Difco) ilave edilerek katı besi ortamı hazırlanmıştır. Daha sonra erlenmayerin ağzı pamuk tıkaçla kapatılıp otoklavda 121 °C de 1 atm basınçta 15 dk süre ile steril edilmiş ve aynı zamanda katı olan agar agarın erimesi sağlanmıştır.

Sterilizasyon işlemi bittikten sonra erlenmayer el yakmayacak sıcaklığa gelene kadar soğutulmuş ve daha önceden steril edilmiş iki ayrı petri kutusuna eşit miktarda ilave edilmiştir. Petri kutularının kapağını kapattıktan sonra besi ortamının homojen bir şekilde petri kutusu tabanına yayılması için düz bir zemin üzerinde hafifçe çalkalanmıştır.

Bu işlemlerden sonra sıvı halde olan besi ortamının donması ve sertleşmesi için bir gün süreyle buzdolabında bekletilmiştir. Katı besi ortamının bulunduğu petrilere sonraki gün alglerin bulunduğu örnekten ekim yapılmıştır. Ekim yapmak için kullanılan öze, bek alevinde steril edildikten sonra yine öze yardımıyla örnekten numune alınıp katı besi ortamına yayma yöntemiyle ekim yapılmıştır. Ekim işleminden sonra petri kutuları, foto periyot 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık (16/8) olacak şekilde sıcaklığı $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ' ye ayarlı bitki büyüme dolabında gelişmeye bırakılmıştır. Aydınlatma için flouresans lambalar kullanılarak ortamın ışık yoğunluğunun 2000 lüks olması sağlanmıştır. Ekimden dört gün sonra petri kutularında farklı alg kolonilerinin oluştuğu gözlenmiştir. Bu koloniler mikroskop altında incelenmiş ve bu koloniler arasından *Chlorella vulgaris* kolonileri belirlenmiştir. Bu işlemlerden sonra *Chlorella vulgaris* kolonisinden Jaworski besi ortamına aşılama yapılmıştır.

Bunun için 100 ml Jaworski besi ortamı 250 ml' lik erlenmayere koyulmuş ve ağzı pamuk tıkaçla kapatıldıktan sonra 121°C de 1 atm basınçta 15 dk süreyle steril edilmiştir. Sterilizasyon işlemi bittikten sonra erlenmayer soğumaya bırakılmıştır.

Sonra bek alevinde steril edilmiş öze yardımıyla katı besi ortamında gelişen *Chlorella vulgaris* kolonisinden alınıp erlenmayer içerisindeki sıvı besi ortamına aşılama yapılmıştır. Aşılamadan sonra 25±1 °C de 16 saat aydınlık 8 saat karanlık periyodunda bitki büyüme kabininde gelişmeye bırakılmıştır.

Aşılama işleminden dört gün sonra sıvı kültür ortamında gözle görülür bir gelişme gerçekleşmiştir. Mikroskopta incelendiğinde ortamda sadece *Chlorella vulgaris* örneklerinin olduğu görülmüştür.

Çalışmada kullanacağımız *Chlorella vulgaris*' i saf olarak elde ettikten sonra yeterli miktarda kültür ortamı hazırlayıp bu kültür ortamlarını ayrı ayrı 16 saat aydınlık/8 saat karanlık (16A/8/K), 17 saat aydınlık/7 saat karanlık (17A/7/K) 18 saat aydınlık/6 saat karanlık (18A/6/K), 19 saat aydınlık/5 saat karanlık (19A/5/K), 20 saat aydınlık/4 saat karanlık (20A/4/K) farklı aydınlatma periyotlarına tabi tutularak bu aydınlanma sürelerindeki hücre sayısı, klorofil ve protein miktarlarındaki değişiklikler tespit edilmiştir.

2.3. Kùltùrlerde *Chlorella vulgaris*' in Hùcre Sayılarının belirlenmesi

Farklı aydınlatma sùrelerine maruz bırakılan sıvı besi ortamından alınan òrneklerdeki *C.vulgaris*' in sayımı her gùn ışık mikroskobu altında Thoma lamı ile yapılmıştır (Apha,1985). Alınan 1 ml. Òrnekten hùcre sayımları gerùekleştirilmiştir. Hùcre sayımları aşılamının yapıldığı ilk günden başlamak üzere 5 gùn gùnaşırı daha sonra ise üçer gùn aralıklı olacak şekilde 20 gùn boyunca yapılmıştır.

Şekil.3 *Chlorella vulgaris* sayımlarının yapıldığı Thoma lamı



2.4. Klorofil Analizi

Sıvı kùltùrlerde klorofil analizleri ilk 5 gùn gùnaşırı daha sonra ise üçer gùn aralıklı olacak şekilde 20 gùn yapılmıştır. Klorofil analizler, Parsons-Strickland metoduna göre yapılmıştır. Farklı aydınlanma sùrelerine tabii tutulan òrneklerde aşılamının yapıldığı ilk günden başlamak üzere 5 gùn gùnaşırı daha sonra ise üçer gùn aralıklı olacak şekilde 20 gùn boyunca spektrofotometrede absorbansları alınmıştır.

Sıvı kültürlerden 5 er ml örnek alınmış 0.45 µl por açıklığına sahip filtrelerden süzülerek üzerlerine örnek üzerine 10 ml %90'lık aseton ilave edilmiştir.

+4 °C'de buzdolabında 24 saat kadar bekletildikten sonra santrifüj tüplerine alınarak 3500 devirde 15 dakika santrifüj edilip süpernatant kısımları alınarak spektrofotometrede %90 aseton körüne karşı 630 nm, 645 nm, 665 nm ve 750 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbansları okunmuştur. Hesaplamalar aşağıdaki formül yardımı ile yapılmıştır.

Hesaplama:

$$\text{Klorofil a} = 11,6 \times D_{665} - 0,14 \times D_{630} - 1,31 \times D_{645}$$

$$\text{Klorofil b} = 20,7 \times D_{645} - 4,34 \times D_{665} - 4,42 \times D_{630}$$

$$\mu\text{g klorofil (a,b)} / L = \text{klorofil (a,b)} \times v / l \times V$$

$$V (L) = \text{Filtre edilen su örneği } v (\text{ml}) = \text{Kullanılan aseton}$$

$$l (\text{cm}) = \text{Işık yolu}$$

2.5. Protein Analizi

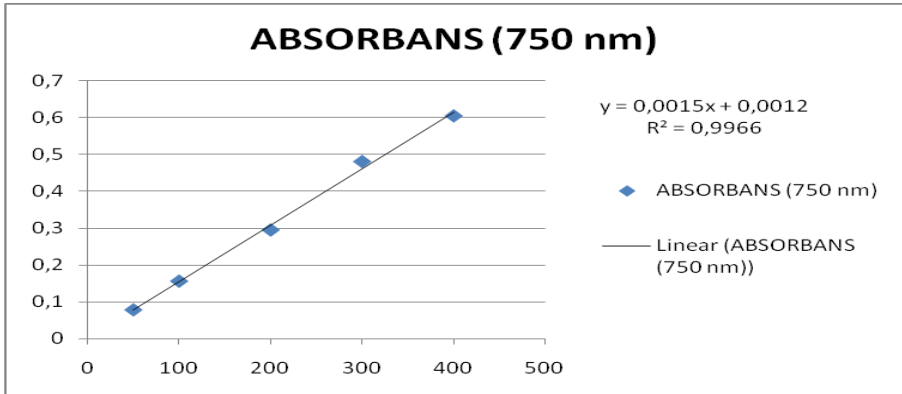
Protein analizleri için farklı aydınlanma sürelerine tabii tutulan örneklerde aşılamanın yapıldığı ilk günden başlamak üzere 5 gün güneşirı daha sonra ise üçer gün aralıklı olacak şekilde 20 gün boyunca sıvı kültürlerden 5 er ml alınmış ve DOC çözeltisinden ilave

edilip iyice çalkalanmıştır. TCA çözeltisinin ilavesiyle 10 dakika kadar bekletilmiş ve 7500 devirde 15 dakika kadar santrifüjlenmiştir.

Bu işlemle örneklerin supernatant kısımları dökülerek her bir örneğe Lowry çözeltisi ilave edilmiş yarım saat bekletilmiş ve Folin ayırıcı ilave edilmiştir (Lowry et al.,1951).

C.vulgaris’deki protein düzeylerini saptamak için protein standartları ile absorbans arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu kullanılmıştır. Protein standartlarının absorbans değerlerinden $y = 0,0015x + 0,0012$ formülü bulunmuştur. Burada X protein derişimini ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ; Y değeri de absorbansı (750 nm) göstermektedir. Bu regresyon formülü kullanılarak *C. vulgaris*’deki protein miktarı hesaplanmıştır.

Tablo 2. Protein standart eğrisi



3. BULGULAR

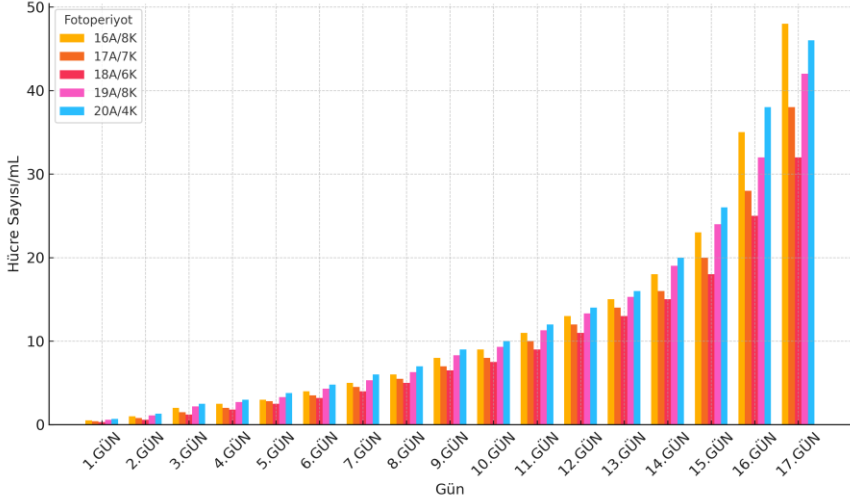
Chlorella vulgaris mikroalg türünü içerisinde bulunduran sıvı kültür ortamlarını ayrı ayrı 16 saat aydınlık/8 saat karanlık (16A/8/K), 17 saat aydınlık/7 saat karanlık (17A/7/K) 18 saat aydınlık/6 saat karanlık (18A/6/K), 19 saat aydınlık/5 saat karanlık (19A/5/K), 20 saat aydınlık/4 saat karanlık (20A/4/K) farklı aydınlatma periyotlarına tabi tutulan kültür ortamlarındaki *Chlorella vulgaris*' in hücre sayısı, klorofil ve protein miktarlarındaki değişiklikler tespit edilmiştir.

3.1. *Chlorella vulgaris*' in Hücre Sayılarındaki Değişim

Farklı aydınlatma sürelerine maruz bırakılan sıvı besi ortamından alınan örneklerdeki *C.vulgaris*' in sayımı her gün ışık mikroskobu altında Thoma lamı yardımı ile gerçekleştirilmiştir.

Hücre sayımları aşılamanın yapıldığı ilk günden başlamak üzere her gün yirmi gün süreyle yapılmış ve sonuçlar Tablo 3.1.1.' de gösterilmiştir.

Şekil 3.1.1 *Chlorella vulgaris*’ in farklı aydınlanma periyotlarındaki hücre sayısı



Chlorella vulgaris’ in sıvı kültürlerle aşılamanın yapıldığı ilk gün ışık mikroskopunda yapılan hücre sayımında ml’de 60 *Chlorella vulgaris*’ in olduğu tespit edildi. 16 saat aydınlık 8 saat karanlık periyoduna maruz bırakılan *Chlorella vulgaris* kültürlerinde inokulasyonun yapıldığı günden sonraki gün yapılan sayımında *Chlorella vulgaris*’ in hücre sayısının 365 hücre/ml olduğu, üçüncü gün yapılan sayımda ise *Chlorella vulgaris*’ in hücre sayısının 1.200 ye ulaştığı belirlendi.

16 saat aydınlık 8 saat karanlık periyoda bırakılan sıvı kültürlerde ise *Chlorella vulgaris*’ in hücre sayısının dördüncü günde ml deki hücre sayısı 1.900 olarak tespit edildi.

Hücre sayısındaki bu artışın üçüncü güne oranla %58'lik bir artış gösterdiği hesaplandı. 5. günde hücre sayısındaki artışın devam ederek ml de 750 hücreye ulaştığı belirlendi. İlk haftanın sonunda 16 saat aydınlık 8 saat karanlık periyoduna maruz bırakılan kültürlerde *Chlorella vulgaris*' in hücre sayısı mililitrede 4.000 olduğu, 8. günde ise hücre sayısının 4.500'e ulaştığı 9. ve 10. günlerde ise *Chlorella vulgaris*' in 6.250 hücre/ ml olduğu tespit edildi. 11. günde ml de yaklaşık 6500 hücreye ulaştığı tespit edildi.

Aşılamanın yapıldığı on ikinci günde yapılan sayımlarda hücre sayısında yaklaşık %128'lik artışın olduğu belirlendi. 13. günde mililitrede *Chlorella vulgaris*' in hücre sayısının 10.500 olduğu, 14. günde ise katlanarak artış göstererek mililitrede 21.600 hücreye ulaştığı görüldü. On beşinci günde yapılan sayımda *Chlorella vulgaris*' in hücre sayısının 36.000'e ulaştığı tespit edildi. 16. ve 17. günler sıvı kültürlerde *Chlorella vulgaris*' in hücre sayılarındaki artış devam etmiş ve sırası ile 48.000 hücre/ml ve 50.400 hücre/ml olarak tespit edilmiştir. Sıvı kültürlerdeki *Chlorella vulgaris*, sayımın yapıldığı son güne çoğalarak mililitrede 64.800 hücreye ulaştığı belirlendi (Tablo 3.1.1).

İkinci aydınlatma periyodu olan 17 saat aydınlık 7 saat karanlığa maruz bırakılan sıvı kültür ortamında ise *Chlorella vulgaris*, aşılamanın yapıldığı günden hücre sayısındaki artışın belirlendiği son güne kadar olan değişimler Tablo 3.1.1.'de gösterilmiştir.

Bu periyottaki sıvı kültürlerde *Chlorella vulgaris* ilk gün mililitrede 125 hücre olarak tespit edilirken ikinci gün önemli miktarda çoğalarak 298 hücre/ml' ye ulaştı. İnokülasyonun üçüncü güne ulaşıldığında periyodik olarak artmaya devam eden *Chlorella vulgaris*' in mililitrede 1.500 hücreye ulaştığı dördüncü gün ise 2.100 hücre/ml olduğu tespit edildi. Beşinci ve altıncı günde sıvı kültürlerde hücre sayısındaki artışın devam ettiği yedinci güne gelindiğinde ise *Chlorella vulgaris* 4.250 hücre/ml olduğu tespit edildi. Hücre sayısındaki artış tablo 3.1.1.' de de görüldüğü gibi düzenli bir şekilde artarak 12. günde 5000'e ulaştığı gözlemlendi. İkinci haftanın sonuna ulaşıldığında, hücre sayısı 14. günde 13. güne göre %90'lık artış gösterdi. 15. günde ml de hücre sayısı 25.200'lere kadar ulaştı.

16. ve 17. günlerde 36.000 ve 43.200 hücre/ml olduğu tespit edildi. Hücre sayısındaki artış on sekiz ve on dokuzuncu günde yapılan sayımlarda da devam ederek yirminci günde yaklaşık olarak 54.400 hücre/ml' ye kadar ulaştı.

Kültürlerin aydınlanma süresini değiştirerek yapılan sayımlarda ise içerisinde *Chlorella vulgaris*' in bulunduğu sıvı kültür ortamlar 18 saat aydınlık 6 saat karanlık periyoduna tabi tutuldu ve aşılamanın yapıldığı günde sıvı kültürlerdeki sayımında hücre sayısının mililitrede 200 hücre olduğu tespit edildi. Tablo 3.1.1.'de de görüldüğü gibi hücre sayısındaki artış devamlı olmuş ikinci gün 580, üçüncü gün 1.600 hücre/ml olarak tespit edilmiştir.

Bu artış sayısına ulaşılarak aşılamanın ilk yapıldığı güne kıyasla ml de 1.400 hücre kadar artış görüldü. İlk haftanın sonunda 9. ve 10. günlerde sekizinci güne ait sayıma kıyasla hücre sayısında %100'lük artış söz konusu oldu. 11. ve 12. günler arası artış yaklaşık 2 kat kadar olup 12. günde hücre sayısı 6.000 olarak belirlendi. İkinci haftanın sonuna gelindiğinde sıvı kültürlerde *Chlorella vulgaris*' in hücre sayısının ml de 18.000 hücreye son sayım gününde ml de 54.000 hücreye ulaştığı tespit edildi.

Aydınlık sürenin uzatılarak 19 saate çıkarıldığı iklimlendirme kabinine bırakılan sıvı kültürlerde *Chlorella vulgaris*' in hücre sayısının inokulasyonun yapıldığı gün ml de 245 olduğu ikinci gün yapılan sayımda yaklaşık olarak 500 hücreye ulaştığı tespit edildi. Sıvı kültürlerdeki *Chlorella vulgaris* sayısının 3.ve 7. günler arasında yaklaşık olarak iki kat artış gösteren hücre sayısı mililitrede 4.750 hücreye ulaştığı tespit edildi. 8. gün yapılan sayımda 5100 olan hücre sayısı 9. günde yapılan sayımlarda da artmaya devam etti ve 13. günde ml de 10.000 hücreye ulaştığı belirlendi. 2. hafta sonunda ise bu hücre sayısının 13. güne göre %230 artış göstererek 23.000 olduğu tespit edildi. 15. (5.800 hücre/ml) ve 16. gün (7.000 hücre/ml) düzenli bir şekilde sıvı kültürlerde çoğalan *Chlorella vulgaris* inokulasyonun yapıldığı 17. günde 33.120 bireye ulaştığı belirlendi. Yirminci günde ise yapılan sayımda *Chlorella vulgaris*' in hücre sayısının ml de 43.200 olduğu tespit edildi.

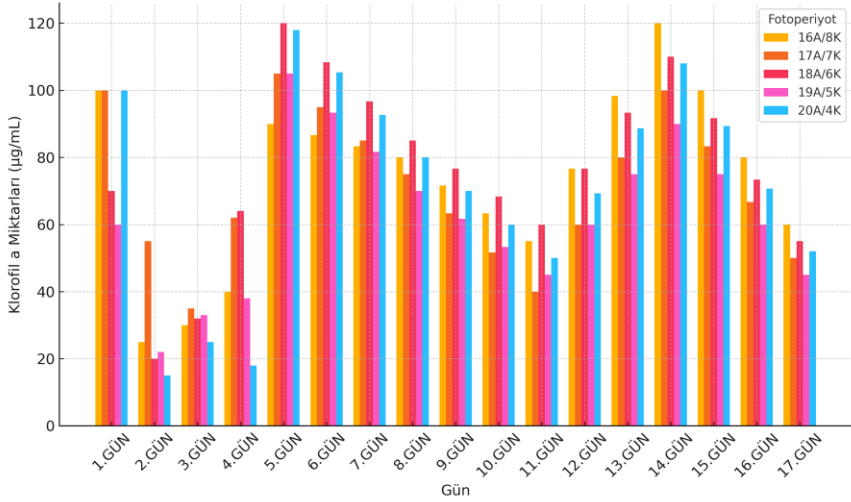
Yirmi saat aydınlık dört saat karanlık süresine tabi tutulan sıvı kültürlerde *Chlorella vulgaris*' in hücre sayılarındaki değişimin incelendiği yirmi günlük süreçte belirgin ve düzenli bir artış tespit edildi. İnokulasyonun yapıldığı gün mililitrede 360 olan *Chlorella vulgaris* 3. gün yapılan sayımda yaklaşık 3 kat artarak 1.650'a, 4. ve 5. günlerde ise üçüncü güne oranla hücre sayısı yaklaşık % 150 kadar artış göstererek ilk haftanın sonunda 5.500 hücreye ulaşmıştır. Aşılamayı takip eden 11.güne kadar düzenli artış gösteren hücre sayısı 12. günde 9.000'e, 13. günde ise mililitrede 9.250 hücreye ulaşmıştır. 14. günde 12.960 hücre/ml olan *Chlorella vulgaris*' in hücre sayısının 15. günde 18.800 olduğu düzenli artışın devam ettiği tespit edildi. Farklı aydınlatma süresine tabi tutulan sıvı kültürlerdeki *Chlorella vulgaris*' in hücre sayısındaki artış da aydınlatma sürecindeki artışa paralel olarak artış gösterdiği tespit edildi.

3.2 *Chlorella vulgaris*' in Pigment Miktarındaki Değişim

Fotoperiyot koşullarındaki değişime bağlı olarak farklı aydınlatma sürelerine (16A/8K, 17A/7K, 18A/6K, 19A/5K, 20A/4K) maruz bırakılan sıvı kültürlerde yetiştirilen *Chlorella vulgaris* hücrelerinin pigment içerikleri, inokulasyon gününden itibaren on yedi günlük bir periyot boyunca izlenmiştir.

Elde edilen veriler doğrultusunda, klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil düzeyleri ayrı ayrı hesaplanmış ve bu bulgular grafiksel olarak sunulmuştur.

Şekil 3.2.1. Farklı aydınlanma süresine maruz bırakılan *Chlorella vulgaris* kültürlerinde zamana bağlı olarak klorofil a miktarındaki değişimler



Bu çalışmada, *Chlorella vulgaris* kültürleri üzerinde uygulanan farklı fotoperiyot koşullarının (16A/8K, 17A/7K, 18A/6K, 19A/5K, 20A/4K) klorofil a (Chl-a) miktarına etkisi değerlendirilmiştir. Şekilde yer alan verilere göre, fotoperiyot süresindeki değişimlerin klorofil a birikimini anlamlı düzeyde etkilediği gözlemlenmiştir.

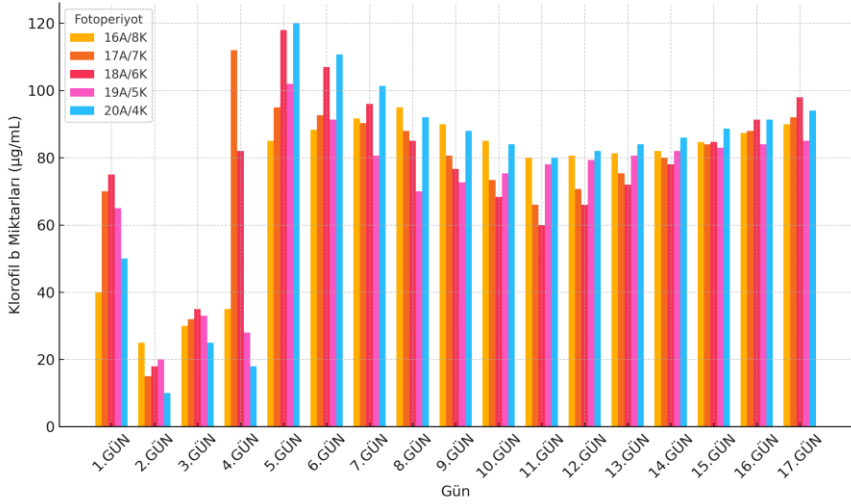
Özellikle 18 saat aydınlık ve 6 saat karanlık uygulamasının (18A/6K), 5. ve 14. günlerde en yüksek Chl-a miktarına ulaşarak diğer gruplara kıyasla belirgin bir artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Bu durum, 18A/6K fotoperiyotunun *C. vulgaris*'in fotosentetik kapasitesini artırdığına ve klorofil sentezini optimize ettiğine işaret etmektedir. Benzer şekilde, 16A/8K ve 20A/4K uygulamalarının da bazı zaman noktalarında yüksek Chl-a düzeyleri oluşturduğu ancak bu artışların tüm süre boyunca düzenli bir seyir izlemediği belirlenmiştir. Buna karşılık, 19A/5K uygulamasında genel olarak düşük klorofil a düzeyleri kaydedilmiş; bu durum, kısa aydınlanma süresinin alg hücrelerinde pigment üretimini sınırlandırdığına işaret etmektedir.

Ayrıca, fotoperiyot süresinin yalnızca klorofil sentezi üzerinde değil, aynı zamanda hücresel metabolizmanın genel aktivitesi üzerinde de etkili olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, elde edilen veriler doğrultusunda 18A/6K uygulamasının *Chlorella vulgaris* türü için klorofil a üretimini teşvik eden en uygun fotoperiyot koşulu olduğu değerlendirilmiştir.

Tablo 3.2.2 Farklı aydınlanma süresine maruz bırakılan Chlorella vulgaris kültürlerinde zamana bağlı olarak klorofil b miktarındaki değişimler



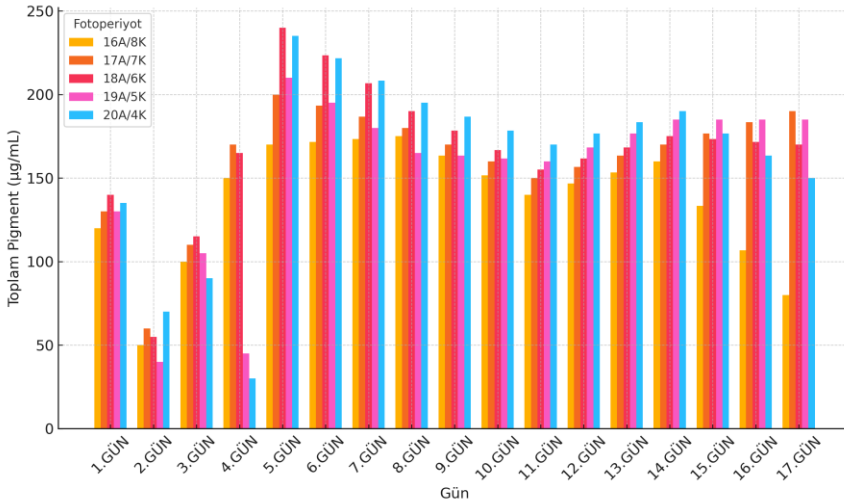
Bu çalışmada, farklı fotoperiyot koşullarına (16A/8K, 17A/7K, 18A/6K, 19A/5K, 20A/4K) maruz bırakılan *Chlorella vulgaris* kültürlerinde klorofil b (Chl-b) miktarındaki değişim 17 günlük bir süre boyunca incelenmiştir. Elde edilen bulgular, fotoperiyot süresindeki farklılıkların Chl-b birikimi üzerinde anlamlı etkiler oluşturduğunu göstermektedir.

Şekil incelendiğinde, özellikle 18A/6K ve 20A/4K uygulamalarında klorofil b düzeylerinin genel olarak daha yüksek seyrettiği gözlemlenmiştir. Bu iki uygulama, 5. ve 8. günlerde en yüksek pigment birikimini sağlamış ve 18A/6K grubu 5. gün itibarıyla maksimum Chl-b düzeyine ulaşmıştır. Bu durum, daha uzun aydınlanma süresinin klorofil b sentezini teşvik ettiğini ve fotosentetik pigment üretimini olumlu yönde etkilediğini göstermektedir. Diğer yandan, 16A/8K ve 19A/5K uygulamalarında pigment miktarlarının nispeten daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Özellikle 19A/5K grubunda Chl-b düzeylerinin birçok ölçüm gününde sınırlı kaldığı görülmüştür. 17A/7K uygulaması ise bazı günlerde (örneğin 4. ve 11. günlerde) belirgin artışlar göstermiş olsa da genel seyri itibarıyla düzensiz bir dağılım sergilemiştir.

Sonuç olarak, fotoperiyot süresi *Chlorella vulgaris*'in klorofil b üretimini doğrudan etkileyen önemli bir parametre olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen verilere göre, 18 saat aydınlık ve 6 saat karanlık döngüsünün (18A/6K), Chl-b birikimini destekleyen en uygun ışıklandırma koşulu olduğu sonucuna varılmıştır.

Şekil 3.2.3 Farklı aydınlanma süresine maruz bırakılan *Chlorella vulgaris* kültürlerinde zamana bağlı olarak toplam pigment miktarındaki değişimler



On altı saat aydınlık periyoduna maruz bırakılan *Chlorella vulgaris* kültürlerindeki toplam klorofil miktarındaki değişimler inokulasyonun gerçekleştirildiği günden başlamak üzere yapılmış ve sonuçlar Tablo 3.2.3.' te gösterilmiştir. İnokulasyonun yapıldığı ilk gün hesaplanan toplam klorofil miktarının 105.37 mg/ml olduğu görüldü ve üçüncü gün kültürlerde klorofil miktarının yaklaşık olarak %11.3 lük bir artış gösterdiği tespit edildi. Toplam klorofil miktarındaki artışın ilerleyen günlerde de devam ettiği beşinci gün yapılan ölçümlerde aşılamanın yapıldığı ilk güne oranla klorofil miktarında yaklaşık %165 oranında bir artışın meydana geldiği ve toplam klorofil değerinin 173.72 mg/ml olduğu, sekizinci gününde yapılan ölçümlerde 174.41 mg/ml olan klorofil değerinin İnokulasyonun takip eden son klorofil ölçümünün yapıldığı 17. günde 176.15 mg/ml' ye yükseldiği görüldü.

Aydınlanma süresini bir saat artırarak on yedi saat aydınlık periyodu uygulanan *Chlorella vulgaris* kültürlerinde aşılamanın yapıldığı ilk gün toplam klorofil miktarı 133.86 mg/ml olarak tespit edildi.

İkinci gün yapılan ölçümlerde klorofil miktarının belirgin bir şekilde azalarak 89.03 mg/ml ye kadar düştüğü ancak aşılamayı takip eden üçüncü günde toplam klorofil miktarında önemli bir artışın olduğu görüldü (110.15 mg/ml). Dördüncü güne gelindiğinde ise ilk aşılama gününe göre %129'lik artış gösteren toplam klorofil değeri 172.45 mg/ml ye ulaştı.

İnokulasyonun takip eden 5.gün ise yapılan ölçümlerde ilk aşılama gününe kıyasla pigment miktarının %108 artış gösterdiği belirlendi. Klorofil miktarındaki artışın devamlı olarak arttığı ve 8. günde yapılan analizlerde klorofil miktarının 76.74 mg/ml, on bir ve on dördüncü günlerde yapılan ölçümlerde klorofil miktarının sırası ile 100.2 mg/ ml ve 174.18 mg/ml ye ulaştığı tespit edildi. 17. günde ise klorofil miktarı 182.31 mg/ml olarak hesaplandı.

Chlorella vulgaris aşılama ve 18 saat aydınlık 6 saat karanlık periyoduna maruz bırakılan kültürlerdeki klorofil analizlerinin sonuçları Tablo 3.7 de gösterildi. Bu örneklerde aşılamanın yapıldığı ilk gün yapılan analizlerde klorofil miktarının 139.77mg/ml olduğu aşılamaı takip eden ikinci günde klorofil miktarında önemli bir düşüşün olduğu görüldü (36.3 mg/ml). Ancak üçüncü günde yapılan ölçümlerde klorofil miktarının artmaya başladığı (145.23mg/ml), beşinci gün yapılan ölçümlerde klorofil miktarının 237.43 mg/ml olduğu tespit edildi. 8. Gün 92.28'e düşen klorofil değeri, 11.günde tekrar artarak 127.73'e yükseldi.14. günde ise ilk aşılama gününe kıyasla pigment değeri artışı 32.41 olup klorofil değeri 172.18 olarak hesaplandı.18 saat aydınlık periyotta kalan örneklerin son pigment analizlerinde ise klorofil değeri 156.8 e ulaştı. On dokuz saat aydınlık beş saat karanlık periyoduna bırakılan *Chlorella vulgaris* kültürlerinde aşılama günü yapılan ölçümlerde klorofil değerinin yaklaşık 128.52 mg/ml olduğu ancak ikinci gün yapılan ölçümde klorofil miktarının azaldığı belirlendi(42.58mg/ml).

Üçüncü gün tekrar artmaya başlayan klorofil miktarı (104.15 mg/ml) son analiz gününe kadar düzenli bir şekilde artarak 193.9 mg/ml e ulaştı.

Aydınlanma süresinin artırılarak 20 saat aydınlık 4 saat karanlık periyoduna maruz bırakılan *Chlorella vulgaris* kültürlerinde İnokulasyonun yapıldığı ilk gün klorofil değeri 138.42 mg/ml olarak hesaplandı. İkinci gün klorofil değerinde bir azalış görüldü(87.02).Sonraki iki günde de klorofil değeri azalmaya devam etti ve bu değer 85.7mg/ml ve 31.07 mg/ml' lere kadar düştü. Beşinci güne gelindiğin de klorofil değeri artarak 235.53 mg/ml değerine ulaşıldı.

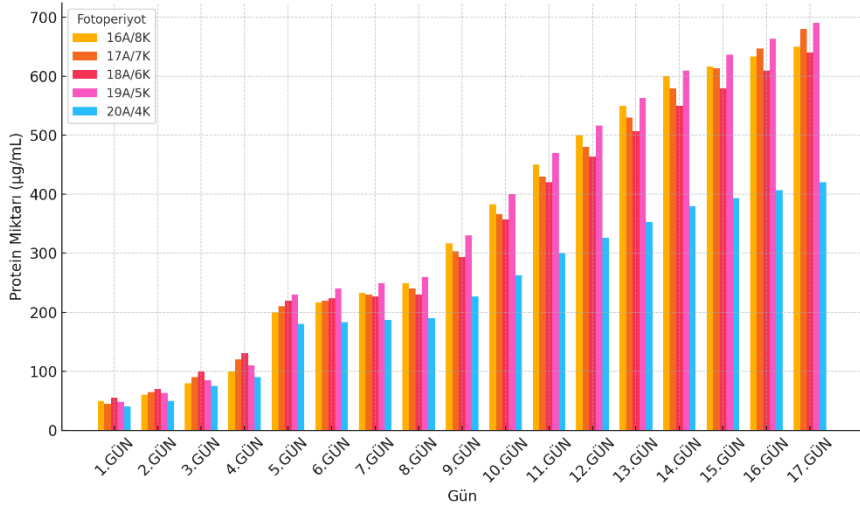
Üç gün aranın ardından 8. gün klorofil değeri tekrar bir azalış gösterdi (175.43 mg/ml).11. günde elde edilen değer 138.01 mg/ml olup 14. günde ise hesaplanan klorofil değeri 193.28 mg/ml olarak belirlendi ve pigment analizinin son gününde 148.62 mg/ml klorofil değeri ile ilk aşılama gününe kıyasla bu periyotta pigment miktarının %107'lik artış gösterdiği gözlemlenerek pigment analizleri sonlandırıldı.

3.3. *Chlorella vulgaris*' in Protein Miktarındaki Değişim

Beş farklı aydınlanma periyoduna maruz bırakılan *Chlorella vulgaris* kültürlerindeki protein miktarlarında zamana bağlı olarak meydana gelen değişim Tablo 3.3.1.' de gösterilmiştir.

Tablodan da görüldüğü gibi beş farklı aydınlanma periyoduna maruz bırakılan kültürler protein miktarları birbirinden farklılık gösterdiği görüldü.

Şekil 3.3.1. Farklı Aydınlanma Peryotlarındaki *Chlorella vulgaris* ' in Protein Miktarı



Onaltı saat aydınlık periyoduna maruz bırakılan *Chlorella vulgaris* kültürlerinde İnokulasyonun yapıldığı gün protein miktarı 27.2 mg/ml olduğu, ikinci günde ise 81.2 mg/ml e üçüncü günde ise 119.2 mg/ml ye ulaştığı görüldü. Protein miktarındaki artış sürekli olarak devam ederek aşılmayı takip eden sekizinci günde 263.2 mg/ml ve 14. günün sonunda 606.5 mg/ml olduğu tespit edildi.

Aydınlatma periyodunu artırarak aydınlık sürenin 17 saate çıkarıldığı kültür ortamında protein miktarının İnokulasyonun yapıldığı gün 25.2 mg/ml olduğu, ikinci ve üçüncü gün yapılan ölçümlerde ise protein miktarının artarak 50.8 ve 83.2 mg/ml ye ulaştığı tespit edildi. Beşinci günde hesaplanan protein miktarı değeri 196.5 mg/ml, 8. günde ise ilk aşılama gününe kıyasla 108.7'lik artış gözlemlendi ve 11. günde bu değer artarak 432.5 mg/ml ye ulaştı. 14. günde protein miktarı değerinin 559.8 mg/ml olduğu belirlendi. Bu periyottaki son analiz gününde ise protein miktarının 648.5mg/ml' ye kadar yükseldiği görüldü.

On sekiz saat aydınlık altı saat karanlık periyoduna maruz bırakılan *Chlorella vulgaris* kültürlerinde aşılamanın yapıldığı gün protein miktarının 11.8 mg/ml olduğu ikinci gün yapılan ölçümde ise protein miktarının 42.5mg/ml' e yükseldiği görüldü. Protein miktarındaki artış devam ederek dördüncü gün protein miktarı 111.2 mg/ml beşinci gün ise 218.5 mg/ml oldu. 11. günde yükselen protein miktarı 442.5 mg/ml olarak hesaplandı ve takip eden diğer üç gün aralıklı periyotta protein miktarı ikinci bir yükselişle 519.8 mg/ml olarak belirlendi. 18 saat aydınlık 6 saat karanlık periyodun son gününde ise bir önceki güne kıyasla %119' luk artışla protein miktarının 619.2 mg/ml' ye ulaştığı tespit edildi.

Bir önceki aydınlatma periyodundan farklı olarak aydınlanma süresini bir saat artırarak 19 saat aydınlık periyoduna bırakılan *Chlorella vulgaris* kültürlerinde aşılama günü ölçülen

protein miktarı 28.5 mg/ml' dir. İkinci gün yapılan ölçümlerde ise protein miktarının 28.5 mg/ml olduğu tespit edildi. Üçüncü günde de protein miktarındaki artış devam etti(123.2mg/ml). Dördüncü günde ise üçüncü güne göre % 137' lik protein miktarı artışı belirlendi. Ardışık olarak protein hesabı yapılan 5. güne gelindiğinde ise bu periyotta ve günde ki miktar 240.5 mg/ml olarak belirlenip üç gün aranın ardından 8. günde bu miktarın 244.5 mg/ml' ye ulaştığı görüldü. İkinci üç günlük sürenin ardından 11. günde bu periyottaki protein miktarı 302.5 mg/ml 'ye yükseldi ve 11. güne göre yaklaşık %138' lik artış gösteren ve protein değeri 417.8 mg/ml ye ulaşan 14. günde ki hesaplamalarda böylece tamamlanmış oldu. *Chlorella vulgaris*' in 19 saat aydınlık periyodundaki analizinin son gününde hesaplanan protein miktarı 14. günden sonra tekrar artış göstererek 677.2 mg/ml 'ye yükseldi ve böylece 19 saat aydınlık periyottaki protein miktarları da belirlenmiş oldu.

Protein miktarı hesaplaması yapılan son periyot 20 saat aydınlık 4 saat karanlık periyoda maruz bırakılan *Chlorella vulgaris* kültürünün ilk aşılama günündeki protein miktarı 21.8 mg/ml olarak belirlendi. İnokulasyonun ikinci gününde ise protein miktarı artarak 70.5 mg/m ye ulaştı. İkinci günün ardından bu artışın devam ederek üçüncü günde protein miktarının 111.2 mg/ml' yi bulduğu gözlemlendi. Dördüncü güne gelindiğinde ise protein miktarında azalış görüldü (75.2 mg/ml).Beşinci günde bir önce ki gününe kıyasla protein miktarında %220' lik artış görüldü ve protein miktarı 171.5 mg/ml' ye yükseldi. Üç gün aranın ardından 8. güne

gelindiğinde protein miktarında tekrar yükselme belirlendi (175.8 mg/ml) ve 11.günde protein miktarı 299.2 mg/ml değerine ulaştı. İkinci haftanın son günü olan 14. günde ise protein miktarında tekrar artış görüldü(357.8) ve son üç günlük aranın ardından 17. günde protein miktarı 401.2 mg/ml olarak belirlenip *Chlorella vulgaris*' in bu periyottaki protein miktarı hesaplaması da sonlandı.

Yapılan hesaplamalar sonucunda elde edilen verilere bakıldığında ilk 5 gün protein miktarında tüm örnekler için bir artışın mevcut olduğu gözlemlenmiştir. Ardışık olarak 3 er günlük periyotlar dikkate alındığında ise mevcut artışın tüm 17 günlük periyotta devam ettiği görülmüştür.

4. Tartışma ve Sonuç

Pek çok çevresel faktörün mikro alglerin büyümesi, gelişmesi ve biyokimyasal yapısı üzerinde etkili olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (Cohen et al.,1998; Hu, 2004; Lourenco et al.,2002). Bütün fotosentetik organizmalarda olduğu gibi alglerin de fotosentezi gerçekleştirmesinde ışık şiddetinin çok önemli olduğu bilinen bir gerçektir (Lund, 1965).Yagui ve arkadaşları (2004) yaptıkları çalışmada üç farklı ışık şiddetine maruz bırakılan *S. platensis* örneklerindeki klorofil pigmenti ile diğer büyüme parametrelerini karşılaştırarak ışık faktörünün önemli olduğunu ortaya koymuşlardır (Yagui et al.,2004).

Round (1984) pigmentlerin düşük ışık şiddetindeki önemi üzerinde durarak, yüksek ışık şiddetinde klorofil ve fikosiyaninin ışık şiddetini absorblamak için çok önemli oldukları sonucuna varmıştır Stevenson ve Stoermer (1981), pigment miktarındaki değişimin popülasyon yoğunluğuna bağlı olarak değişebileceği sonucuna varmıştır (Stevenson & Stoermer, 1981). Özdiş (2005), bazı ağır metallerin alglerde klorofil içeriğinde bir düşüşe popülasyon yoğunluğunda değişikliğe de bağlı olabileceğine vurgu yaparak kontrol grubunda *C. vulgaris*' teki klorofil a ve b miktarlarının günler arasında önemli bir şekilde arttığını ancak krom etkisinde ise bu miktarların azalmasını *C. vulgaris*' teki krom birikiminin bir sonucu olduğu sonucuna varmıştır. Klorofil miktarındaki beklenen artışların aksine görülen klorofil miktarındaki azalmaların ağır metaller gibi faktörlerin etkili olduğu belirlenmiştir (Özdiş, 2005). Çalışmamızda aydınlanma süresine bağlı olarak pigment miktarında bariz bir artışın olduğu görülmüştür. Artan aydınlanma süresi beraberinde hücre artışını getirirken bunun yanı sıra pigment miktarında da artışın olması normal bir sonuç olarak karşımıza çıkmaktadır.

Yapılan pek çok araştırmada mikro alglerin pH, sıcaklık, besin eksikliği, ağır metal kontaminasyonu gibi değişen ortam koşullarına bağlı olarak özellikle depo ürünlerinin kimyasal yapılarında, pigment, protein gibi yapılarda farklılıkların meydana geldiği belirlenmiştir (Becker, 1994). Ayrıca, optik yoğunluk ölçümleri ve kuru madde analizleri sonucunda ise ilkbahar

döneminde alglerde verimliliğin düşük olduğu, yaz ve sonbahar döneminde ise daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Kuru madde miktarının en yüksek yaz aylarında, C-fikosiyanin ve protein miktarının en yüksek sonbahar mevsiminde saptanmış olması, hücre içi pigmentasyon durumunun aydınlık şiddeti ile etkilendiği, kuru madde verimliliklerinin bundan etkilenmediği görülmüş ve *S. platensis* için bilinen optimum kültür sıcaklığı değerinin 35-37°C olduğu belirlenmiştir. Sıcaklığın $30.04 \pm 0.06^{\circ}\text{C}$ ve aydınlanma şiddetinin $822.46 \pm 61 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ olduğu

Sonbahar döneminde C-fikosiyanin miktarı yüksek bulunmuş, protein miktarı da %72.09 olarak en yüksek bu mevsimde saptanmıştır. Bu bulgu fikobiliprotein olan ve protein moleküllerinden ayrılmayan fikosiyanin yapısını desteklemektedir (Vonshak,2004). Çalışmamızda aydınlanma süresine bağlı olarak protein ve pigment miktarındaki değişimler mevcut literatürlerle uyum göstermektedir.

Müller (1994), alg gelişimi ile ışık yoğunluğu ve su sıcaklığı arasında pozitif bir ilişki olduğunu belirlenmiştir. Epifitik alg florasının bolluğunun mevsimsel olarak gözleendiği çalışmada, alglerin azalıp çoğalmaları, çevre faktörlerinden su sıcaklığı, kimyasal parametreler ve ışık şiddetinin değişimine bağlı olduğu görülmüştür. Işık şiddetinin büyüme hızını belli bir şiddete kadar artırdığı, fakat doyumluk noktasından sonra büyüme hızını düşürdüğü bildirilmektedir. Yapılan bu çalışmada da 20 günlük

süreçte aydınlanma şiddetine bağlı artışlar gözlenmiştir. Fitoplankton kompozisyonun sıcaklık, yağmur gibi iklimsel faktörler ile gün uzunluğu, ışık yoğunluğu ve besin maddelerinden etkilenecek mevsimsel bir değişim gösterdiği tespit edilmiştir (Moss,1988). Kültür çalışmaları ve buna bağlı olarak biyoreaktörlerin tasarım ve kurulum aşamalarında da mikro alg üretimi için temel hususlar olarak ışık ya da güneş ışığının yeterli olduğu dış ortamda, saydam dairesel borular içinde mikroalg türlerinin dolaşım sistemine dayanan modeller tasarlanmıştır(Molina, 1994).

Biyomas konsantrasyonu, mikroalglerin spesifik büyüme oranı, her mikroalg türünün kendine özgü kültürel şartların sağlanmasıyla devamlılık göstermekte ve reaktör içerisindeki ortalama ışığa bağlı olarak maksimum konsantrasyonun oluştuğu tespit edilmiştir (Acien et al.,2001)

Aydınlanma süresinin değişimine bağlı olarak alglerde hücre gelişimi, pigment ve protein miktarındaki değişimlerin türler arasında değişim göstereceği açıktır. Bu nedenle özellikle kültür çalışmalarında yaygın olarak kullanılan *Chlorella vulgaris*' in aydınlanma süresine bağlı olarak hücre sayısı, pigment ve protein miktarındaki değişimlerin belirlendiği bu çalışma, bundan sonra *Chlorella vulgaris* üzerinde yapılacak çalışmalara ışık tutacaktır.

5. Kaynaklar

Acien Fernandez, F. G., Fernandez Sevilla, J. M., Sanchez Perez, J. A., Molina Grima, E. & Chisti, Y. (2001). Airlift-driven external-loop tubular photobioreactors for outdoor production of microalgae: assessment of design and performance. *Chemical Engineering Science*, 56, 2721–2732.

American Public Health Association [APHA]. (1985). *Standard methods for examination of water and wastewater* (16. baskı). Washington, DC: Yazar.

Becker, W. E. (1994). *Microalgae – Biotechnology and microbiology*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Campbell, N. A. & Reece, J. B. (2005). *Biyoloji* [Biology] (Çev. Palme Yayıncılık). Ankara, Türkiye: Palme Yayıncılık.

Cohen, Z., Vonshak, A. & Richmond, A. (1998). Effect of environmental conditions on fatty acid composition of the red alga *Porphyridium cruentum*: correlation to growth rate. *Journal of Phycology*, 24, 328–332.

Davis, A. R. (1997). *Principle of oceanography*. Florida, USA: University of South Florida Aquafarms, Inc.

Gökmen, S. (2007). *Genel ekoloji* [General ecology] (No. 1160). Ankara, Türkiye: Nobel Yayıncılık.

Graham, L. E. & Wilcox, L. W. (2000). *Algae*. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.

Gwinner, E. (1986). *Circannual rhythms*. Berlin, Almanya: Springer-Verlag.

Harper, J. L. & Hawksworth, D. L. (1994). Biodiversity: measurement and estimation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 345, 5–12.

Harris, G. P. (1987). *Phytoplankton ecology*. London, UK: Chapman & Hall.

Hu, Q. (2004). Environmental effects on cell composition. In A. Richmond (Ed.), *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology* (ss. 83–93). Oxford, UK: Blackwell.

Jensen, B. (1987). *Chlorella: Gem of the Orient*. California, ABD: Bernard Jensen.

Kirk, J. T. O. (1994). *Light & photosynthesis in aquatic ecosystems* (2. baskı). Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Kocataş, A. (1992). *Ekoloji, çevre biyolojisi* [Ecology, environmental biology] (No. 142). İzmir, Türkiye: Ege Üniversitesi Yayınları.

Lourenço, S. O., Barbarino, E., Mancini-Filho, J., Schinke, K. P. & Aidar, E. (2002). Effects of different nitrogen sources on the growth and biochemical profile of 10 marine microalgae in batch culture: an evaluation for aquaculture. *Phycologia*, 41, 158–168.

Lowry, O., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.

Lund, J. W. G. (1965). The ecology of the freshwater phytoplankton. *Biological Reviews*, 40, 231–293.

Molina Grima, E., Garcia Camacho, F., Sanchez Perez, J. A., Urda Cardona, J., Acien Fernandez, F. G. & Fernandez Sevilla, J. M. (1994). Outdoor chemostat culture of *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640 in a tubular photobioreactor for the production of eicosapentaenoic acid. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 20, 279–290.

Moss, B. (1988). *Ecology of freshwaters: Man and medium* (2. baskı). Oxford, UK: Blackwell Science.

Müller, U. (1994). Seasonal development of epiphytic algae on *Phragmites australis* in a eutrophic lake. *Archiv für Hydrobiologie*, 129, 83–88.

Özdiş, Ö. (2005). *Krom birikiminin Chlorella vulgaris'te hücre sayısı, klorofil, büyüme hızı, protein ve şeker miktarına etkileri* [Yüksek lisans tezi]. Adana, Türkiye: Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Özel, İ. (1992). *Planktonoloji, plankton ekolojisi ve araştırma yöntemleri*. İzmir, Türkiye: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Hidrobiyoloji AD Yayınları.

Randall, C. F., Bromage, N. R., Thrush, M. A. & Davies, B. (1991). Photoperiodism and melatonin rhythms in salmonid fish. In A. P. Scott, J. P. Sumpter, D. E. Kime & M. S. Rolfe (Ed.), *Proceedings of the 4th International Symposium on Reproductive Physiology in Fish* (ss. 136–138). Sheffield, UK: Fish Symp.

Reynolds, C. S. (2006). *Ecology of phytoplankton*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Richmond, A. (1986). *Microalgal mass culture*. Boca Raton, FL: CRC Press.

Richmond, A. (2004). Biological principles of mass cultivation. In A. Richmond (Ed.), *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology* (ss. 125–177). Oxford, UK: Blackwell Science.

Round, F. E. (1975). *The biology of algae*. London, UK: Edward Arnold.

Round, F. E. (1984). *The ecology of algae*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Singh, A. (1998). Perinatal influence of *Chlorella vulgaris* (E-25) on hepatic drug metabolizing enzymes and lipid peroxidation. *Anticancer Research*, 18(3A), 1509–1514.

Stevenson, R. J. & Stoermer, E. F. (1981). Quantitative differences between benthic algal communities along a depth gradient in Lake Michigan. *Journal of Phycology*, 17, 29–36.

Tanyolaç, J. (2000). *Limnoloji*. Ankara, Türkiye: Hatiboğlu Yayinevi.

Thompson, S. A., Rhodes, C. D. & Pettman, I. (1998). *Culture collection of algae and protozoa*. Kendal, UK: Titus Wilson & Son Ltd.

Vonshak, A. & Torzillo, G. (2004). Environmental stress physiology. In A. Richmond (Ed.), *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology* (ss. 57–82). Oxford, UK: Blackwell Science.

Yagui, C. O. R., Danesi, E. D. G., Carvalho, J. C. M. & Sato, S. (2004). Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: Cultivation with urea addition by fed-batch process. *Bioresource Technology*, 92, 133–141.

CHLORELLA VULGARIS'İN HÜCRE SAYISI, KLOROFİL MİKTARI VE BÜYÜME HIZINA AYDINLANMA SÜRESİNİN ETKİSİ

