

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**FARKLI LOKASYONLARDAKİ SUCUL ORTAMLARDAN (Bostancı-İstanbul,
İnegöl-Bursa, Merkez-Çanakkale) İZOLE EDİLEN MİKROORGANİZMALARIN
BİYOTEKNOLOJİK PROSESLERDE DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

GİZEM BAYAZIT

TEZ DANIŐMANI

PROF. DR. ÜLKÜYE DUDU GÜL

BİLECİK, 2023

10588159

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**FARKLI LOKASYONLARDAKİ SUCUL ORTAMLARDAN (Bostancı-İstanbul,
İnegöl-Bursa, Merkez-Çanakkale) İZOLE EDİLEN MİKROORGANİZMALARIN
BİYOTEKNOLOJİK PROSESLERDE DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

GİZEM BAYAZIT

TEZ DANIŐMANI

PROF. DR. ÜLKÜYE DUDU GÜL

BİLECİK, 2023

10588159

BEYAN

Farklı Lokasyonlardaki Sucul Ortamlardan (Bostancı-İstanbul, İnegöl-Bursa, Merkez-Çanakkale) İzole Edilen Mikroorganizmaların Biyoteknolojik Proseslerde Değerlendirilmesi adlı doktora tezi hazırlık ve yazımı sırasında bilimsel araştırma ve etik kurallarına uyduğumu, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezin herhangi bir kısmının Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını, aksinin tespit edileceği muhtemel durumlarda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Bu çalışmanın, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP), TÜBİTAK veya benzeri kuruluşlarca desteklenmesi durumunda; projenin ve destekleyen kurumun adı proje numarası ile birlikte, ETİK KURUL onayı alınması durumunda ise ETİK KURUL tarih karar ve sayı bilgilerinin beyan edilmesi gerekmektedir.			
DESTEK ALINMIŞTIR	X	DESTEK ALINMAMIŞTIR	
Destek alındı ise;			
Destekleyen kurum;			
Desteğin Türü		Proje Numarası	
TÜBİTAK 1002		122Z817	
ETİK KURUL onayı var ise;			
ETİK KURUL karar tarih/sayı:			

Gizem BAYAZIT

.....

Tarih

.....

İmza

.....

ÖN SÖZ

Yüksek lisans ve Doktora öğrenimim süresince benden her anlamda desteğini esirgemeyen ve üzerimde büyük emeği olan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Ülküye Dudu GÜL'e değerli katkı ve emekleri için teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

1002-Hızlı Destek Programı kapsamında 122Z817 numaralı proje ile çalışmama destek olan TÜBİTAK'a,

Savunma sınavı sunumu sırasında değerli fikirleri ile çalışmamın son haline gelmesine katkıları bulunan saygıdeğer jüri üyelerine,

Tez çalışmam sırasında bana her zaman destek olan arkadaşım Özge KAPUSIZ'a, ve,

Son olarak bugünlere ulaşmamdaki emekleri adına eşim Dr. Öğr. Üyesi Yıldırım BAYAZIT ve aileme teşekkür ederim.

Gizem BAYAZIT

2023

ÖZET

FARKLI LOKASYONLARDAKİ SUCUL ORTAMLARDAN (Bostancı-İstanbul, İnegöl-Bursa, Merkez-Çanakkale) İZOLE EDİLEN MİKROORGANİZMALARIN BİYOTEKNOLOJİK PROSESLERDE DEĞERLENDİRİLMESİ

Mikroalgler, süngerler ve mercanlar gibi canlılara karşı savunma için ürettikleri biyoaktif metabolitleri içeren fizyolojik adaptasyon özelliklerine sahiptirler. Fungus sınıfında yer alan bazı küfler ise antibiyotik gibi biyolojik aktivitelere sahip moleküller üretmektedirler. Mikroalgler ve funguslar doğal antimikrobiyal etki gösteren metabolitlere sahip oldukları için günümüzde antimikrobiyal ajan üretiminde büyük öneme sahiptirler. Ayrıca, hücre içlerinde biriktirdikleri protein, karbonhidrat, yağ asitleri, vitamin ve mineraller gibi değerli metabolitleri sebebiyle biyoyakıt hammaddesi olarak kullanılabilirliği gibi pek çok kullanım alanları bulunmaktadır. Bu tezin amacı; farklı lokasyonlardan alınan, tatlı (dere) ve tuzlu (deniz) su numunelerinden izole edilen mikroorganizmaların tür tanımlanmaları yapılarak, antimikrobiyal aktiviteleri ve biyoyakıt hammaddesi olarak kullanım kapasitelerini araştırmaktır. Su numuneleri İstanbul Bostancı Sahili'nden, Çanakkale Limanı'ndan ve Bursa İnegöl'de bulunan Kalbur Deresi'nden alınmıştır. Alınan su numunelerinden bir adet küf, iki adet mikroalg izole edilmiş ve moleküler tanımlamaları yapılmıştır. *Rhizopus stolonifer*, *Chlorella vulgaris* ve *Tetradismus obliquus* şeklinde tanımlanan izolatların özütleri etanol, metanol, dietil eter ve diklorometan çözücüleri kullanılarak elde edildikten sonra disk difüzyon ve minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) yöntemi ile antimikrobiyal aktiviteleri tayin edilmiştir. *Tetradismus obliquus* ve *Rhizopus stolonifer* özütlerinin belirgin bir antimikrobiyal aktivitelerinin olmadığı tespit edilmiştir. Öte yandan *Chlorella vulgaris*'in diklora metan özütünün MİK değerinin 78,125 µg/mL olduğu belirlenmiştir. İzolatların biyoyakıt hammaddesi olarak kullanılabilirliğini belirlemek için GC-FID ile yağ asidi metil esterleri (FAME) analizi yapılmıştır. Üç mikroorganizmada da ortak olarak bütirik asit, kaproik asit ve palmitik asit yüksek oranlarda bulunmuştur. Sonuç olarak izole edilen yerli izolatların sürdürülebilir ve çevre dostu enerji kaynağı olarak biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilirliği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mikroalgal Biyoteknoloji, Çevre Biyoteknolojisi, Alg Biyoyakıtları, Antimikrobiyal Aktivite, Fungus

ABSTRACT

EVALUATION OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM AQUACITY ENVIRONMENTS IN DIFFERENT LOCATIONS (Bostancı-İstanbul, İnegöl-Bursa, Merkez-Çanakkale) IN BIOTECHNOLOGICAL PROCESSES

Microalgae have physiological adaptation features that include bioactive metabolites they produce for defense against living creatures sponges and corals. Some molds in the fungus class produce molecules with biological activities such as antibiotics. Microalgae and fungi are of great importance in the production of antimicrobial agents today, as they have metabolites that have natural antimicrobial effects. In addition, they have many uses, such as being used as biofuel raw materials, due to the valuable metabolites such as proteins, carbohydrates, fatty acids, vitamins and minerals that they accumulate inside the cells. The aim of this thesis is to identify the species of microorganisms isolated from fresh (stream) and salt (sea) water samples taken from different locations, and to investigate their antimicrobial activities and usage capacities as biofuel raw materials. Water samples were taken from İstanbul Bostancı Coast, Çanakkale Port and Kalbur Creek in Bursa İnegöl. One mold and two microalgae were isolated from the water samples taken and their molecular identifications were made. After the extracts of the isolates identified as *Rhizopus stolonifer*, *Chlorella vulgaris* and *Tetradesmus obliquus* were obtained using ethanol, methanol, diethyl ether and dichloromethane solvents, their antimicrobial activities were determined by disk diffusion and minimum inhibition concentration (MIC) methods. It was determined that *Tetradesmus obliquus* and *Rhizopus stolonifer* extracts did not have any significant antimicrobial activity. On the other hand, the MIC value of the dichloromethane extract of *Chlorella vulgaris* was determined to be 78.125 µg/mL. Fatty acid methyl esters (FAME) analysis was performed with GC-FID to determine the usability of the isolates as biofuel feedstock. Butyric acid, caproic acid and palmitic acid were found in high levels in common in all three microorganisms. As a result, it has been determined that the local isolates can be used in biotechnological applications as a sustainable and environmentally friendly energy source.

Keywords: Microalgal Biotechnology, Environmental Biotechnology, Algal Biofuels, Antimicrobial Activity, Fungi

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖN SÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
GRAFİKLER LİSTESİ.....	x
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1. Su Kirliliği.....	3
2.2. Su Kirliliğinin Nedenleri ve Çeşitleri.....	3
2.2.1. Kimyasal Kirlenme.....	4
2.2.2. Fiziksel Kirlenme.....	4
2.2.3. Biyolojik Kirlenme.....	4
2.3. Sularda Bulunan Mikroorganizmalar.....	5
2.3.1. Mikroalglerin Sucul Ortamdan İzolasyonu ve Moleküler Tanımlaması.....	9
2.3.2. Mikroalglerin Kullanım Alanları.....	10
2.3.3. Mikroalglerde Antimikrobiyal Aktivite Tayini.....	11
2.3.4. Mikroalglerden Biyoyakıt Üretimi.....	12
2.3.4.1. Biyodizel Üretimi.....	15

2.3.4.2. Biyoetanol Üretimi.....	15
2.3.4.3. Biyogaz Üretimi.....	16
2.3.4.4. Biyohidrojen Üretimi.....	16
2.3.5. Mikroalglerin Biyoyakıt Hammaddesi Olarak Kullanım Kapasiteleri.....	17
3. MATERYAL VE METOT.....	20
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	20
3.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri.....	20
3.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	21
3.4. Numune Alımı.....	22
3.5. İzolasyon Çalışmaları.....	22
3.6. Moleküler Tanımlama.....	23
3.6.1. Fungus için DNA İzolasyonu, PZR ve Sekanslama.....	23
3.6.2. Mikroalgler için DNA İzolasyonu, PZR ve Sekanslama.....	25
3.7. İzole Edilen Fungusun Üretim Çalışması.....	26
3.8. İzole Edilen Mikroalglerin Üretim Çalışmaları.....	26
3.9. Optik Yoğunluk Ölçümü ve Kuru Ağırlık Metodu ile Mikroalg Büyüme Oranının Belirlenmesi.....	27
3.10. Mikroorganizmaların Özütlerinin Antimikrobiyal Aktivite Tayini.....	28
3.10.1. Özütlerin Hazırlanması.....	28
3.10.2. Disk Difüzyon Yöntemi.....	29
3.10.3. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu.....	30
3.11. Mikroorganizmaların Biyoyakıt Olarak Kullanılabilirliği.....	30
3.11.1. Hücre Gelişim Analizleri Ve Toplam Lipid Konsantrasyonu.....	30

3.11.2. Klorofil Analizleri.....	31
3.11.3. Yağ Asidi Metil Ester (FAME) Analizleri.....	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	33
4.1. İzolasyon ve Moleküler Tanımlama.....	33
4.2. Antimikrobiyal Aktivite Analizleri.....	41
4.3. Mikroalglerin Biyoyakıt Hammaddesi Olarak Kullanım Potansiyelinin Belirlenmesi.....	45
4.3.1. Hücresel Gelişim Analizi.....	45
4.3.2. Toplam Lipid Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	46
4.3.3. Klorofil Tayini.....	47
4.3.4. Mikroalglerin Serbest Yağ Asitlerinin Kimyasal Analizi.....	47
5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	52
KAYNAKÇA.....	56

TABLULAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Bazı Mikroalg Türlerinin Yapısındaki Bileşenlerin Yüzdelik Oranları.....	8
Tablo 3.1. BG11 Besiyeri Bileşenleri.....	20
Tablo 3.2. Numune Alınan Bölgelerin Koordinat Bilgileri.....	22
Tablo 3.3. PZR Koşulları.....	24
Tablo 3.4. Antimikrobiyal Aktivite DeneYlerinde Kullanılan Mikroorganizmalar.....	28
Tablo 4.1. Numune ve ÖZüt Miktarları.....	42
Tablo 4.2. <i>Chlorella vulgaris</i> Türünden Elde Edilen ÖZütlerin MİK Değerleri.....	45
Tablo 4.3. <i>Chlorella vulgaris</i> 'in Klorofil a ve b Değerleri.....	47
Tablo 4.4. <i>Tetradesmus obliquus</i> 'un Klorofil a ve b Değerleri.....	47
Tablo 4.5. <i>Chlorella vulgaris</i> 'in Yağ Asitleri İçeriği.....	48
Tablo 4.6. <i>Tetradesmus obliquus</i> 'un Yağ Asitleri İçeriği.....	49
Tablo 4.7. <i>Rhizopus stolonifer</i> 'in Yağ Asitleri İçeriği.....	50

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 3.1. Numune Alınan Bölgelere Ait Görüntüler.....	22
Şekil 3.2. İzolasyon Çalışmalarında BG11 Besiyerinde Gelişen Mikroalgelere Ait Görüntü...23	23
Şekil 3.3. İzole Edilen Fungusun Üretim Aşamasına Ait Görüntüler.....	26
Şekil 3.4. Mikroalglerin Erlenlerde Üretimi Aşamasına Ait Görüntü.....	27
Şekil 3.5. Mikroalglerin Büyük Ölçekli Üretimine Ait Görüntü.....	27
Şekil 3.6. Ultrasonik Su Banyosunda Özüt Hazırlanması Aşamasına Ait Görüntü.....	29
Şekil 3.7. Özüt Eldesi İçin Süzme İşlemine Ait Görüntü.....	29
Şekil 4.1. <i>Rhizopus stolonifer</i> ' in Moleküler Tanımlaması Sonucu Elde Edilen ITS DQ273817.1 Genomu Sekansı.....	33
Şekil 4.2. <i>Rhizopus stolonifer</i> 'in Mikroskop Görüntüsü (Optica B-20CR, 100x10)	34
Şekil 4.3. <i>Rhizopus stolonifer</i> 'in PDA'da Gelişim Gösteren Morfolojisinin Petri Görüntüsü..34	34
Şekil 4.4. <i>Rhizopus stolonifer</i> 'in Moleküler Tanımlaması Sonucu Elde Edilen ITS DQ273817.1 Genomuna Ait Jel Görüntüsü.....	34
Şekil 4.5. <i>Chlorella vulgaris</i> 'in Moleküler Tanımlaması Sonucu Elde Edilen 16S rRNA MK948102.1 Kloroplast Genomu Sekansı.....	35
Şekil 4.6. <i>Chlorella vulgaris</i> 'in Mikroskop Görüntüsü (Optica B-20CR, 100x10)	36
Şekil 4.7. <i>Chlorella vulgaris</i> 'in Agarlı BG11 Besiyerinde Gelişim Gösteren Morfolojisinin Petri Görüntüsü.....	36
Şekil 4.8. <i>Chlorella vulgaris</i> 'in Moleküler Tanımlaması Sonucu Elde Edilen 16S rRNA MK948102.1 Kloroplast Genomuna Ait Jel Görüntüsü.....	36
Şekil 4.9. <i>Chlorella vulgaris</i> Hücre Bileşenlerinin Şematik Gösterimi.....	37
Şekil 4.10. <i>Tetrademus obliquus</i> 'un Moleküler Tanımlaması Sonucu Elde Edilen 18S rRNA MG022741.1 Genomu Sekansı.....	38

Şekil 4.11. <i>Tetradasmus obliquus</i> 'un Mikroskop Görüntüsü (Optica B-20CR, 100x10)	39
Şekil 4.12. <i>Tetradasmus obliquus</i> 'un Agarlı BG11 Besiyerinde Gelişim Gösteren Morfolojisinin Petri Görüntüsü.....	39
Şekil 4.13. <i>Tetradasmus obliquus</i> 'un Moleküler Tanımlaması Sonucu Elde Edilen 18S rRNA MG022741.1 Genomuna Jel Görüntüsü.....	39
Şekil 4.14. <i>Tetradasmus obliquus</i> Kültürünün Kolonial Yapısı.....	40
Şekil 4.15. Disk Difüzyon Çalışmaları (<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Tetradasmus obliquus</i> ve <i>Rhizopus stolonifer</i> 'in Etanol-Metanol Özütleri)	42
Şekil 4.16. <i>B.subtilis</i> - <i>C.vulgaris</i> Diklorometan Özütü Disk Difüzyon Sonucu.....	43
Şekil 4.17. <i>S. aureus</i> - <i>C.vulgaris</i> Diklorometan Özütü Disk Difüzyon Sonucu.....	43
Şekil 4.18. <i>E. coli</i> - <i>C.vulgaris</i> Diklorometan Özütü Disk Difüzyon Sonucu.....	43
Şekil 4.19. <i>S. aureus</i> - <i>C.vulgaris</i> Dietil eter Özütü Disk Difüzyon Sonucu.....	43
Şekil 4.20. <i>E. coli</i> - <i>C.vulgaris</i> Dietil eter Özütü Disk Difüzyon Sonucu.....	43
Şekil 4.21. <i>Chlorella vulgaris</i> Türünden Elde Edilen Özütün <i>E. coli</i> Üzerine MİK Analizi Mikroplate Görüntüsü.....	44
Şekil 4.22. <i>Chlorella vulgaris</i> Türünden Elde Edilen Özütün <i>S. aureus</i> Üzerine MİK Analizi Mikroplate Görüntüsü..	44
Şekil 4.23. <i>Chlorella vulgaris</i> Türünden Elde Edilen Özütün <i>B. subtilis</i> Üzerine MİK Analizi Mikroplate Görüntüsü.	45

GRAFİKLER LİSTESİ

	Sayfa
Grafik 4.1. <i>Chlorella vulgaris</i> 'in OD ve Kuru Ağırlık Değerleri.....	46
Grafik 4.2. <i>Tetradesmus obliquus</i> 'un OD ve Kuru Ağırlık Değerleri.....	46
Grafik 4.3. <i>Chlorella vulgaris</i> Yağ Asidinin Kromatogramı.....	48
Grafik 4.4. <i>Tetradesmus obliquus</i> Yağ Asidinin Kromatogramı.....	50
Grafik 4.5. <i>Rhizopus stolonifer</i> Yağ Asidinin Kromatogramı.....	51

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

MİK: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

GC-FID: Gaz Kromatografi Alev İyonlaştırma Dedektörü

FAME: Yağ Asidi Metil Esterleri

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

RNA: Ribonükleik Asit

SSU: Ökaryot Hücrelerdeki Küçük Alt Birim

ITS: Internal Transcribed Spacer

OD: Optic Density

X: Kuru Ağırlık

μ: Büyüme Oranı

P_{max}: Maksimum Üretkenlik

t: Zaman

DEE: Dietil Eter

DKM: Diklora metan

SDA: Sabouraud Dextroz Agar

SDB: Sabouraud Dextroz Broth

PDA: Potato Dextrose Agar

PDB: Potato Dextrose Broth

BG11: Blue-Green Algae Medium

MHB: Muller Hinton Broth

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

DYA: Doymuş Yağ Asidi

TDYA: Tekli Doymamış Yağ Asidi

TYA: Trans Yağ Asidi

ÇDYA: Çoklu Doymamış Yağ Asidi

1. GİRİŞ

Su, yaşayan bütün canlılar için en önemli doğal kaynaklardan biridir. İnsan kullanımı, ekonomik kalkınma, ekosistem devamlılığı ve enerji üretimi gibi suyun kullanıldığı pek çok sektör vardır (Aksungur ve Firidin, 2008: 9). Canlıların su ihtiyaçları, nüfus artışı, endüstrinin gelişmesi, iklim değişikliği, küresel ısınma ve su kirliliği sebepleri ile kısıtlı olan su kaynaklarımız gün geçtikçe azalmaktadır (Kayaer ve Çiftçi, 2018, 387). Bu nedenle başta Birleşmiş Milletler olmak üzere tüm dünya ülkelerinin ortak gayesi; su kaynaklarının geliştirilmesi, korunması ve sürdürülebilir şekilde verimli kullanılmasıdır (Avcı, 2021: 4). Dünyadaki suyun %97,5'i tuzlu su %2,5'i ise tatlı sudur (Avcı, 2021: 4). Tuzlu su kaynakları deniz ve okyanuslardan oluşurken, tatlı su kaynakları ise akarsular, nehirler, dereler, göller, yeraltı suları ve buzullardır (Baran, 2017: 73). Su kaynaklarımızın azalması ve kullanılamayacak duruma gelmesinin, özellikle gelişmekte olan ülkelerde su kalitesinin bozulmasının başlıca nedeni tarım, sanayi ve evlerden kaynaklanan atıksuların deniz, göl ve nehirlere deşarj edilmesidir (Chen vd., 2022: 2). Ülkemizde de 2021 yılında Marmara Denizi'nde görülen müsilaj oluşumunun en büyük sebebi iklim değişikliği ile birlikte endüstriyel kaynaklı atıksuların denize deşarj edilmesidir (Kayhan, 2022: 9). Müsilaj bazı araştırmacılar tarafından fitoplanktonların ya da mikroalglerin ürettiği, deniz gibi su kütlelerinin her katmanında bulunan, yüzen, jelatinimsi kolloid maddenin yaygın görünümü olarak tanımlanmaktadır (Kayhan, 2022: 5). Denizdeki biyolojik üretimin başlangıcını oluşturan ve besin zincirinin ilk basamağında yer alan fitoplanktonlar özellikle ani ısı değişikliklerinin olduğu ilkbahar sonu ya da sonbahar başı gibi ısınma periyotlarında fazla miktarda çoğalmaktadırlar (Aydın ve Uzar, 2009: 88). Bu şekilde besin zincirinin ilk basamağını teşkil eden fitoplankton adı verilen mikroalgler başta olmak üzere fungus ve bakteri gibi mikroorganizmaların metabolik atıkları olarak tanımlanan müsilaj genellikle sakin sucül ortamlar olan karışmayan deniz, baraj ve göllerde floklaşma sonucu derinlerde ve/veya su yüzeyinde oluşmaktadır (Türk Mühendis ve Mimar Odaları Birliği Çevre Mühendisleri Odası Raporu, 2021: 2). Deniz karı, birikmiş biyokütle, köpük birikimi, yumak oluşumu ve mukus oluşumu olarak da bilinen müsilaj, esas olarak bazı denizel canlıların meydana getirdiği organik materyaller olarak tanımlanmaktadır (Özalp, 2021: 49). Özalp (2021)'e göre deniz ortamındaki müsilajın kökeni, esas olarak planktonik organizmalar ve bentik filamentli alglerdir. Önceki yıllarda yapılan çalışmalarda Marmara Denizi'ndeki yoğun müsilaj oluşumunun; denizlerde bulunan bazı fitoplanktonların, mikroalglerin ve bakterilerin hücrel boşaltım süreçlerinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Balkis vd., 2011: 771). Dünya

denizlerinde kaydedilmiş toplam 4000 planktonik mikroalg türünün yaklaşık 200 tanesi zararlı olarak bildirilmiştir (Aydın ve Uzar, 2009: 88). Bu tür canlıların ürettikleri toksinler insanların, deniz memelilerinin ve diğer deniz canlılarının ölüm veya hastalıklarından sorumlu olmanın yanı sıra suların renk değişimi, köpük ve ölü balıklar ile kumsalların kirletilmesine kadar çok çeşitli sağlık ve çevre sorunlarına neden olmaktadır (Zingone vd., 2000: 732). Ayrıca bu toksinlerin besin zinciri yoluyla taşınması birçok deniz organizmasına zarar vermek suretiyle denizel ekosistemleri olumsuz etkilemektedir (Anderson vd., 2001: 21). Özellikle besin zincirinde yer alan balıkların zarar görmesi sonucu ortaya çıkan biyolojik ve ekolojik sorunların yanı sıra balıkçılık endüstrisini de olumsuz etkilenmektedir (Karlson vd., 2021: 9). Ayrıca müsilaj oluşumu neticesinde deniz suyunu kaplayan salyamsı yapı ağları kaplayarak, teknelerin pompalarına ve filtrelerine zarar vermekle birlikte turizm açısından da çok büyük sorunlara neden olmaktadır (Karlson vd., 2021: 13). Bu tür durumlar ülke ekonomisini olumsuz etkilemektedir. Zararlı alg çoğalmaları küresel olarak gözlenmektedir ve balıkçılık, su ürünleri yetiştiriciliği, turizm ve rekreasyon üzerinde ciddi etkilere sahiptir. Geçmişte 1990'larda kuzey Adriyatik Denizi'nde meydana gelen mikroalgal büyüme ile müsilaj oluşumu gözlenmiştir (Precali vd., 2005: 11). Kuzey Adriyatik Denizi'ndeki müsilaj olayının doğrudan sorumlularının, her ikisi de büyük miktarlarda refraktör polisakkaritler üretebilen *Cylindrotheca closterium* ve *Gonyaulax fragilis* gibi sularda bol bulunan fitoplankton türleri olduğu düşünülmüştür. Bu türlere ek olarak *Skeletonema costatum* de Marmara Denizinde ilk defa 2007- 2009 yılları arasında görülen müsilaj olayı esnasında bolca bulunduğu rapor edilmiştir (Zingone vd., 2021: 10). Müsilaja sebep olan fitoplankton, mikroalg ve diğer mikroorganizmaların, fazla üremelerinin getirdiği zararlarının yanı sıra bazı türlerin hücre içinde biriktirdikleri karbonhidrat, yağ ve vitaminler sayesinde insanlar tarafından besin olarak, vücutta üretilmeyen vitamin ve yağ asitleri içermelerinden dolayı sağlık, kozmetik, ilaç gibi alanlarda, atıksu arıtımında, ağır metal gideriminde, biyomalzeme yapımında ve yüksek yağ içeren türler ile biyoyakıt üretiminde kullanılmaktadır (Aydın, 2019: 83).

Bu tez çalışmasında hem denizden alınan müsilaj numunelerindeki hem de tatlı su kaynağından alınan örnekteki mikroorganizmaların izolasyonu, tanımlanması ve bu mikroorganizmaların farklı biyoteknolojik proseslerde kullanılabilirliğinin belirlenmesine yönelik antimikrobiyal aktivite tayini gerçekleştirilmiş olup, ilgili mikroorganizmaların biyoyakıt hammaddesi potansiyeli belirlenmiştir.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Su Kirliliği

Hızlı nüfus artışına karşılık olarak sanayi, kalkınma ve kentleşme faaliyetleri de hızla büyümüş ve bu büyümenin olumsuz sonucunda; günümüz dünyasında hastalıklara neden olan ve insan sağlığını tehdit eden ciddi su krizleri ve su kirliliği ortaya çıkmıştır (Mu vd., 2023: 1). Birleşmiş Milletler Dünya Su Geliştirme Raporu 2015'e göre, gelişmekte olan ülkelerdeki kanalizasyonun %90'ı işlenmeden doğrudan su kütlelerine boşaltılmaktadır (WWAP, 2016: 79). Endüstriyel süreçlerden kaynaklanan çevre kirliliği, savunmasız ekosistem, insan yaşamları ve küresel sağlık için başlıca tehdit haline gelmiştir (Song vd., 2023: 1). Kentin görünümünü bozmak ve canlı sağlığını tehlikeye atmak, kirlenmiş su kaynaklarının olumsuz etkilerinden bazılarıdır (Wang vd., 2021: 1; Zhu vd., 2022: 2). İyileştirme çözümleri ve uzun vadeli su yönetimi, çeşitli antropojenik kaynaklı sorunların su kalitesi üzerindeki etkisinin anlaşılmasına bağlıdır (Zhao vd., 2020: 1). Su kalitesi değerlendirmesi, suyla taşınan kirleticilerin kökenlerini, yayılmasını ve potansiyel sağlık etkilerini belirlemek için hayati önem taşır (Bera vd., 2022: 13). Son yıllarda suları sınıflandırmak ve değerlendirmek için istatistiksel teknikler, modelleme analizleri ve su kalitesi indeksi dahil olmak üzere çeşitli su kalitesi değerlendirme yaklaşımları kullanılmaktadır (Liu vd., 2021: 16). Güvenli su ve su kirliliğine neden olan atıkları yok etmenin hijyenik yöntemleri temel insan haklarıdır (Rather vd., 2023: 2). Gelişmekte olan birçok ülkenin halk sağlığı, düşük su kalitesi ve kirli sudan bulaşan hastalıklara yakalanma olasılığı nedeniyle tehlikeydedir (Yan vd., 2021: 1; Wei vd., 2021: 1).

2.2. Su Kirliliğinin Nedenleri ve Çeşitleri

Artan kentleşme, sanayileşme ve nüfus yoğunlukları, ekosistem fonksiyonlarını ve insan sağlığını etkileyen atıklar toprakları, havayı ve su kütlelerini kirletmektedir. Tarımsal atıklar, madencilik ve endüstriyel atıklar, kentsel akış, işlenmiş ve işlenmemiş evsel atıklar ve hayvancılık, çevreye antropojenik kirletici sağlayan kaynaklardır (Gupta vd., 2023: 1). Evsel, endüstriyel ve tarımsal faaliyetler sonucu çok çeşitli bileşikler üretilmekte ve kullanılmaktadır. Ağır metaller, sentetik organik bileşikler ve radyoaktif izotoplar gibi bileşikler yerel kirletici konsantrasyonlarını yükselterek ekosistemleri kirletmektedir (Gillings vd., 2015: 1269). Mikrobiyolojik kirleticilerle birlikte insan faaliyetlerinden kaynaklanan kirlilik, bir etki alanı oluşturmaktadır (Rockström vd., 2009: 1). Ayrıca, antibiyotikler gibi çeşitli kirletici sınıfları; son derece düşük konsantrasyonlarda önemli biyolojik etkilere

sahtiptir (Gillings, 2013: 2). Genel hatlarıyla su kirliliği; kimyasal, fiziksel ve biyolojik kirlenme olarak üç gruba ayrılmaktadır.

2.2.1. Kimyasal Kirlenme

İnsan faaliyetleri kimyasal kirliliğin itici gücü olarak kabul edilmektedir (Wang vd., 2021: 1). Antropojenik faaliyetlerden kaynaklanan emisyonlar doğrudan veya dolaylı olarak doğal su kaynaklarına boşaltılır ve su kütlelerinin tarımsal, endüstriyel ve evsel kimyasallarla (örneğin ağır metaller ve organik kirleticiler) kirlenmesine yol açar (Posthuma vd., 2020: 2). Tehlikeli kimyasal maddeler yaban hayatı, ekosistem kararlılığı ve işlevi ile insan ve canlı sağlığı için tehdit oluşturmaktadır (Gerbersdorf vd., 2011: 1099; Posthuma vd., 2020:3). Kimyasal kirleticiler zamanla çökelerek birikmektedir (De Castro-Catal`a vd., 2016: 298). Kimyasal kirleticiler; toksik elementler (arsenik, selenyum vb.), radyoaktif çekirdekler (radyum, uranyum vb.), ağır metaller (çinko, krom, nikel vb.), tekstil boya ları, asit ve baz solüsyonları olarak tanımlanmaktadır (Zaporozec ve Miller, 2000: 8).

2.2.2. Fiziksel Kirlenme

Suyun fiziksel kalite parametrelerinin canlı yaşamını tehlikeye sokacak biçimde bozulmasına neden olan kirlenmedir. Suların renk, bulanıklık, koku, tat, iletkenlik ve sıcaklıklarının değişmesine neden olan kirleticiler, genel olarak suların üst yüzeyinde yüzen veya suda çözülmüş halde bulunan kirleticilerdir (Karpuzcu ve Koçalı, 2007: 4).

2.2.3. Biyolojik Kirlenme

Suyu izlemenin en önemli yollarından biri mikrobiyolojik izlemedir çünkü kirli su aynı zamanda hastalıkların yayılması için de önemli bir araçtır. Gelişmekte olan ülkelerde çoğu çocuk olmak üzere her yıl milyonlarca insan suyla ilgili hastalıklar nedeniyle ölmektedir (Singh ve Singh, 2014: 12; Andrade vd., 2018: 542). Patojenik organizmalar tüm ekosistemlerin normal bileşenleridir. Ancak antropojenik aktivite sonrası fekal bakterilerle mikrobiyolojik kontaminasyon sonucunda tüm kirlilik nehirler boyunca havzalara ve denizlere taşınmaktadır (Şener vd., 2020: 1). Bu nedenle suda patojenik bakterilerin varlığı, insan ve hayvan sağlığının korunması için büyük bir endişe oluşturmaktadır. Sularda doğal olarak bulunan mikroorganizmalar (bakteri, mantar, alg vb.), sulara bırakılan organik atığın mikrobiyal bozunması sonucunda ortaya çıkan amonyak, nitrat, nitrit ve fosfat gibi inorganik maddeleri fazlaca tüketmeleri sebebi ile ötrofikasyon, müsilaj vb. sorunlara sebep olmaktadır (Karpuzcu ve Koçalı, 2007: 5). Bu olayların sonucunda sudaki oksijen azalarak,

mikroorganizmaların ölmesi veya metabolik atıklarının kümeleşmesi meydana gelir ve sucul canlılarla birlikte dolaylı yoldan insan hayatı da tehdit altına girmektedir (Chin, 2006: 199).

2.3. Sularda Bulunan Mikroorganizmalar

Yaşamın başlangıç noktası olan sucul ortamlar virüsler, bakteriler, protozoalar, fitoplanktonlar, funguslar ve algler başta olmak üzere pek çok mikroorganizma barındırırlar (Gündoğdu vd., 2007: 498). Sucul ekosistemde inorganik hammadde ile beslenen mikroorganizmalar litotrof, organik hammadde ile beslenenler organotrof; hücre dokusu oluşturmada inorganik karbonu (CO₂) kullanan mikroorganizmalar ototrof, organik bileşiklerden karbon sağlayanlar heterotrof; enerjilerini güneş ışığından karşılayan mikroorganizmalar fototrof, kimyasal reaksiyonlardan karşılayanlar kemotrof olarak isimlendirilirler (Gündoğdu vd., 2007: 497). Fototrofik mikroorganizmalar sülfür bakterileri/virüsler (heterotrofik) ve algler/mikroalgler/fitoplanktonlar (ototrofik) olarak ayrılırken, kemotrofik mikroorganizmalar protozoalar/funguslar/bakteriler (heterotrofik) ve nitrifikasyon bakterileri (ototrofik) olarak ayrılırlar (Rheinheimer, 1985: 162).

Virüsler, DNA veya RNA'dan oluşan bulaşıcı ve zorunlu hücre içi parazitlerdir. Virionlar, virüslerin bulaşıcı formudur ve duyarlı bir hücreye olan yolculuğu sırasında virüs genomunu korumak ve hücreye girişini kolaylaştırmak için vardır. Virüs genomları, uygun konakçı hücrelerde hücresel sistemleri kullanarak kendi replikasyonlarını ve diğer viral bileşenlerin sentezini yönetir (Schramm ve KrijnsLocker, 2005: 840). Virüsler soğuk algınlığı, kızamık, su çiçeği ve Coronavirüs gibi hastalıklardan sorumludur (Matthews ve Marsh, 2007: 516). Kızamık ve ishale sebep olan rotavirüsler ve norovirüsler sularda ve havuzlarda uzun süre yaşayabikleri için salgın hastalıklara sebep olurlar (Irmak, 2008: 25).

Bakteriler, tek hücreli prokaryot canlılardır (Gest, 2004: 188). Küresel (coccus), spiral (spirillum), çubuksu (basil) ve virgül (vibrio) şekillerinde olmaktadır. Bakteri hücresi; çekirdek, kapsül, hücre duvarı, plazma zarı, sitoplazma, plazmit, kamçı, ribozom ve pilustan oluşmaktadır (Lodish vd., 2002: 2). Bakteri hücresi hücre zarı olarak adlandırılan lipit bir zarla çevrilidir. Hücre duvarı, peptidoglikandan oluşmaktadır. Peptidoglikan, peptit zincirler ile birbirine çapraz bağlanmış protein ve amino asit içeren polisakkarit zincirlerden oluşmaktadır (Heijenoort, 2001: 25). Hücre duvarı bakterilerin gram pozitif ve gram negatif olarak sınıflandırılmasında görev almaktadır. Gram-pozitif (mor) hücreler, pek çok peptidoglikan ve teikoik asit tabakasından oluşan kalın bir hücre duvarına sahiptir. Buna karşın, Gram-negatif (pembe) bakterilerde birkaç peptidoglikan tabakası bulunur, bunun etrafını ikinci bir hücre zarı sarar, bu zarda lipopolisakkaritler ve lipoproteinler bulunmaktadır

(Hugenholtz, 2002: 4). Bakteriler, eşeysiz olarak ikiye bölünerek ürerler. Hücre bölünmesinde birbirinin aynı iki hücre meydana gelir (Koch, 2002: 65). Tuzlu sularda bulunan bakterilere örnek olarak *Pseudomonas sp.*, *Vibrio sp.*, *Bacillus sp.*, *Pediococcus sp.* ve *Halobacterium sp.* türleri verilirken, tatlı sularda bulunan bakterilere *Pseudomonas fluorescens*, *Chryseobacterium scophthalmum* ve *Legionella sp.* türleri verilebilir (Kılınç, 2019: 536; Otay, 2015: 1; Irmak, 2008:32). Bu bakteriler balıklarda hastalıklara neden olurken özellikle *Legionella sp.* türleri ayrıca insanlarda solunum sistemi bozukluğuna sebep olmaktadır (Irmak, 2008:32). Patojen olan bakterilerin yanında sularda bulunan nitrifikasyon bakterileri (*Nitrosomonas* ve *Nitrobacter*) amonyağın önce nitrite, nitritinde nitrata dönüştürülmesinde rol alarak sucul ekosistemlerde büyük bir öneme sahiptirler (Kıvanç vd., 2004: 2).

Protozoalar, genellikle heterotrofları ve tek hücrelilikleri ile tanımlanan ökaryotik mikroorganizma grubudur. Serbest yaşayan protozoalar hem sucul hem de karasal habitatlarda yaşarlar (Şenler ve Yıldız, 2010:7). Protozoalar patojen simbiyontlardır. Protozoa olarak tanımlanabilecek organizmalar tüm ana ökaryotik gruplarda bulunduğu için, protozoa çeşitliliği neredeyse tüm ökaryot çeşitliliğini kapsar. Buna göre, ilk ökaryot muhtemelen bir protozoaya benziyordu ve fagotrofi, fototrofinin kazanılması da dahil olmak üzere ökaryotik evrimde önemli bir rol oynamaktadır (Wiser, 2022: 1). Çekirdek, endoplazmikretikulum, ribozom, golgi aygıtı, mitokondri, lizozom, peroksizom, mikrotübüller ve filamentorganelleri bulunmaktadır. Hareket organelleri olarak yalancıayaklar, kamçılar ve silleri bulunmaktadır. Ototrof, çürükçül, parazit, miksotrof ve heterotrof beslenme görülmektedir. Eşeysiz bölünerek veya tomurcuklanarak çoğalırlar (Hacettepe Ders Notları, 2023). İnsanlar, hayvanlar ve bitkiler için zararlı olmalarının yanında, atıksuların arıtımında aktif çamur prosesinde önemli bir rol oynamaktadırlar (Yang vd., 2022: 2). Aktif çamurda bulunan protozoalar, bakteri popülasyonlarıyla doğrudan veya dolaylı olarak etkileşime girebilmektedirler. Çözünmüş substratlar için rekabet veya belirli bakteriler için toksik ve diğer mikroorganizmalar için uyarıcı etki yaratırlar. Bu etki, atıksu arıtma prosesi açısından etkilidir ve daha kaliteli bir atıksu sağlamaktadır (Janiak, K. vd., 2023: 1).

Fitoplanktonlar besin zincirinin ilk halkasını oluşturan tek hücreli algler olarak da tanımlanmaktadır. Bitkilere benzer yapıda olup, hem tek hücre hem de koloni olarak yaşayan bu canlılar ışığa bağımlı (fotosentez yapan) oldukları için suların üst tabakasında yaşarlar (Haşimoğlu, 2009: 10). Karbon ve sülfür gibi elementlerin dönüşümüne destek oldukları için ekosistemde önemli bir yere sahiptirler. Diatomlar, dinoflagellatlar, coccolithophoridsler, yeşil alg ve mavi-yeşil algler sulardaki başlıca fitoplanktonlardır (Haşimoğlu, 2009: 10).

Sularda azot veya fosfor fazla olduğunda, fitoplanktonlar üstel büyüme göstererek alg patlamasına neden olmaktadır. Diğer mikroorganizmalar hızla oksijeni tüketmekte ve alg patlamasını zararlı hale getirerek tatlı sularda ötrofikasyona, tuzlu sularda müsilağa sebep olmaktadır (McNabney vd., 2023: 2). Fitoplanktonlar yeryüzündeki oksijenin yarısını üretmekte, atmosferdeki karbondioksiti azaltmakta, bulut oluşumunda, su döngüsünün tamamlanmasında ve besin kaynağı olarak rol almaktadırlar (Eker-Develi, 2009: 287).

Funguslar, hif şeklinde dallanmış somotik yapıları bulunan, klorofil içermeyen, spor oluşturan ökaryotik mikroskobik canlılardır (Kıvanç ve Güven, 2009: 29). Fungus hücresi, en dışta hücre duvarı olmak üzere, sitoplazmik membran, sitoplazma ve çekirdekten oluşmaktadır (Kıvanç ve Güven, 2009: 30). Aerobik olan funguslar enerjiyi organik maddenin oksidasyonundan sağlamaktadırlar (Akkara ve Tosun, 2014: 47). Fungusların birçoğu toprakta ve bitkisel atıklarda yaşarken, bir kısmı da tatlı ve tuzlu sularda bulunmaktadır (Kıvanç ve Güven, 2009: 29). Funguslar; tek hücreli mayalar ve küfler, çok hücreli şapkalı ve yer mantarları olarak sınıflandırılmaktadır (Bennet, 1998: 101). Zararlı fungusların bulunmasının yanı sıra, pek çok fungus türünden biyoteknolojik olarak gıda, ilaç, enzim, biyopolimer üretimi, vitamin ve lipid üretimi gibi endüstriyel alanlarda yararlanılmaktadır (Ghorai vd., 2009: 578). Toprakta bulunan funguslar, organik materyalin parçalanmasına, bitkilere besin sağlamasına ve ekosistemin işleyişine yardımcı olmaktadır (Abacı ve Haliki, 2005: 1). Flamentli fungusların çoğu (küfler ve mayalar); *Aspergillus niger*, *Candia krusei*, *Penicillium cyclopium*, *Saccharomyces spp.*, *Trichoderma reesei* vb. yüksek protein içerikleri sayesinde tek hücre proteini üretiminde kullanılmaktadır (Anupama ve Ravindra, 2000: 461). Funguslardan elde edilen enzimler; kağıt yapımında, şarap endüstrisinde, çamaşır tozu ve deterjan endüstrisinde, gıda endüstrisinde gıdalara renk verme ve katkı maddesi yapımında, peynir üretiminde, deri ve ilaç üretiminde kullanılmaktadır (Kıran vd., 2006: 13,14,16). Fungusların kullanıldığı önemli bir alanda biyoyakıt üretimidir. Mikrobiyal lipidlerin bitkisel yağlara benzer yapıda olması ve fungus gibi yüksek büyüme oranına sahip organizmalar, biyoyakıt üretiminde maliyetin azaltılması için güçlü kaynaklardır (Nouri vd., 2019: 11). Yağlı funguslardan bazıları; *Rhodotorula graminis*, *Rhodospiridium toruloides*, *Cryptococcus curvatus*, *Mucor circinelloides*, *Lipomyces starkeyi*, *Trichoderma reesei* (Nouri vd., 2019: 11).

Mikroalgler, tek hücreli veya çok hücreli mikroskobik formlarda bulunan sucul ortamlarda yaşayan prokaryotik ya da ökaryotik canlılardır (Pereira ve Magalhaes, 2014). Besin zincirinin temel canlılarından olan mikroalgler primer üreticilerdir (Cirik ve Cirik,

2011). Tatlı ve tuzlu sularda yaşayan mikroalgler fotosentetik organizmalardır (Tekdal ve Ünek, 2019: 66). Tek hücreli veya basit çok hücreli yapıları sayesinde olumsuz şartlarda bile yaşayabilmektedirler (Mata vd., 2010: 219). 30000'e yakın türü bilinen mikroalglerin 50000'den daha fazla olabileceği tahmin edilmektedir (Mata vd., 2010: 219). Mikroalgler; %4-55 lipitlerden, %6-57 karbonhidratlardan ve %10-63 proteinlerden oluşmaktadır (Elcik ve Çakmakçı, 2017: 796). Bazı mikroalg türlerinin yapısındaki bileşenlerin yüzdeler oranları Tablo 2.1'de verilmiştir. Ototrofik mikroalgler pigmentleri sayesinde fotosentez yaparak karbondioksit, su ve güneş ışığını biyokütleyle dönüştürürler (Zhu, 2015: 1377). Heterotrofik mikroalgler, ışık olmayan ortamlarda organik karbonu kullanırlar. Miksotrofik mikroalgler, ototrofik ve heterotrofik beslenmenin birleşimi olup hem organik hem de inorganik karbonu kullanırlar (Chen vd., 2011: 62). Doğada kendiliğinden yetişen mikroalgler laboratuvar ortamında kültüre alınarak yetiştirilmektedirler (Borowitzka ve Moheimani, 2013: 24). İlk kültür çalışması *Haematococcus pluvialis* türü ile yapılmıştır (Elcik ve Çakmakçı, 2017: 797). Modern kültür çalışmaları ise *Chlorella vulgaris* ile başlamıştır (Borowitzka ve Moheimani, 2013: 24). Cambridge ve ABD'de 1951 yılında, pilot ölçekli açık sistemler *Chlorella* türü mikroalg üretimi için kullanılmıştır (Oswald ve Golueke, 1960: 225). 1980 yılında ABD'de *Spirulina* türü üretimi için kanal tipi yetiştirme havuzları yapılmıştır (Borowitzka ve Moheimani, 2013: 24).

Tablo 2.1. Bazı Mikroalg Türlerinin Yapısındaki Bileşenlerin Yüzdeler Oranları

Mikroalg	Karbonhidrat	Protein	Lipit
<i>Chlorella vulgaris</i>	6-10	25-30	30-40
<i>Scenedesmus obliquus</i>	10-17	50-56	12-14
<i>Spirulina platensis</i>	8-14	46-63	4-9
<i>Prymnesium parvum</i>	25-33	28-45	22-38
<i>Porphyridium cruentum</i>	40-57	28-39	9-14
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	17	48	21

Kaynak: (Elcik ve Çakmakçı, 2017: 797)

Yüksek rekabet ortamında yaşayan sucul organizmalar terpenoidler, alkaloidler, poliketidler, şikimik asit türevleri, şekerler, steroidler ve çok sayıda farklı kimyasal sınıfa ait benzersiz ve güçlü peptitlerin ve metabolitlerin üretimini içeren biyokimyasal ve fizyolojik

mekanizmalar geliştirmiştir (Catalani vd., 2016: 410). Literatürde, sucul mikroorganizmaların hücre içinde biriktirdikleri karbonhidrat, yağ ve vitaminler sayesinde insanlar tarafından besin olarak, vücutta üretilmeyen vitamin ve yağ asitleri içermelerinden dolayı sağlık, kozmetik, ilaç gibi alanlarda, atıksu arıtımında, ağır metal gideriminde, biyomalzeme yapımında ve yüksek yağ içeren türler ile biyoyakıt üretiminde kullanıldığı belirtilmiştir (Aydın, 2019: 81).

2.3.1. Mikroalglerin Sucul Ortamdan İzolasyonu ve Moleküler Tanımlaması

Sucul ortamlardan numune toplanırken özel su şişeleri kullanılmaktadır (Çınar vd., 2019: 1145). Kullanılacak bütün malzemelerin mümkün olduğunca steril olmasına dikkat edilmektedir. Derinden toplanan numuneler basınca, ışığa ve sıcaklık değişimlerine duyarlı olacağından dolayı bekletilmeden özel su şişeleri ile laboratuvara getirilmelidir. Mikroalg izolasyon yöntemleri arasında; mikropipet ile izolasyon, dilüsyon, yerçekimi ile izolasyon, fototaksis, mikromanipülasyon ve akış sitometrisi (flow sitometri) bulunmaktadır (Çınar vd., 2019: 1145).

Başarılı bir izolasyon için ilk adım, doğal olarak oluşan çevre koşullarını anlamak ve taklit etmektir. Deniz mikroalgleri için sıcaklık ve tuzluluk önemli iken okyanus mikroalgleri için su kalitesi ve metal toksisitesi büyük önem taşımaktadır. Yaz aylarında toplanan tatlı su mikroalgleri genellikle sıcaklığa daha az duyarlıdır ancak pH veya alkalilik önemli olabilir. Asitli ortamlardan veya aşırı tuzlu ortamlardan toplanan mikroalgler, özel kültür ortamı gerektirir (Andersen, 2005; 83). Başarılı izolasyona yönelik ikinci adım, kirleticilerin, özellikle de hedef türlerle rekabet edebilecek olanların ortadan kaldırılmasını içerir. Son adım, alt kültürleme üzerine sürekli büyümeyi gerektirir. Hedef türlerin izolasyonun ilk aşamalarında büyümesi ve daha sonra taze kültür ortamına bir veya daha fazla transfer edilmesi gerekmektedir (Andersen, 2005; 83).

Organizmaların filogenetik akrabalığı genetik dizilerinin karşılaştırılmasından çıkarılır (Burja vd., 2001: 195). Mikroalglerin moleküler tanımlaması kültüre dayalı ve kültüre dayalı olmayan yaklaşımlar olarak ikiye ayrılmaktadır. Kültüre dayalı olmayan yöntemde çevresel örneklerin sekansları, bilinen türlerin tanımlanmasında DNA barkodlarının kullanımı, Blast analizi, GeneBank verilerinin doğrulanması ile meta verilerinin analizi sonucu tür tanımlaması yapılmaktadır (Darienko vd., 2015: 2). Kültüre dayalı yaklaşımda ise, izole edilen tüm suşların SSU, ITS, 16S ve 18S sekansları, DNA barkodlarının kullanımı, farklı filogenetik metodlar ile moleküler filogeni, farklı koşullar altında morfoloji ve hayat siklusunun incelenmesi ile tür tanımlaması yapılmaktadır (Darienko vd., 2015: 3). Ökaryotlar için evrensel primerler olan ve moleküler tanımlama yöntemlerinde en sık kullanılan EukA ve

EukB primerleri 18S rRNA dizisinin neredeyse tüm uzunluğunu büyütmedirler (Matsunaga vd., 2016: 406). Tüm prokaryotik ve ökaryotik hücrelerin sadece DNA'larından değil aynı zamanda organellerinde bulunan rRNA genleri de moleküler tanımlamalarda kullanılmaktadır (Burja vd., 2001: 195). Mikroalglerin kloroplast genomlarına ilişkin *Euglenophytes*, *Rhodophytes*, *Chromophytes*, *Glococystophytes* ve *Chlorophytes* gibi birkaç farklı sınıfa temsil eden üyelerin plastid genomlarının tam dizisi ile yapılan çalışmalar bulunmaktadır (Burja vd., 2001: 195). Bu organizmalar içerisindeki 16S rRNA geninin dizilenmesi ve primerlerinin (CYA vb.) tasarlanmasında kullanılan bölgeler korunmuş bölgelerdir (Burja vd., 2001: 195). Bu bölgelerin özellikle seçilmelerinin nedenlerini güvenilir ve korunaklı bölge olmaları, çoğaltımı ve dizilenmesinin daha kolay olmaları olarak sıralayabiliriz (Filiz ve Koç, 2012: 54).

2.3.2. Mikroalglerin Kullanım Alanları

Mikroalglerin biyoteknolojik çalışmalarında birçok kullanım alanları vardır. Bunlara örnek olarak sürdürülebilir yeşil enerji eldesi, biyoaktif moleküllerin eldesi, tıp, kozmetik, ilaç gibi sektörlerde kullanımı ve canlıların gıda ürünü olarak kullanımı verilebilir (Tekdal ve Ünek, 2019: 68). Mikroalgler, alternatif bir protein kaynağı olmasının yanında omega yağ asitlerini, A, B1, B2, C ve E vitaminlerini içermeleri sebebi ile önemli bir gıda kaynağıdır (Kusmayadi vd., 2021: 4). Mikroalglerden elde edilen pigmentler, antioksidan, vitamin öncülleri, nöroprotektif ve bağışıklık güçlendiriciler gibi pek çok özelliklere sahip doğal pigmentlerdir (Christaki vd., 2015: 236). Yakın geçmişte bakıldığında mikroalglerin ürettiği bazı metabolitler; kan dolaşımının düzenlenmesinde, bağışıklık sisteminin dengelenmesinde ve ateş düşürme tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir (Tanka, 1969: 354; Takagi, 1975: 323). Mikroalgler, süngerler ve mercanlar gibi canlılara karşı savunma için ürettikleri biyoaktif bileşenleri içeren fizyolojik adaptasyon özelliklerine sahiptirler, bu nedenle bakteri, virüs ve mantar gelişimlerini önleyici etki göstermektedirler (Perez vd., 2016: 5). Ayrıca mikroalglerin, hücre içlerinde biriktirdikleri protein, karbonhidrat, yağ asitleri, vitamin ve mineraller gibi pek çok değerli metabolitleri sebebiyle farklı kullanım alanları bulunmaktadır (Özçimen, 2018: 46). Mikroalgler içermiş oldukları doymamış nötral yağlar sayesinde biyoyakıt üretimde kullanılabilir. Bu bağlamda mekanik ve kimyasal ekstraksiyon yöntemleri ile yağ çıkarma işlemi yapılmaktadır (Elcik ve Çakmakçı, 2017: 810).

2.3.3. Mikroalglerde Antimikrobiyal Aktivite Tayini

Patojenik mikroorganizma enfeksiyonları, önemli ölüm oranlarına ve ciddi hastalıklara neden olmaktadır. Günümüzde antibiyotiklere dirençli suşların varlığı, mevcut tedavilerin etkinliğini azaltarak halk sağlığını ciddi şekilde etkilemektedir. Sonuç olarak, mikroorganizma büyümesinin etkili bir şekilde baskılanması için etkili antimikrobiyal materyallerin ve ajanların geliştirilmesine yönelik birçok çalışma yapılmaktadır (Mohammed vd., 2023: 1). Antimikrobiyal ajanlar, gecikme fazının uzamasına veya üstel fazda büyüme oranının düşmesine ve hatta gıda depolama sırasında onları öldürmeye neden olarak mikrobiyal büyümeyi kontrol etmeyi veya azaltmayı amaçlar (Korte vd. 2023: 2). Antimikrobiyal ajanlar, bakterilerin hücre duvarında yer alan ve peptidoglikan sentezinin son basamağında görev yapan transpeptidaz ve karboksipeptidaz enzimlerine bağlanarak hücre duvarı sentezini durdurmaktadırlar (Saran ve Karahan, 2010: 217).

Bir maddenin antimikrobiyal aktivitesini belirlemede en sık kullanılan yöntemler disk difüzyon, agar kuyu difüzyon, dilüsyon, tüp dilüsyon, agar dilüsyon ve minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) yöntemidir (Korkak vd., 2022: 253). Disk difüzyon yönteminin esası, katı besiyerine inokule edilen mikroorganizmaların, besiyeri yüzeyine konan disklerden yayılmakta olan antimikrobiyal madde ile birlikte üreyip ürememelerine dayanır ve antimikrobiyal maddenin etkinliği, disklerin çevresinde oluşan üremenin engellendiği zonların ölçülmesiyle belirlenir (Abbasoğlu, 1996: 114). Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) antimikrobiyal maddenin patojenin gelişmesine engel olan en düşük yoğunluğudur. MİK değeri, antimikrobiyal maddenin statik etkisini gösterir (Koçan, 2007: 30). 96 kuyucuklu mikropalakalar kullanılarak MİK değerleri mikrodilüsyon standart yöntemleri ile gerçekleştirilir (CLSI, 2018: 160). İnkübasyon sonrası mikroorganizmanın büyüme göstermediği en düşük konsantrasyon MİK olarak belirlenir (Çelik vd., 2022: 14).

Mikroalgler, yeni ve ayırt edici biyolojik bileşikler içeren adaptif hayatta kalma stratejileri sayesinde çoğu ortamda hayatta kalabilirler (Caldwell, 2009: 388). Bu aktif moleküller gıda, ilaç, nutrasötik ve kozmetik endüstrilerinin uygulamalarında kullanılmaktadırlar (Mimouni vd., 2012: 2733). Mikroalgler, kısa sürede ve kolay yetiştirilmeleri ile birlikte çevre dostu ve yenilenebilir oldukları için yeni aktif bileşikler için potansiyel değeri yüksek organizmalardır (Lauritano vd., 2016:2). Mikroalgal türevli antimikrobiyal bileşikler; gıda sektöründe, su ürünleri yetiştiriciliğinde, hayvan sağlığı için antibiyotiklerin üretiminde, tarımsal biyopestisitlerin üretiminde, atık su arıtım süreçlerinde ve ilaç endüstrisinde potansiyel uygulama alanına sahiptirler (Stirk ve Staden, 2022: 2). Mikroalg ekstraktlarında in vitro antimikrobiyal aktiviteyi ölçmek için farklı testler

kullanılmaktadır. Bu analizler disk difüzyon, seri seyreltme veya biyootografik testler olarak gruplandırılmıştır. En sık kullanılan yöntemler disk difüzyon testi ve mikrodilüsyon sıvı testidir (Eloff, 1998: 711). Diğer yöntemler arasında agar kuyusu yöntemi, Hodge testi, bir gradyan şerit yöntemi, makrodilüsyon sıvı tahlili ve otobiyografik silika jel plakaları yer alır (Alizade vd., 2016: 20; Benkova vd., 2020: 807).

Toshkova-Yotova vd. (2022) yapmış oldukları bir çalışmada, *Coelastrella sp.*'nin yağ asidi profilini, antitümör ve antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlardır. Gram pozitif ve gram negatif bakteriler ile *Candida albicans* üzerinde disk difüzyon ve mikrodilüsyon testleri sonucunda; gram negatif bakteriler ve fungusla karşı etkili bir antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Toshkova-Yotova vd., 2022: 394). Michelon vd. (2021) *Chlorella spp.*'nin *Staphylococcus hyicus*, *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus suis*'e karşı yapmış oldukları testler sonucunda sırasıyla 0,5 mg/mL, 0,5 mg/mL ve 0,2 mg/mL antibakteriyel aktivitelerini tespit etmişlerdir (Michelon vd., 2021: 1). Thuy vd. (2023) *Aurantiochytrium sp.* mikroalginin gram pozitif (*E. faecalis*, *S. aureus*, *B. cereus*) ve gram negatif (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. enterica*) bakterileri ile *C. albicans* fungusu üzerine yapmış oldukları antimikrobiyal aktivite test sonuçlarında; *E. faecalis*, *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* ve *C. albicans*'a karşı MİK değerinin 32 µg/mL olduğunu, *P. aeruginosa* ve *S. enterica*'ya karşı da 128 µg/mL olduğunu belirtmişlerdir (Thuy vd., 2023: 4). Pabuçcu ve Yücer (2022) *Spirogyra aequinoctialis* mikroalginin 0,5 M Tris-HCL, N-butanol ve etanol çözücülerini ile hazırlamış oldukları ekstraktlarının *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* ve *Candida albicans* mikroorganizmalarına karşı disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitelerini test etmişlerdir. 0,5 M Tris-HCL ile hazırlanan ekstraktın *E. coli* üzerinde oldukça etkili antibakteriyel özellik gösterdiğini, *S. aureus* suşunun en duyarlı mikroorganizma olduğunu ve *P. aeruginosa*'nın en dirençli mikroorganizma olduğunu belirtmişlerdir (Pabuçcu ve Yücer, 2022: 929).

2.3.4. Mikroalglerden Biyoyakıt Üretimi

Günümüzde literatürde biyoyakıt üretiminde ucuz ve çevre dostu kaynak olarak mikrobiyal lipidlerin kullanımına yönelik çalışmalara ilgi artmıştır (Cho ve Park, 2018: 503). Bu amaçla birçok güncel çalışma biyoyakıt üretimi açısından çoğunlukla maya, fungus, mikroalg veya siyanobakterilerin lipidlerine odaklanmıştır (Chen vd., 2018: 336). Özellikle mikroalglerin yüksek oranda lipit içeriği biyoyakıt üretiminde kullanıma olanak sağlayacağı da yine literatürdeki çalışmalarda gösterilmiştir (Teo ve Idris, 2014: 478; Elcik ve Çakmakçı,

2017: 796). Mikroalgler içermiş oldukları doymamış nötral yağlar sayesinde biyoyakıt üretimde kullanılabilir. Bu bağlamda mekanik ve kimyasal ekstraksiyon yöntemleri ile yağ çıkarma işlemi yapılmaktadır (Elcik ve Çakmakçı, 2017: 807). Biyoyakıt üretimi için mikroalglerin kullanımının çeşitli avantajları bulunmaktadır. Bu avantajlar; mikroalglerin hızlı bir büyüme hızına sahip olması nedeniyle daha üretken olması ve üretilen biyokütle birimi başına ekim için daha küçük alanlara ihtiyaç duyması şeklinde listelenebilir (Lauritano vd., 2016:2).

Mikroalglerde kinetik metotlarla biyoenerji hesaplamaları yapılmaktadır;

- Hücre Gelişim Analizleri: Mikroalglerin hücresel gelişimleri optik yoğunluk (OD_{600}), toplam kuru ağırlık (X), spesifik büyüme oranları (μ) ve maksimum üretkenlik (P_{max}) hesaplanarak takip edilmektedir (Ip ve Chen, 2005: 734).

- Optik yoğunluk örneklerin 600 nm'de spektrofotometrik analizleri ile belirlenir (Ip ve Chen, 2005: 734).

- Kuru hücre ağırlığı örneklerin $3421 \times g = 5000$ rpm de 10 dk santrifüjlenmesinin ardından, $80^\circ C$ 'de 1 gece boyunca sterilizatörde kurutulup darasının alınmasının ardından ağırlık tartımı yoluyla analiz edilir (Ip ve Chen, 2005: 734).

- Spesifik büyüme oranı (μ) aşağıdaki eşitliğe göre belirlenir

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t_2 - t_1} \quad (2.1)$$

Bu eşitlikte X_2 (g/L) t_2 zamandaki kuru hücre ağırlığını; X_1 (g/L) t_1 zamandaki kuru hücre ağırlığını ifade etmektedir.

- Maksimum üretkenlik aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanır; buna göre X (g/L) t zamandaki kuru hücre ağırlığını; X_0 t_0 zamandaki kuru hücre ağırlığını ifade etmektedir.

$$P_{max} = \frac{x - x_0}{t - t_0} \quad (2.2)$$

- CO₂ biyofiksasyon analizi: CO₂ biyofiksasyon oranları (F g/g) aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanır (Cheah vd. 2015: 192; Pegallapati ve Nirmalakhandan, 2013: 131; Yadav vd. 2015: 3):

$$F = aP_x V \quad (2.3)$$

a: 1.833 g CO₂,

P_x: üretkenliği,

V: kültür hacmini ifade etmektedir.

- Klorofil analizi: Klorofil analizi Porra vd., (1989: 386) tarafından geliştirilen metoda göre yapılır. Buna göre klorofil a'nın tayini 646.6 nm'de, klorofil b'nin tayini 663.6 nm'de gerçekleştirilir. Klorofil (a+b) klorofil a ve b'nin ayrı ayrı hesaplanmasından sonra toplam klorofil olarak hesaplanır. Klorofil konsantrasyonları mililitre başına µg klorofil miktarı olarak ifade edilir.

Balouch vd. (2023) yapmış oldukları bir çalışmada, *Parachlorellakessleri* ve *Ankistrodesmus falcatus* mikroalglerinin yüksek miktarda biyokütle oluşturdukları (1,42 g/L.gün) ve bu biyoküttelede yüksek miktarda yağ üretimi (29 g/L.gün) gerçekleştiğini, üretilen yağın %90 oranında C₁₆ ve C₁₈ yağ asidi içerdiğini belirtmişlerdir (Balouch vd., 2023, Çevrimiçi Ön Yayın).

Gao vd. (2022) atık su ve deniz suyunu %60 oranında karıştırarak oluşturdukları ortamda ürettikleri *Chlorellasp.*'nin yağ asidi oranının ve biyodizel üretim kapasitesinin, diğer farklı oranlardaki karışımlarda ürettiklerine göre daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Böylece, atıksuların kullanılabilirliği sayesinde biyodizel üretim maliyetinin düşürülmesi için faydalı olacağını tespit etmişlerdir (Gao vd., 2022: 1).

Kumar vd. (2021) bir kömür madeni atıksuyundan izole ederek moleküler tanımlamasını yaptıkları *Scenedesmus sp.*'yi 2 litrelik hacimlerde üretmişlerdir. Daha sonrasında 8000 rpm de 5 dk santrifüj yaptıktan sonra süpernatantı saf su ile yıkayarak ürettikleri biyokütleyi hasatlamışlar ve liyofilize yöntemi ile kurutmuşlardır. 500 mg liyofilize edilen mikroalg biyokütlesi kloroform:metanol (2:1) karışımı ile 8 saat muamele edilmiştir. Transesterifikasyon sonunda GC-FID (gaz kromatografisi) ile yağ asidi metil esterleri analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda %68'den fazla palmitik, oleik ve stearik asit içerdiğini tespit etmişlerdir (Kumar vd., 2021: 4).

Taştan ve Tekinay (2016) farklı oranlarda baca gazı içeren bir ortamda yetiştirdikleri *Scenedesmus sp.*'nin inkübasyonundan sonra 5000 rpm de 10 dk santrifüj yapmışlardır. Santrifüjden sonra elde edilen pellet üzerine H₂SO₄, metanol, NaCl ve heksan içeren ekstraksiyon tamponu ile metil esterifiye işlemi yapılmış ve belirli şartlar altında GC-MS ile yağ asidi metil esterleri analizi yapılmıştır (Taştan ve Tekinay, 2016: 1088).

2.3.4.1. Biyodizel Üretimi

Biyodizel, ham petrolden türetilen dizel yakıtı çok benzer fiziksel ve kimyasal özelliklere (karbon zincir uzunluğu, enerji yoğunluğu, viskozite vb.) sahiptir ve potansiyel

olarak mevcut içten yanmalı motorlarda alternatif yakıt olarak kullanılabilir (Tanvir vd., 2021: 3). İçeriğinde trigliserid olan hayvansal ve bitkisel yağlardan üretilen biyodizel gliserol ve metanolün reaksiyonu sonucu meydana gelmektedir (Harun vd., 2010: 1041). Trigliserit molekülünün alkol ve bazın tepkimesi sonucu yağ esterleri ve gliserin oluşumu gözlenir ve bu dönüşüm reaksiyonuna transesterifikasyon denir (Viegas vd., 2015: 145). Transesterifikasyon reaksiyonunun tamamlanması için, mikroalglerden çıkarılan yağ 60°C'ye ısıtılan manyetik ısıtıcıda 80 saat beklemeye alınır ve sonucunda biyodizel-gliserinden oluşan iki fazlı karışım elde edilir (Stojkovic vd., 2014: 5). Gliserin yüksek yoğunluğa sahip olduğu için alt fazda, biyodizel de üst fazda bulunur, ayırma hunisi ile ayrılan fazlardan damıtma ya da flaş buharlaştırma yoluyla alkol geri kazanılır (Özdemir ve Mutlubaş, 2016: 134). Alkol ve sudan uzaklaştırılan ham gliserin ilaç ve kozmetik endüstrisinde kullanılmaktadır (Sugözü vd., 2010: 51). Biyodizel fazı içinde bulunan çok az miktarda baz ve sabundan saf su ile yıkanarak nötr hale getirilir ve viskoziteli biyodizel elde edilmiş olur (Özdemir ve Mutlubaş, 2016: 134). Ma vd. (2019), *Chlorella vulgaris*'e radyofrekans ile ısıtma işlemine tutarak, %79,5 verimle yağ asidi metil esterleri elde etmişlerdir (Ma vd., 2019: 1).

2.3.4.2. Biyoetanol Üretimi

Biyoetanol renksiz, berrak ve kendine has kokusu olan bir sıvıdır ve glikozun mikroorganizmalar tarafından fermente edilmesi ile üretilir. Biyoetanol üretiminde, hammadde seçimi sürdürülebilir ve ekonomik olarak uygulanabilir bir süreç geliştirmede önemli bir faktördür (Chong ve diğerleri, 2020). Hammadde maliyeti işletme maliyetinin önemli bir bölümünü oluşturur (Nazemi ve diğerleri, 2021). Düşük maliyetli biyoetanol üretimi ticarileştirme ve pazar istikrarı için kritik öneme sahiptir (Gengiah vd., 2023: 2). İkinci ve üçüncü nesil hammaddelerden biyoetanol üretimi atık malzemelerin ve mikroorganizmaların uygun kullanımını sağlayarak, gıda kaynaklarıyla rekabeti azaltır ve fosil yakıtlara daha temiz bir alternatif sunar (Joseph vd., 2023: 2).

Biyoetanol bitkiler ve tahıllarda nişasta veya selüloz olarak bulunan glukozun mayalar tarafından fermente edilmesi ile üretilir (Melikoğlu ve Albostan, 2011: 153). Ayrıca, organik karbon olarak kabul edilen biyokütleler de (mikroorganizmalar vb.) alternatif kaynak olarak kullanılmaktadır (Uçar, 2018: 149). Biyoetanol oluşum süreci üç aşamadan meydana gelmektedir: (1) substratın hidrolizi, (2) fermentasyon ve (3) çıkış suyundaki etanolün saflık derecesini arttırmak için damıtma işlemleri (Ebrahimi vd., 2008: 335).

2.3.4.3. Biyogaz Üretimi

Biyogaz tipik olarak %40-75 metan, %15-60 CO₂ ve ayrıca az miktarda diğer gazlardan (H₂, N₂, H₂S) oluşur (Rossi vd., 2022: 617). Biyogaz biçimindeki yeşil enerji anaerobik çürütme gibi yerleşik teknolojilerle fototrofik mikroorganizmalardan üretilir. Hem bakir biyokütle hem de lipitten ekstrakte edilen biyokütle biyogaz üretimi için kullanılabilir (Tanvir vd., 2021: 5). Anaerobik parçalanma biyokütlenin oksijensiz ortamda mikroorganizmalar tarafından başka bir ürüne ya da yan ürüne dönüştürülmesidir (Speece, 1983: 417). Hidroliz asit oluşumu ve metan oluşumu aşamalarından oluşmaktadır. Hidroliz esnasında karmaşık organik moleküller enzimler ile daha basit moleküllere dönüşür. Hidrolizin asit oluşumu aşamasında moleküller valerik asit, bütirik asit ve asetik asit gibi organik asitlere ve metanole dönüşmektedir, metan oluşum aşamasında ise organik asitler, H₂ ve asetat metan oluşturan bakteriler tarafından biyogaza dönüştürülmektedir (Speece, 1983: 418; Gökçay vd., 2001: 4).

2.3.4.4. Biyohidrojen Üretimi

Enerji ihtiyacının hemen hemen tamamı fosil yakıtlardan sağlanmaktadır. Fosil yakıtların çevreyi kirletmesi ve tükenmesi tüm dünyada önemli bir sorun olmaya başlamıştır (Dursun ve Gülşen, 2019: 67). Fosil yakıtlara alternatif olarak kullanılacak olan hidrojen doğadaki en hafif ve en bol bulunan elementtir (Al ve Bayrakdar Ateş, 2022: 19).

Hidrojen, aşağıdaki özelliklerden dolayı umut verici bir enerji taşıyıcısıdır (Elam vd., 2003: 602):

1. Hidrojen biyokütle, rüzgar ve güneş enerjisi gibi yenilenebilir enerji kaynaklarından üretilir.
2. Hidrojenin kullanımı sırasında karbon bazlı gaz emisyonları oluşmaz.
3. Hidrojenin depolanması ve taşınması mümkündür.
4. Her ülke kendi yenilenebilir hidrojen kaynaklarını üretebilecek, enerji çeşitliliğine ve güvenliğine sahiptir.
5. Hidrojen, etanol (23,4 – 26,8 Mj/kg) ve biyodizel (37,8 Mj/kg) gibi diğer enerji kaynaklarına kıyasla daha yüksek olan 120-142 Mj/kg özgül enerji yoğunluğuna sahiptir.

Hidrojen fosil yakıtlar, güneş, rüzgar, jeotermal enerji ve biyokütle gibi birincil enerji kaynakları ile üretilmektedir (Kahraman vd., 2007: 10).

Hidrojenin fosil yakıtlardan üretimi: Endüstride kullanılan hidrojenin üretiminde doğal gazın katalitik buhar ıslahı, petrolün kısmi oksidasyonu, buhar demir işlemi ve kömür gazlaştırma yöntemleri yer almaktadır (Kahraman vd., 2007: 11).

Hidrojenin güneş enerjisinden üretimi: Güneş enerjisinden elde edilen hidrojen enerjisi düşük sıcaklık (fotovoltaik, fotoelektrokimyasal ve fotobiyolojik) ve yüksek sıcaklık (termoliz, güneş termokimyasal çevrimler, güneş reformasyon ve güneş enerjili gazlaştırma) altında yapılan yöntemleri içermektedir (Özdemir ve Mutlubaş, 2019: 21).

Hidrojenin rüzgar enerjisinden üretimi: Rüzgar türbinlerinden elde edilen elektrik enerjisi elektrolizörleri besleyerek farklı dönüşüm işlemleri ile hidrojen üretilmektedir (Toprak, 2006: 6).

Hidrojenin jeotermal enerjisinden üretimi: Hidrojenin doğrudan jeotermal buhardan elde edilmesi, jeotermal ısı enerjisi kullanılarak hidrojen üretimi ve elektroliz yöntem ile hidrojen üretimi yöntemleri bulunmaktadır (Yılmaz vd., 2011: 263).

Hidrojenin biyokütleden üretimi: Biyolojik hidrojen üretim prosesleri şu şekilde sınıflandırılabilir (Das ve Veziroğlu, 2001: 15):

1. Karanlık fermantasyon ile hidrojen üretimi
2. Fotobiyolojik hidrojen üretimi
 - 2.1. Fotoototrofik hidrojen üretimi
 - 2.2. Fotoheterotrofik hidrojen üretimi
3. İki aşamalı hidrojen üretimi

Yukarıda verilen hidrojen üretim işlemleri çeşitli mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilir. Sorumlu enzimler hidrojenazlar ve/veya nitrojenazlardır (Kars ve Gündüz, 2010). Dolayısıyla, hidrojen üretim verimleri bu enzimlerin verimleri ile sınırlıdır (Kars, 2012: 266).

2.3.5. Mikroalglerin Biyoyakıt Hammaddesi Olarak Kullanım Kapasiteleri

Mikroalgler çoğunlukla triaçilgliserol formunda lipid üretirler ve bu lipitler C16 ve C18 karbon atomları açısından zengindir (Adıyaman, 2021; 11). Mikroalglerin ürettiği oldukları trigliseridler kimyasal açıdan bitkisel yağlara benzediği için enerji dostu ve sürdürülebilir bir biyodizel hammadde kaynağıdır. Ayrıca, mikroalgler lipid dışında güneş ışığına bağlı olarak karbondioksiti karbonhidrata dönüştürebildikleri için biyoetanol üretimi

için iyi bir hammadde kaynağıdır. Anaerobik bozunma yeteğine sahip mikroalglerin lignoselüloz yapılardan yoksun olduğu için biyogaz tesislerinde hammadde olarak kullanılmaktadırlar. Mikroalgler, biyogazın içeriğindeki CO₂ ve H₂S'in yüksek oranlarda oluşması durumunda CO₂'i biyolojik olarak hapsedmeleri ile biyogazın kalitesini arttırmaktadırlar. Ökaryotik mikroalgler; anaerobik şartlarda CO₂ fiksasyonunda elektron verici olarak görev alarak veya aerobik şartlarda fotosentez sürecinde su moleküllerini hidrojen ve oksijene dönüştürerek H₂ gazı üretme proseslerinde kullanılırlar (Eleren ve Öner, 2019; 308).

Mikroalgler tarafından üretilen uzun zincirli yağ asitleri biyoyakıt üretiminde mikrobiyal hammadde olarak kullanılmaktadır (Adıyaman, 2021; 11). Yağ asitleri çift sayıda karbon atomu içeren, alifatik ve monobazik organik asitleridir. En az iki ve en çok yirmi altı karbon atomu içerirler. Yapılarında karboksil grubu bulunan düz bir hidrokarbon zincirleridir. Yağ asitlerini birbirinden ayıran özellikler; hidrokarbon zincirinde bulunan karbon sayısı, karbon atomları arasında çift bağ olup olmaması, bulunan çift bağların yeri ve sayılarıdır (Kılıç, 2018; 488). Tek bir çift bağdan oluşan, hidrojene doymuş, düz zincirli ve genelde katı olan yağlar doymuş yağ asitleridir. Birden çok çift bağ yapanlar, hidrojene doymamış, dallanmış zincirli olanlar ise doymamış yağ asitleridir (Alptekin, 2008; 6).

Metil esterler organik asitler ile alkollerin etkileşmelerinden oluşan bileşik grubunun genel adıdır. Esterler oluşturdukları asit ve alkolden daha uçucu, su ile karışmayan ve yağların parçalanmasını sağlayan maddelerdir. Bitkisel veya hayvansal yağlardan elde edilen uzun zincirli yağ asitlerinin mono-alkil esterleri olarak da tanımlanırlar (Alptekin ve Çanakçı, 2008; 551; Sekora vd., 2009; 163).

Yağ asitleri katı ve sıvı yağların yapı taşlarıdır ve hem hayvansal hemde bitkisel kaynaklardan elde edilebilirler (Neto vd., 2023; 2). Yağ asidi metil esterleri (FAME), yağ asitlerinin metanol ile metilasyonu ile oluşan organik bileşiklerdir (Zang vd., 1996; 209). Metilasyon yağ asidi molekülündeki bir hidrojen atomunun bir metil grubu ile değiştirilmesini içerir. FAME'lerin özellikle biyoyakıtlar (biyodizel vb.) olarak çeşitli uygulamalarda kullanım alanları vardır. Biyodizel, geleneksel petrol bazlı dizel yakıtı yenilenebilir bir alternatiftir ve bitkisel veya hayvansal yağların metanol ile transesterifikasyon reaksiyonuyla üretilir. Bu reaksiyon, trigliseritleri (gliserol ve 3 yağ asidi zincirinden oluşan) ilgili metil esterlerine ve gliserine dönüştürülür (Velasquez-Orta vd., 2013; 83). FAME'ler ayrıca nemlendirici özelliklerinden dolayı kozmetik ve kişisel bakım endüstrilerinde yumuşatıcı ve cilt bakım maddeleri olarak da kullanılmaktadır (Cervantes vd., 2018; 20). Yağ asidi metil esterlerin gaz

kromatografisi (GC) ile tayini lipid karakterizasyonu için önemli bir yöntemdir. Kısa bir ekstraksiyon adımından sonra bir numunenin çeşitli yağ asitlerini hızla ayırır ve miktarını belirler (Ginies vd., 2016; 1). FAME'lerin nicelik ve profil karakterizasyon analizleri; GC-FID (Gaz kromatografisi alev iyonizasyonu) ve GC-MS (Gaz kromatografisi kütle spektroskopisi) tespit sistemleri kullanılarak gerçekleştirilir. MS'in kullanımında iyonize analitten iyon parçalarının spesifik tespiti ile gözlemlenen iyon kütlelerinin bilinen bir kütüphane ile karşılaştırılarak hedef maddelerin kütleli varlığı tespit edilir. FID'in kullanımı kantitatif analizlerde daha güvenilir sonuçlar vermektedir (Niemi vd., 2019; 1). Bu analiz yöntemleri kullanılarak mikralgal biyokütlenin yağ asidi metil ester profili tespit edilerek mikroalgin biyoyakıt hammadde potansiyeli belirlenmiş olur.

3. MATERYAL VE METOT

Bu tez çalışmasında, farklı lokasyonlardan alınan tatlı (dere) ve tuzlu (deniz) su numunelerinden izole edilen ve moleküler tanımlaması yapılan mikroorganizmaların antimikrobiyal aktivite özellikleri ve biyoyakıt hammaddesi olarak kullanım kapasiteleri belirlenmiştir.

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Deneyisel çalışmalarda; numune alımı sırasında şişelerin sterilizasyonu için sodyum hipoklorit (NaClO-Sigma), mikroorganizmaların özütlerini çıkarmak için etanol (C₂H₆O-Sigma), metanol (CH₃OH-Sigma), dietil eter ((C₂H₅)₂O-Sigma) ve diklorometan (CH₂Cl₂-Sigma), antimikrobiyal aktivite testlerinde pozitif kontrol için bakterilerde azitromisin (C₃₈H₇₂N₂O₁₂) funguslarda vorikanazol (C₁₆H₁₄F₃N₅O), yağ ekstraksiyon ve transesterifikasyon işlemleri için kloroform (CHCl₃-Tekkim), hekzan (C₆H₁₄-Merck) ve potasyum hidroksit (KOH-Merck) kullanılmıştır.

3.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

Mikroorganizmaların izole edilmesi ve inkübasyonunda; funguslar için Sabouraud Dextroz Agar - Broth (Condalab) (SDA-SDB) ve Potato Dextrose Agar - Broth (Merck) (PDA-PDB) ve mikroalgler için Blue-Green Algae Medium (agarlı BG11 - sıvı BG11) besiyerleri kullanılmıştır. BG11 besiyeri bileşenleri Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. BG11 Besiyeri Bileşenleri

NaNO ₃	1,5 g/L
Stok Solüsyonlar	g/L
A: K ₂ PHO ₄	0,04
B: MgSO ₄ .7H ₂ O	0,075
C: CaCl ₂ .2H ₂ O	0,03
D: Na ₂ CO ₃	0,02
E: Sitrik Asit	6
Demir Amonyum Sitrat	6
Na ₂ EDTA	1
A5 Solüsyonu (mL/L)	g/L
H ₃ BO ₃	2,86
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,222
Na ₂ MoO ₄ .5H ₂ O	0,390
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,079
Co(NO ₃)2.6H ₂ O	0,049

Kaynak: (Rippka, 1988: 36)

3.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Manyetik Karıştırıcı: Hot and Stirrer, M5300 HS, çözeltilerin homojen şekilde karıştırılması aşamalarında kullanılmıştır.

Hassas Terazi: TW423L model, Shimadzu Corp., kimyasalların ve kurutulmuş mikroorganizmaların tartımında kullanılmıştır.

Mikroskop: B-20 CR, Optica Italy, SN 574022, mikroorganizmaların incelenmesinde kullanılmıştır.

Nüve İnkübatör - Etüv: En120, mikroorganizmaların geliştirilmesinde ve kurutma işlemlerinde kullanılmıştır.

Çalkalayıcı: Orbital, Model SHO-1D, Daihan Scientific, mikroalglerin sıvı besi yerinde üretimi aşamasında kullanılmıştır.

Ultrasonik Su Banyosu: Isolab, Model 621.05.001, SN2022UC01A0009, mikroalglerden özüt hazırlama ve yağ çıkarma işlemlerinde kullanılmıştır.

Santrifüj 1: Fisher Brand, 12V DC, küçük hacimli (en fazla 2 mL) çözeltilerin içerisindeki katı parçaların çökeltilmesinde kullanılmıştır.

Santrifüj 2: Hermle Z306, büyük hacimli (en fazla 20 mL) çözeltilerin içerisindeki katı parçaların çökeltilmesinde kullanılmıştır.

Su Banyolu Çalkalayıcı: Termal, H11960, mikroalglerin sıvı besi yerinde üretimi aşamasında kullanılmıştır.

Otoklav: Hirayama, Hiclave HG-80, hazırlanan besi yerlerinin ve kullanılan malzemelerin sterilizasyon işlemleri için kullanılmıştır.

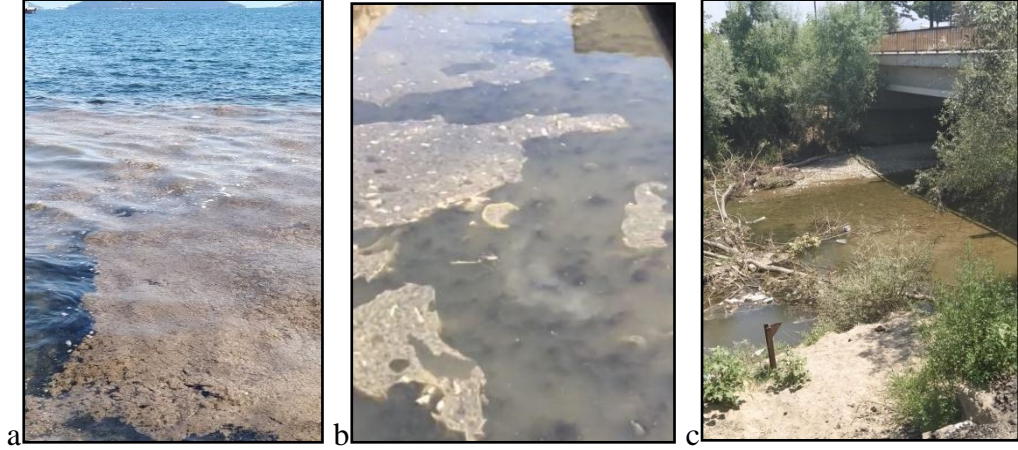
Spektrofotometre: Genesys 150, Thermoscientific UV-Visible Spectrophotometer, optik yoğunluk ölçümlerinde kullanılmıştır.

Jel Görüntüleme Cihazı: Syngene, G-Box, mikroorganizmaların antimikrobiyal aktivite tayinleri deneylerinde kullanılan 96 kuyucuklu platelerin görüntülerini alma aşamasında kullanılmıştır.

GC-FID (Gaz Kromatografisi Alev İyonizasyonu): GC-2010, Shimadzu, mikroorganizmaların FAME analizinde kullanılmıştır.

3.4. Numune Alımı

Seyreltik sodyum hipoklorit uygulaması ile steril edilmiş plastik su şişeleri ile alınan numuneler bekletilmeden aynı gün içinde laboratuvara getirilmiş ve önceden hazırlanmış besiyerlerine ekim yapılmıştır. Numuneler tuzlu su kaynağı olan Marmara Denizi (Çanakkale ve İstanbul) ve tatlı su kaynağı olan Bursa -İnegöl'de bulunan Kalbur Deresi'nden alınmıştır (Şekil 3.1 - Tablo 3.2).



Şekil 3.1. Numune Alınan Bölgelere Ait Görüntüler

a) İstanbul Bostancı Sahili b) Çanakkale Merkez Liman Kıyısı c) Bursa Kalbur Deresi

Tablo 3.2. Numune Alınan Bölgelerin Koordinat Bilgileri

Numune Alınan Bölge	Koordinatları
Çanakkale Merkez	40°09'03"K 26°24'09"D
İstanbul Bostancı	40°57'16.12"K 29°5'14.80"D
Bursa Kalbur Deresi	40°09'83.18"K 29°48'40.46"D

3.5. İzolasyon Çalışmaları

Alınan numuneler bekletilmeden gün içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Önceden hazırlanan sıvı besiyerlerine ekimleri yapılmıştır. Funguslar için SDB ve mikroalgler için BG11 besiyerleri kullanılmıştır. Aseptik koşullar altında yapılan çalışmalar sonucunda üretilen mikroorganizmaların saf kültür eldesi için katı besiyerlerine yayma ekim yöntemi ile

ekilmiş ve izolasyon çalışmalarına başlanmıştır. Funguslar için PDA ve SDA besiyerlerine ve mikroalgler için agarlı BG11 besiyerlerine yapılan ekimler tek koloni eldesi için 2-3 gün ara ile tekrar edilmiştir. Funguslar 33°C'de 48 saat ve mikroalgler 25°C'de 2400 lx ışık altında 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. İzolasyon çalışmalarına ait fotoğraf Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2. İzolasyon Çalışmalarında BG11 Besiyerinde Gelişen Mikroalgelere Ait Görüntü

3.6. Moleküler Tanımlama

İzole edilerek saf kültür haline getirilen mikroorganizmaların moleküler tanımlamaları hizmet alımı ile BM Yazılım Danış. Veri İlet. Lab. Sis. Eğt. San. ve Tic Ltd. Şti (Ankara) tarafından yapılmıştır.

3.6.1. Fungus için DNA izolasyonu, PZR ve sekanslama

Fungus DNA izolasyonu için EurX GeneMATRIX Plant & Fungi DNA izolasyon kiti (Polonya) kullanılmıştır. DNA izolasyonundan sonra elde edilen DNA'ların miktar ve saflığını kontrol etmek için Thermo Scientific Nanodrop 2000 (USA) cihazında spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirilmiştir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) çalışmasında universal primer olarak LROR-LR5 primerleriyle, tür tayini için hedeflenen DQ273817.1 numaralı gen bölgeleri çoğaltılmıştır. Kullanılan primer dizileri aşağıda, PZR koşulları ise Tablo 3.3'de verilmiştir.

LROR: 5' ACCCGCTGAACTTAAGC 3'

LR5: 5' TCCTGAGGGAACTTCG 3'

Tablo 3.3. PZR Koşulları

Bileşen	Stok Konsantrasyonu	Reaksiyon Konsantrasyonu
PCR Tamponu	10X	1X
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM
DNTP karışımı	20 mM	0,2 mM
F. Primer	10 µM	0,3 µM
R. Primer	10 µM	0,3 µM
Taq DNA Polimeraz	5U/ µM	2U
Kalıp DNA	3 µM	
PCR seviyesi su ile 35 µl'ye tamamlanır		
95°C 5 dakika – DNA zincirinin açılması		
35 döngü: — 95°C - 45 saniye - denatürasyon — 57°C - 45 saniye - primerlerin açılan DNA zincirlerine yapışması — 72°C - 60 saniye – ilk primer uzaması		
72°C - 5 dakika – son primer uzaması		
Sıcaklık 4°C'ye düşürülür ve PCR tamamlanır		

PZR (kyratec thermocycler) ile elde edilen amplifikasyon sonuçları 1x TAE tampon ile hazırlanan %1,5 agaroz jelde 100 Volt akımda 90 dakika elektroforezde yürütülmüş ve ethidium bromide boyası kullanılarak UV ışığında görüntüsü alınmıştır. Yaklaşık 1000 bazlık bölgeyi çoğaltmak için tek aşamalı PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. PZR reaksiyonu Solis Biodyne (Estonya) FIREPol® DNA Polymerase Taq polimeraz enzimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PZR sonrasında agaroz jelde tek bant elde edilerek, PZR işleminin başarısı kontrol edilmiştir.

PZR ürünü saflaştırma aşamasında, elde edilen tek bant örnekler için MAGBIO "HighPrep™ PCR Clean-up System" (AC-60005) saflaştırma kiti kullanılarak kitin prosedürlerine doğrultusunda saflaştırılmıştır.

Sanger Dizilemesi için, Macrogen Hollanda laboratuvarında, ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Dizileme Kiti kullanılmıştır (Applied Biosystems, Foster City, CA). LROR ve LR5 primerleriyle elde edilen okumalar, bir konsensus dizi oluşturmak amacıyla kontig haline getirilmiştir. Bu işlemin gerçekleştirilmesi için BioEdit yazılımı içinde CAP contig assembly algoritması kullanılmıştır.

3.6.2. Mikroalgler için DNA izolasyonu, PZR ve sekanslama

Mikroalglerin (2 adet) DNA izolasyonu için EurX GeneMATRIX Plant & Fungi DNA izolasyon kiti (Polonya) kullanılmıştır. DNA izolasyonundan sonra elde edilen DNA'ların miktar ve saflığını kontrol etmek için Thermo Scientific Nanodrop 2000 (USA) cihazında spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirilmiştir.

PZR çalışmasında universal primer olarak EukA ve EukB primerleriyle MG022741.1 numaralı gen bölgeleri çoğaltılmıştır. Bu primerler ile sonuç alınmadığı koşullarda kullanılan kloroplast genomu primerleri olan CYA 359F ve 781R primerleri (Burja vd. 2001: 196) ile MK948102.1 numaralı gen bölgeleri çoğaltılmıştır. Kullanılan primer dizileri ve PZR koşulları aşağıda verilmiştir.

- CYA 359 F 5' GGGGAATYTTCCGCAATGG 3'
- CYA 781 R 5' GACTACWGGGGTATCTAATCCCWTT 3'
- EukA (5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3')
- EukB (5'-GATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3')
- 95°C 5 dakika – DNA zincirinin açılması
- 30 döngü:
 - 95°C- 45 saniye - DNA zincirinin açılması
 - 57°C - 45 saniye - primerlerin açılan DNA zincirlerine yapışması
 - 72°C - 60 saniye – ilk primer uzaması
- 72°C - 5 dakika – son primer uzaması
- Sıcaklık 4°C'ye düşürülüp PCR tamamlanmıştır.

PZR (kyratec thermocycler) ile elde edilen amplifikasyon sonuçları 1x TAE tampon ile hazırlanan %1,5 agaroz jelde 100 volt akımda 90 dakika elektroforezde yürütülmüş ve ethidium bromide boyası kullanılarak UV ışığında görüntüsü alınmıştır.

Yaklaşık 400 ve 1800 bazlık bölgeyi çoğaltmak için tek aşamalı PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. PZR reaksiyonu Solis Biodyne (Estonya) FIREPol® DNA Polymerase Taq polimeraz enzimiyle gerçekleştirilmiştir. Örnekler için PCR sonrasında agaroz jelde tek bant elde edilerek, PZR işleminin başarılı olduğu gözlemlenmiştir.

3.4). Steril serum hortumları, hava taşları ve hava motoru kullanılarak üretim ortamları oluşturulmuştur (Şekil 3.5). İnkübasyon sonunda mikroalgler 5000 rpm de 5 dakika süre santrifüj yapılarak süpernatantlar toplanmış ve 60°C'de 24 saat etüvde kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan mikroalgler bir öğütücü yardımı ile toz haline getirilmiş ve 4°C'de saklanmıştır (Kim ve Kim, 2022: 146).



Şekil 3.4. Mikroalglerin Erlenlerde Üretimi Aşamasına Ait Görüntü



Şekil 3.5. Mikroalglerin Büyük Ölçekli Üretimine Ait Görüntü

3.9. Optik Yoğunluk Ölçümü ve Kuru Ağırlık Metodu ile Mikroalg Büyüme Oranının Belirlenmesi

Alglerin büyüme oranını belirlemek için; 2'şer tekrarlı olarak 9 adet 50 mL'lik erlenlere 20 mL BG11 içine ekimler yapılmıştır. 0-1-5-10-15-20-25-30-35. günlerde çalkalama sonrası steril mikropipetler ile 2 mL alınmıştır. Spektrofotometre kuvvetlerine alınan örneklerin 600 nm dalga boyunda ölçümleri yapılmıştır. OD ölçümü yapılan numunelerin aynı zamanda kuru ağırlıklarını belirlemek, antimikrobiyal aktivite ve biyoyakıt hammaddesi olarak kullanılabilirliklerini belirlemek için yapılacak olan deneylerde kullanılmak üzere;

5000 rpm'de 5 dk santrifüj ile katı-sıvı faz ayrımı yapılarak, 60°C' de 24 saat etüvde kurutma işlemi yapılmıştır (Kim ve Kim, 2022: 146).

3.10. Mikroorganizmaların Özütlerinin Antimikrobiyal Aktivite Tayini

Çalışmada izole edilerek tanımlanan *Chlorella vulgaris*, *Tetradismus obliquus* ve *Rhizopus stolonifer*'in antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için öncelikle farklı çözücüler kullanılarak özütleri hazırlanmıştır. Disk difüzyon ve minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) yöntemleriyle gram pozitif ve gram negatif bakteriler ile mayalara karşın bu özütlerin antimikrobiyal aktiviteleri test edilmiştir. Kullanılan mikroorganizmalar ve özellikleri Tablo 3.4.'te verilmiştir.

Tablo 3.4. Antimikrobiyal Aktivite Deneylerinde Kullanılan Mikroorganizmalar

Mikroorganizma	Özelliği
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Gram +
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Gram +
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Gram +
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 2942	Gram +
<i>Escherichia coli</i> ATCC 05922	Gram -
<i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 13883	Gram -
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 8100	Gram -
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	Maya
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	Maya
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	Maya
<i>Candida glabrata</i> ATCC 9	Maya

3.10.1. Özütlerin Hazırlanması

Tanımlaması yapılan fungus ve mikroalg biyokütleleri uygun besiyerlerinde geliştirildikten sonra hasat edilmiş ve 3 kez distile su ile yıkanarak 24 saat 60°C'de kurutulmuştur (Kim ve Kim, 2022: 146). Kuruyan örnekler bir öğütücü yardımı ile toz haline getirilmiştir. Biyokütlelerden özütlerin elde edilmesinde Gümüş vd. (2019) tarafından geliştirilen yöntem kullanılmıştır. Her bir örnekten 5 gr tartılarak kurutma kağıdından yapılan kartuşların içine boşaltılarak ağızları kapatılmıştır. Daha sonra kartuşlar beherlerin içine alınarak 100 mL etanol ilave edilmiş ve 25°C'de 1 saat ultrasonik su banyosunda bekletildikten sonra 150 rpm çalkalayıcıda 3 saat bekletilmiştir (Şekil 3.6). Bekleme süresi sonunda süzme işlemi yapıldıktan sonra etanolün uçması için 37°C de etüve bırakılmıştır (Şekil 3.7). Etanol uçtuğundan sonra kalan özütler toplanarak tartım yapılmıştır (Tablo7.5.).

Aynı işlemler metanol, dietil eter ve diklorometan ile tekrar edilmiş ve sonuçta toplanan özütler +4°C'de muhafaza edilmiştir (Gümüş vd., 2019: 393).



Şekil 3.6. Ultrasonik Su Banyosunda Özüt Hazırlanması Aşamasına Ait Görüntü



Şekil 3.7. Özüt Eldesi İçin Süzme İşlemine Ait Görüntü

3.10.2. Disk Difüzyon Yöntemi

Elde edilen özütlerin antimikrobiyal aktivitelerinin test edilmesi amacıyla öncelikle CLSI M02-A12, 2015'de tanımlanan disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Kullanılan bu yöntemde 6 mm çapındaki boş steril disklere 20 µL mikroalg ve fungus özütü emdirilerek etüvde 30°C'de 30 dk kurutulmuştur. Test bakterileri için Muller Hinton Agar - Broth ve mayaları için Sabouraud Dextroz Agar - Broth besiyerleri kullanılmıştır. Çalışmalarda kullanılan bakteri suşları Mc Farland 0.5 (1.5×10^8), maya suşları ise Mc Farland 2 (6×10^8)'ye göre ayarlanmıştır. 121°C'de 15 dk otoklavlanan besiyerleri petrilere dökülerek katılaşması sağlanmış ve mikroorganizmalar aşılansak 10 dk bekletilmiştir. Aynı besiyerlerine daha önceden hazırlanan ve farklı dilüsyonlarda (1, 1/2, 1/4 ve 1/8 (özüt/distile su)) mikroalg ve fungus özütü içeren diskler yerleştirilmiştir. Negatif kontrol olarak etanol, metanol, dietil eter ve diklorometan emdirilmiş diskler, pozitif kontrol olarak da ticari

antibiyotikler (bakteriler için Azitromisin ve mayalar için Vorikanazol) kullanılmıştır. Daha sonra bakteriler 37°C' de 24 saat ve mayalar ise 30°C' de 48 saat boyunca etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda disklerin etrafında inhibisyon zonları oluşup oluşmadığı gözlenmiş ve disklerin çevresinde oluşan inhibisyon zonları milimetrik cetvel kullanılarak ölçülmüştür (Prakash vd., 2011: 171). Denemeler aseptik şartlar altında ve 3 paralelli olarak yürütülmüş olup, testler doğrulukları saptanması amacıyla iki tekrarlı yapılmıştır.

3.10.3. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

Mikroalg ve fungus özütlerinin antimikrobiyal aktiviteleri minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) ölçümü ile değerlendirilmiştir. MİK değerleri, National Committee of Clinical Laboratory Standarts (NCCLS) tarafından geliştirilen prosedürlere göre mikrodilüsyon deneyi ile disk difüzyon denemelerinde özütlere duyarlı bulunan Gram negatif ve Gram pozitif bakteri suşlarına ve mayalara karşı gerçekleştirilmiştir (NCCLS 2003). Bakteri suşları Mueller-Hinton broth (MHB) besiyerine inokule edilerek ve 24 saat 37°C' de inkübe edilmiştir. Bakteri suşlarının inokulumları 24 saatlik broth kültürden hazırlanmış ve süspansiyonlar 0.5 McFarland standart turbiditeye göre ayarlanmıştır. Mayalar ise Sabroud Dekstroz broth (SDB) besiyerinde 30°C' de 48 saat boyunca etüvde inkübe edilmiş ve süspansiyonlar Mc Farland 2 (6×10^8)'ye göre ayarlanmıştır.

Değişik konsantrasyonlarda (625-4.88 µg/mL) özüt içeren bir seri test tübü hazırlanmıştır. Steril 96'lık mikroplaterin kuyucukları, MHB (bakteri)/SDB (Maya), inokulum (1.5×10^8 CFU/ml bakteri / 6×10^8 CFU/ml maya) ve özüt eklenerek hazırlanmıştır. Son kuyucuk standart antibiyotikleri içermekte olup bakteriler için Azitromisin ve mayalar için Vorikanazol pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Platerin üzeri steril kapaklarıyla örtülerek, platerler bakteriler için 37°C' de 24 saat ve mayalar için 30°C' de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

3.11. Mikroorganizmaların Biyoyakıt Olarak Kullanılabilirliği

Mikroalglerin biyoyakıt hammaddesi olarak kullanılabilme potansiyellerini belirlemek amacı ile hücre gelişim analizleri ve klorofil analizleri belirlendi. Daha sonrasında yeni izolat fungus ile mikroalglerin yağ asidi metil esterleri (FAME) analizleri yapılmıştır.

3.11.1. Hücre Gelişim Analizleri ve Toplam Lipit Konsantrasyonu

Mikroalglerin hücresel gelişimleri optik yoğunluk (OD_{600}), toplam kuru ağırlık (X), spesifik büyüme oranları (μ) ve maksimum üretkenlik (P_{max}) hesaplanarak takip edilmiştir.

Optik yoğunluk örneklerin 600 nm’de spektrofotometrik analizleri ile belirlenmiştir (Taştan ve Tekinay, 2016: 1089). Kuru hücre ağırlığı örneklerin $3421 \times g = 5000$ rpm de 10 dk santrifüjlenmesinin ardından, 80°C ‘de 1 gece boyunca etüvde kurutulup darasının alınmasının ardından ağırlık tartımı yoluyla analiz edilmiştir (Taştan ve Tekinay, 2016: 1089). Spesifik büyüme oranı (μ) aşağıdaki eşitliğe göre belirlenmiştir (Ip ve Chen, 2005: 734);

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t_2 - t_1} \quad (3.1)$$

Bu eşitlikte X_2 (g/L) t_2 zamandaki kuru hücre ağırlığını; X_1 (g/L) t_1 zamandaki kuru hücre ağırlığını ifade etmektedir.

Maksimum üretkenlik aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı; burada X (g/L) t zamandaki kuru hücre ağırlığını; X_0 t_0 zamandaki kuru hücre ağırlığını ifade etmektedir.

$$P_{max} = \frac{x - x_0}{t - t_0} \quad (3.2)$$

Toplam lipid konsantrasyonu Bligh ve Dyer' in (1959) uyguladığı % kuru biyokütle oranına (Eşitlik 3.3) göre hesaplanmıştır (Bligh ve Dyer, 1959). 200 mg kurutulmuş toz mikroalgal biyokütlenin üzerine 120 mL kloroform:metanol (2:1) karışımı eklenerek 30 dk ultrasonik su banyosunda bekletildikten sonra, 140 rpm'de 30 dk boyunca orbital çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Üzerine 20 mL %73'lük NaCl çözeltisi eklenerek whatman kağıdı kullanılarak süzülmüştür. Elde edilen süzüntü faz ayırımı için 3000 rpm'de 10 dk. santrifüjlenerek fazlar pipet ile ayrılmıştır. Alt kloroform fazı 105°C'de 2 saat tutulan ve darası alınan bir beherde toplanarak ve 60°C'de 24 saat çözücülerin buharlaşması için etüvde bekletilmiştir (Prommuak vd., 2012; Folch vd., 1957). Her aşamada gerekli tartımlar yapılarak, çözücülerin uzaklaştırılmasından sonra elde edilen yağ miktarı gravimetrik olarak hesaplanmıştır (Bligh ve Dyer, 1959);

$$\text{Toplam Lipid \%} = \frac{((\text{beher darası} + \text{toplam yağ}) - (\text{beher darası}))}{(\text{örnek miktarı})} \times 100 \quad (3.3)$$

3.11.2. Klorofil Analizleri

Mikroalgler yüksek konsantrasyonda klorofil üretirler (Safafar vd., 2016: 11). Klorofil-a tüm fotosentetik alglerde (bakterikloropil içeren siyanobakteriler hariç) bol miktarda bulunur ve klorofil-a dışındaki pigmentlere aksesuar pigmentler denir (Ramaraj vd. 2013: 548). Benzer şekilde, klorofil-b yüksek bitkilerde ve yeşil alglerde az miktarda bulunur. Günlük klorofil ağırlıklı olarak klorofil-a ve b türevlerinden oluşur (Ferruzzi ve Blakeslee 2007: 6).

Mikroalglerin klorofil a ve b analizleri % 80 aseton içeren solüsyon tamponunda aşağıdaki eşitliklere göre yapılmıştır (Porra vd., 1989:);

$$Chl a = 12,25A^{663,6} - 2,55A^{646,6} \quad (3.4)$$

$$Chl b = 20,31A^{646,6} - 4,91A^{663,6} \quad (3.5)$$

Steril şartlarda BG11 besiyerine inoküle edilen mikroalgler gelişirken 7., 15. ve 20. günlerde 2,5 mL örnek alınarak santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellete 5 mL % 80 aseton eklenerek vorteks yapılmıştır. Örnekler santrifüjlendikten sonra, süpernatant kısımları spektrofotometrede ölçülerek ekstinksiyon katsayılarına göre hesaplamalar yapılmıştır (Eşitlik 3.4. ve 3.5). Klorofil a için 646,6 nm ve klorofil b için 663,6 nm absorbans değerlerinde ölçümleri yapılmıştır (Porra vd., 1989: 389). Deneyler üç tekrarlı yapılmış ve değerlerin ortalamaları alınarak sonuçlar hesaplanmıştır.

3.11.3. Yağ Asidi Metil Ester (FAME) Analizleri

Toz halinde getirilen mikroalgler ve fungustan 200 mg alınarak cam beherlere koyulmuştur. Üzerine 120 mL kloroform : metanol (2:1) karışımı eklenerek 30 dk ultrasonik su banyosunda bekletildikten sonra, 140 rpm'de 30 dk boyunca orbital çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Üzerine 20 mL % 73'lük NaCl çözeltisi eklenerek whatman kağıdı ile süzölmüştür. Elde edilen süzöntü faz ayırımı için 3000 rpm'de 10 dk. santrifüjlenerek fazlar pipet ile ayrılmıştır. Alt kloroform fazı 105°C'de 2 saat tutulan ve darası alınan bir beherde toplanarak 60°C'de 1-2 saat arası çözücülerin buharlaşması için etüvde bekletilmiştir (Prommuak vd., 2012: 159; Folch vd., 1957: 499). Çözücülerin uzaklaşmasından sonra elde edilen yağın transesterifikasyonu için üzerine 10 mL hekzan eklenerek karıştırılmıştır. Üzerine 0,5 mL 2 N metanollü potasyum hidroksit (KOH) çözeltisi eklenmiştir. Üst faz berraklaşana kadar karanlıkta 2 saat bekletildikten sonra GC-FID ile FAME analizinde kullanılmıştır (Karatay, 2010: 47).

Transesterifikasyon işleminden sonra FAME analizinde Shimadzu marka GC-2010 gaz kromatografisi kullanılmıştır. GC analiz şartları; TRB-WAX 30m*0,53mm*1µm kolonunda, fırın sıcaklığı 50°C'de 1 dk bekleme süresi, 25°C/dk sıcaklık artışı ile 200°C'ye çıkıldı, 3°C/dk sıcaklık artışı ile 230°C'de 30 dk bekletme şeklindedir. Taşıyıcı gaz olarak 3 ml/dk kolon hızında Helyum kullanılmıştır. Alev iyonlaşma dedektörü (FID) sıcaklığı 280°C, 1:10 bölme oranı ve enjeksiyon sıcaklığı 250°C olarak analiz gerçekleştirilmiştir (Nakata vd., 2020: 1139).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

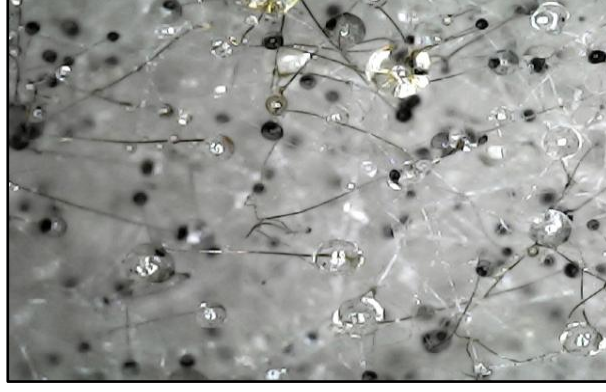
4.1. İzolasyon ve Moleküler Tanımlama

Tez çalışmasında tatlı (dere) ve tuzlu (deniz) su numunelerinden izole edilen bir adet fungus ve iki adet mikroalgin moleküler tanımlaması yapılarak, antimikrobiyal aktivite tayinleri yapılmış ve bu mikroorganizmalara ait biyokütlelerin biyoyakıt hammaddesi olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır.

İstanbul Bostancı Sahili'nde ki müsilaj oluşumundan alınan su numunesinden izole edilen fungusun, LROR ve LR5 primerleri ile moleküler tanımlaması sonucunda *Rhizopus stolonifer* olduğu tespit edilmiştir. *Rhizopus stolonifer*'in moleküler tanımlaması sonucu elde edilen ITS DQ273817.1 genomu sekansı Şekil 4.1.'de, mikroskop görüntüsü Şekil 4.2.'de, PDA'da gelişim gösteren morfolojisinin petri görüntüsü Şekil 4.3.'te ve moleküler tanımlaması sonucu elde edilen ITS DQ273817.1 genomuna ait jel görüntüsü Şekil 4.4'de verilmiştir. *Rhizopus stolonifer*, beyaz ekmekek küfü olarak da bilinmektedir. Zygomycota'nın bir üyesidir ve *Rhizopus* cinsinin en önemli türüdür (Benny vd., 2016: 113). *Rhizopus spp.* türleri taze meyve, sebze, ekmekek, çiçek, soğan, yumru ve fidelerde yumuşak çürümeye neden olmaktadır (Yıldırım vd., 2010: 94).

```
AAAAGAAAATAACAATGATTTCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGAGGAAAGAGCTCAAAGTTGGAACCTGTT  
TGGCCTAGCTAAACAGGATTGTAACCTGTAGAAGTGTTTTCCAGGCAATCCGAGTTAATAAGTCCITTTGGAACAG  
GGCATCATAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTTGATTCGAGATATTTTGTCTTTTGCGATACACTTCAAAGAGTCAGGT  
TGTTTGGGAATGCAGCCTAAATTTGGGTGGTAAATCTCACCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAAACCGATAGCGA  
ACAAGTACCGTGAGGAAAGATGAAAAGAACCTTGAAGAGAGTTAAACAGTATGTGAAATTGTTAAAAGGG  
AACCGTTTGGAGCCAGACTGGCTTGTCTGTAATCAATCTAGGTTTCGTGCCTGGATGCACTTGCAGACTAATTC  
CTGCCAACGACAATTTTTTGTAGTGTAAAACTATTGGAAATGTGGCCAATATTTATTATTGGTGTATAGTCCITTAG  
AAAATACCTTGAATTGGATTGAGGAACGCAGCGAATGCTTCTCTTTGAGGCAAAGTCTTTATTGGGATTACGG  
ATCAGACTGTGGCATTGTCACAAGACTTGAAGTTAAACCTATTTTGAACTTTTATTCGCTTAGGTTGTTGGCTAATG  
ACTCTAAATGACCCGCTTGAACACGGACCAAGGAGTCCACCATTAGTGCAGTATTGGGTGCCAAACCC  
ATATGCGCAAGGAACTGAATGATATGAATCCATTTAGGAGGCAATATCGTCCGGCGTTGACGTTTTATACTGAA  
GTGACCGAGATAAAGCACTAATGATGGGACCCGAAAGATGGTGAACCTATGCCTGAATAGGGTGAAGCCAG  
AGGAACTCTGGTGGAGGCTGTAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCAAATTTGGGTATAGGGGCGAA  
AGACTAATCGAACCATCTAGTAGCTGG
```

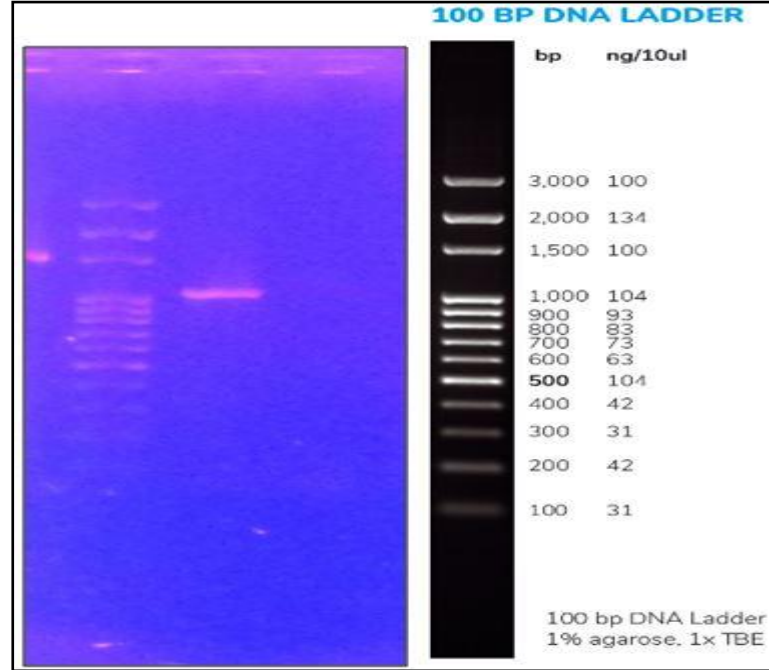
Şekil 4.1. *Rhizopus stolonifer*'in Moleküler Tanımlaması Sonucu Elde Edilen ITS DQ273817.1 Genomu Sekansı



Şekil 4.2. *Rhizopus stolonifer*'in Mikroskop Görüntüsü (Optica B-20CR, 100x10)



Şekil 4.3. *Rhizopus stolonifer*'in PDA'da Gelişim Gösteren Morfolojisinin Petri Görüntüsü

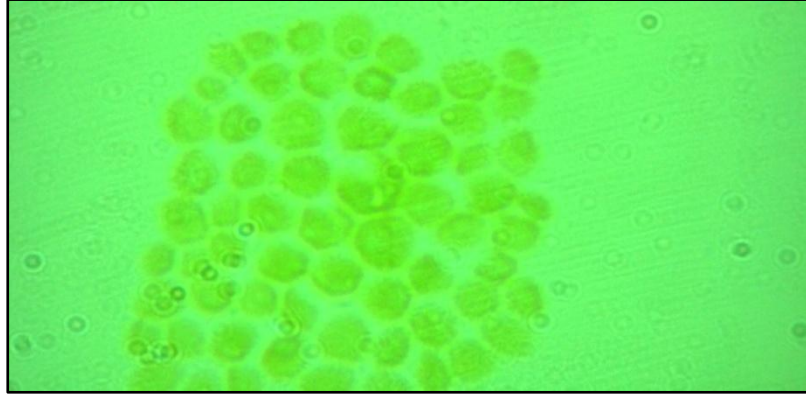


Şekil 4.4. *Rhizopus stolonifer*'in Moleküler Tanımlaması Sonucu Elde Edilen ITS DQ273817.1 Genomuna Ait Jel Görüntüsü

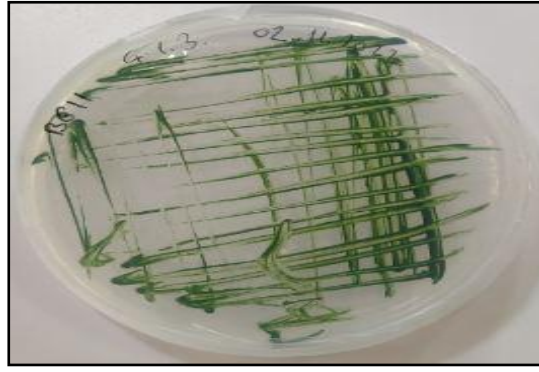
Çanakkale Merkez Limanı kıyısındaki müsülaj oluşumundan alınan su numunesinden izole edilen mikroalgin, CYA 359 F ve 781 R primerleri ile MK948102.1 kloroplast genomunda moleküler tanımlaması sonucu *Chlorella vulgaris* olduğu tespit edilmiştir. PZR çalışmasında ilk önce 18S tür tanımlamada mikroalgler için universal primer olarak EukA ve EukB primerleri kullanılmıştır fakat sonuç alınamadığı için kloroplast genomu primerleri olan CYA 359F ve 781R primerleri kullanılarak 16S moleküler tanımlaması yapılmıştır (Abed vd., 2002: 379). CYA 359 F ve 781 R primerleri spesifik olarak siyanobakteri organizmasının 16S rRNA gen bölgesinin bir parçasını amplifiye etmektedir (Garcia-Pichel vd., 2001). Bu spesifik primerler kullanılarak çalışmamızda izole ettiğimiz *Chlorella vulgaris* mikroalginin kloroplastından küçük alt ünite ribozomal RNA'nın yaklaşık 400 baz çiftlik kısa bir fragmentini çoğaltmıştır. Elde edilen bu fragment MEGA 11 programında düzenlenmiş ve BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analizine tabi tutulduğunda Türkiye'den elde edilen MN114114 erişim numaralı *C. vulgaris* suşuyla yüksek bir oranda (%99) nükleotit homolojisi göstermiştir. *Chlorella vulgaris*'in moleküler tanımlaması sonucu elde edilen 16S rRNA MK948102.1 kloroplast genomu sekansı Şekil 4.5'te, mikroskop görüntüsü Şekil 4.6'da, agarlı BG11 besiyerinde gelişim gösteren morfolojisinin petri görüntüsü Şekil 4.7'de ve moleküler tanımlaması sonucu elde edilen 16S rRNA MK948102.1 kloroplast genomuna ait jel görüntüsü Şekil 4.8'de verilmiştir.

```
TAAACTTCTTTTCTCAGAGAAGAAGCATTGACGGTATCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCTGTGCCAGCA  
GCCGCGGTAAGACAGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCTGTAGGTGGCTTAAAA  
AGTCTCCTGTCAAAGATCAGGGCTTAACCCTGGGCCGGCAGGAGAACTCTTAGGCTAGAGTTTGGTAGGGG  
CAGAGGGAATTCCCGGTGGAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACACCAAAGGCCAAAGCACTCTGC  
TGGGCCATAACTGACACTGAGAGACGAAAGCGAGGGGAGCAAAGGGATTAGATAACCCCTGTAGTCCTGTCT  
CTTATACACAT
```

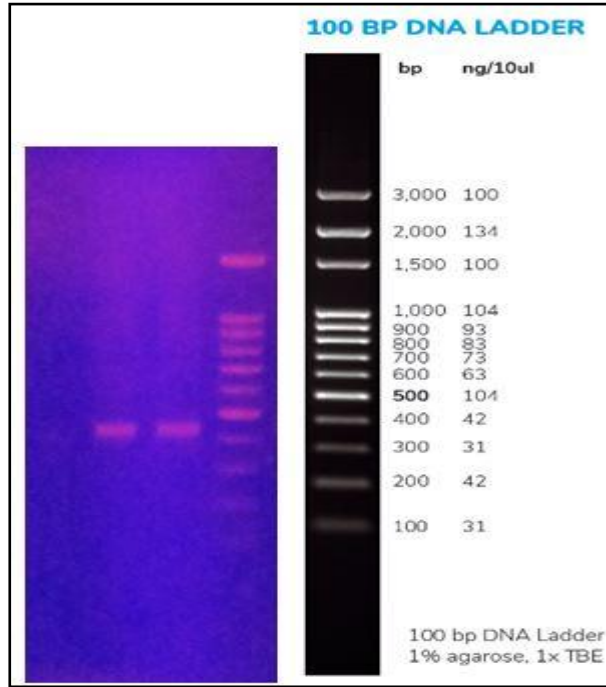
Şekil 4.5. *Chlorella vulgaris*'in Moleküler Tanımlaması Sonucu Elde Edilen 16S rRNA MK948102.1 Kloroplast Genomu Sekansı



Şekil 4.6. *Chlorella vulgaris*'in Mikroskop Görüntüsü (Optica B-20CR, 100x10)

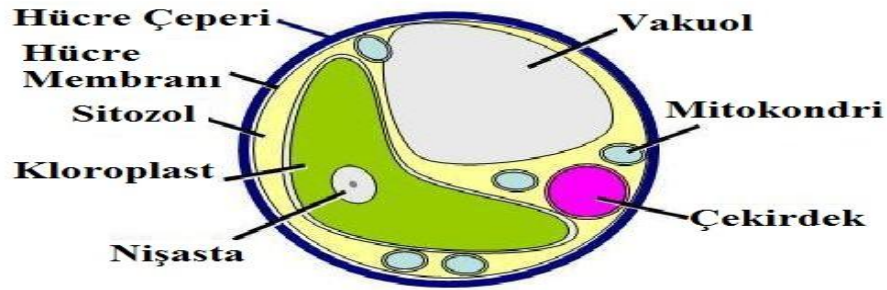


Şekil 4.7. *Chlorella vulgaris*'in Agarlı BG11 Besiyerinde Gelişim Gösteren Morfolojisinin Petri Görüntüsü



Şekil 4.8. *Chlorella vulgaris*'in Moleküler Tanımlaması Sonucu Elde Edilen 16S rRNA MK948102.1 Kloroplast Genomuna Ait Jel Görüntüsü

Chlorella vulgaris, 2–10 µm çapında küresel yapıli mikroskobik hücredir (Yamamoto vd., 2004: 259) ve bitkilere benzer birçok yapısal ögeye (Hücre zarı, kloroplast ve mitokondri) sahiptir (Şekil 4.9.). *Chlorophyta* bölümü üyesi olan bu cins ökaryotik tek hücreli bir mikroalgdir. *Chlorella*, 2,5 milyar yıllık yaşayan bitkilerin içinde gerçek çekirdeğe ve en yüksek üreme hızına sahiptir (Yamamoto vd., 2005: 767). Yapısında klorofil a ve klorofil b bulunan bu mikroalg fotosentez yapmaktadır. Klorofile ek olarak; vitaminler, mineraller, diyet lifleri, nükleik asitler, amino asitler, temel yağ asitleri ve enzimler içermektedir. Hücre büyüme evresinde, sporangiyumda yeni oluşan hücre duvarı kırılğan hale gelir ve yaklaşık 2 nm inceliğinde bir tabaka oluşturmaktadır (Yamamoto vd., 2004: 259; Nemcova ve Kalina, 2000: 96). Yavru hücrenin hücre duvarının kalınlığı, olgunlaşmadan sonra 17-21 nm'ye ulaşana kadar kademeli olarak artmaktadır (Nemcova ve Kalina, 2000: 97). Olgun evrede hücre çeperi kalınlığı ve bileşimi farklı büyüme ve çevre koşullarına göre değişebildiği için sabit değildir (Yamamoto vd., 2004: 259; Nemcova ve Kalina, 2000: 96).



Şekil 4.9. *Chlorella vulgaris*'in Hücre Bileşenlerinin Şematik Gösterimi

Kaynak: (Safi vd., 2014: 267)

Chlorella'nın dünya çapında yıllık üretimi 2009 yılından itibaren 2000 tona (kuru ağırlık) ulaşmıştır ve başlıca üretici ülkeler Japonya, Almanya ve Tayvan'dır (Brennan ve Owende, 2010: 571). Bu mikroalg, hızlı bir büyüme oranına sahiptir ve değişik koşullardaki ortamlara uyum sağlamaktadır. *C. vulgaris*, zorlu koşullara ve istilacılara karşı oldukça dirençli olduğu için üretim için idealdir (Converti vd., 2009: 1148; Lv vd., 2010: 6798). Bir yandan azot ve fosfor sınırlaması, yüksek CO₂ konsantrasyonu, aşırı ışığa maruz kalma (Widjaja vd., 2009: 13), fazla demir, sıcaklık artışı gibi elverişsiz büyüme koşulları sırasında lipid ve nişasta içerikleri artarken biyokütle üretkenliği durur veya azalır (Liu vd., 2008: 4718). Öte yandan, optimal veya yönetilen büyüme koşulları sırasında (azot takviyesi gibi) protein içeriği artar (Richmond vd., 1993: 327).

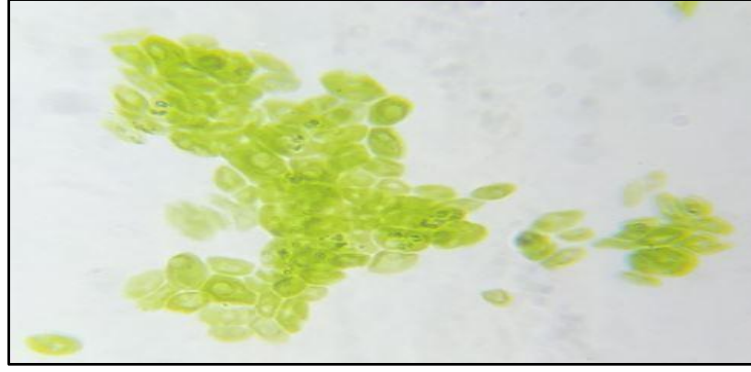
Mikroalgler, özellikle lipit içeriği fazla olan *Chlorella* yüksek fotosentetik verimlilik, yüksek biyokütle üretimi ve hızlı büyüme avantajları nedeniyle biyoyakıt üretimi için çok iyi adaylar olarak önerilmektedir (Dote vd., 1994: 1855; Minowa vd., 1995: 1735). *Chlorella* üretebilmek için, geleneksel yağlı tohum mahsullerine nazaran daha az su kullanılmaktadır. *Chlorella* sp. gibi mikroalgler, atık (sıfır enerji) karbon formunu (CO₂) alıp onu yüksek yoğunluklu sıvı enerji formuna (doğal yağ) dönüştürebilen çok verimli biyokütlelerdir (Miao ve Wu, 2006: 841).

Chlorella suşlarının yaygın olarak kullanıldığı diğer bir alan da atık su arıtmıdır. Bu suşlar, farklı atık su türlerinde uygun büyüme ve yüksek verimde atık giderimi göstermektedir. Daha önceki araştırmalarda, deniz ürünleri atık sularında (Nguyen vd., 2019: 493), belediye atık sularında (Mujtaba ve Lee, 2017: 175) ve merkezi atık sularda (Ge vd., 2018: 311) kullanımı bulunmaktadır. Bu atık sularda yetişen mikroalglerin, toplam fosfor giderim oranları ve KOİ giderim oranları oldukça yüksektir (Ji vd., 2013: 2701; Wen vd., 2017: 250; Zhang vd., 2019: 2).

Bursa İnegöl'de bulunan Kalbur Dere'sinden alınan su numunesinden izole edilen mikroalgin, EukA ve EukB primerleri ile MG022741.1 gen numaralı moleküler tanımlaması sonucu *Tetradasmus obliquus* olduğu tespit edilmiştir. National Center for Biotechnology Information (NCBI) da yer alan 18s rRNA genin tamamı baz alınarak, örneğe ait dizi ile BLAST analizi yapılmıştır. *Tetradasmus obliquus*'un moleküler tanımlaması sonucu elde edilen 18S rRNA MG022741.1 genomu sekansı Şekil 4.10'da, mikroskop görüntüsü Şekil 4.11'da, agarlı BG11 besiyerinde gelişim gösteren morfolojisinin petri görüntüsü Şekil 4.12'de ve moleküler tanımlaması sonucu elde edilen 18S rRNA MG022741.1 genomuna ait jel görüntüsü Şekil 4.13'de verilmiştir.

```
TGTCTAAGTATAAACTGCTTATACTGTGAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGGTGG
TACCTTACTACTCGGATAACCGTAGTAATTC TAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGAC
GTATATATTAGATAAAAAGGCCGACCGAGCTTTGCTCGACCCGCGGTGAATCATGATATCTTCACGAAGCGCA
TGGCCTTGTGCCGGCGCTGTTCCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACC
ATGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCC
GAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGATACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACCGG
GCATTTTATGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCT
GGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGT
TGGATTTCCGGGTGGGTTCTAGCGGTCGCCCTATGGTGAGTACTGCTATGGCCTTCCTTTCTGTCCGGGACGG
GCTTCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGGAGTCGACGTGGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTCAAAGCAG
GCTTACGCCAGAATACTTTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGCCTATCTTGTGGTCTGTAGGACCG
GAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCCGGGGCATTCGTATTTCAATTGTCAGAGGTGAAATTTCTGGATTTATGA
AAGACGAACACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAG
ACGATTAGATACCGTCGTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATTGGCGAATGTTTTTTTAAATGAC
TTCGCCAGCACCTTTTGAGAAATCAAAGTTTTGGGTTCCGGGGGAGTATGGTTGCAAGGCTGAAAAATTAA
AGGAATTGACGGAAGGGCACCACC
```

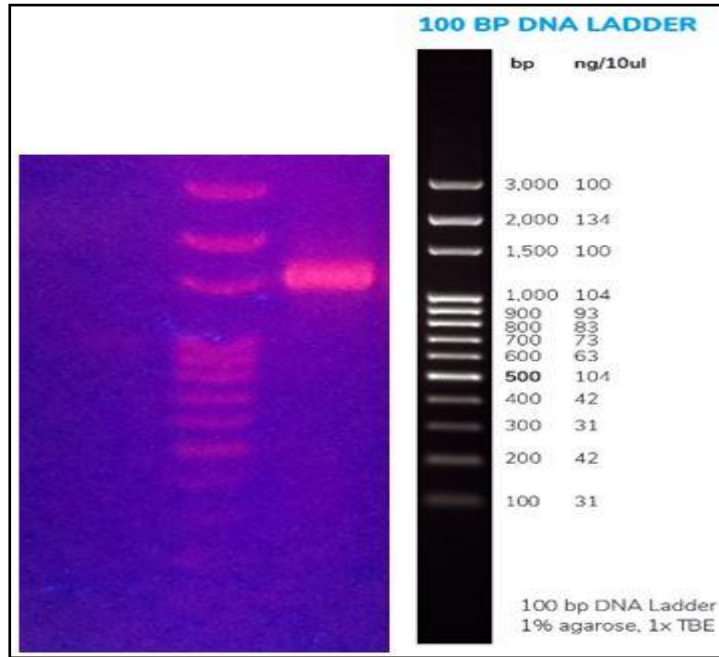
Şekil 4.10. *Tetradasmus obliquus*'un Moleküler Tanımlaması Sonucu Elde Edilen 18S rRNA MG022741.1 Genomu Sekansı



Şekil 4.11. *Tetradesmus obliquus*'un Mikroskop Görüntüsü (Optica B-20CR, 100x10)

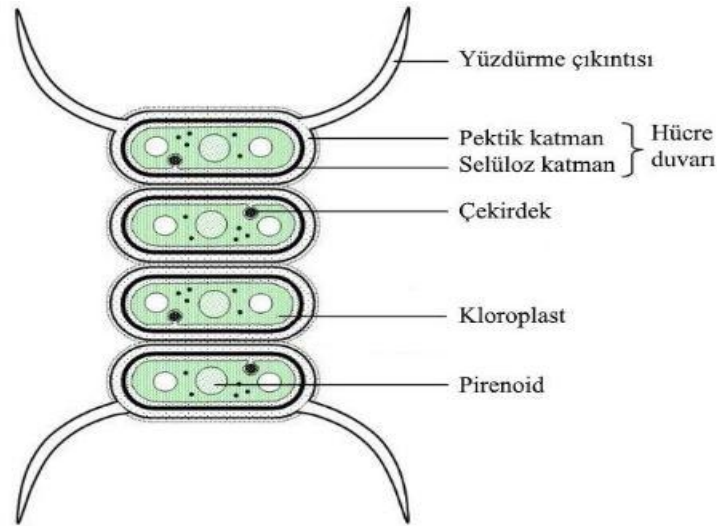


Şekil 4.12. *Tetradesmus obliquus*'un Agarlı BG11 Besiyerinde Gelişim Gösteren Morfolojisinin Petri Görüntüsü



Şekil 4.13. *Tetradesmus obliquus*'un Moleküler Tanımlaması Sonucu Elde Edilen 18S rRNA MG022741.1 Genomuna Ait Jel Görüntüsü

Tetradismus obliquus, dünya çapında *Scenedesmus obliquus* olarak da bilinir. Göl ve nehirler gibi tatlı su mikroalgi olan *T. obliquus* *Chlorophyceae*'nin bir üyesidir ve dört kromozomlu bir yapıya sahiptir (Krienitz ve Bock, 2012: 295). *T.obliquus*'un hücre duvarı polimerize olmuş kompleks karbonhidratlardan ve glikoproteinlerden oluşmaktadır (Voigt vd., 2014: 40; Lisha vd., 2022: 2). Her hücre, hücrenin tüm iç yüzeyini dolduran tek bir kloroplast içermekte, pirenoidler de hücrelerin merkezine yakın bir yerde bulunmaktadır (Cepak vd., 2007: 263; Wei vd., 2010: 159). Hücre duvarının yırtılması yoluyla otosporları serbest bırakarak eşeysiz olarak çoğalmaktadır. Bununla birlikte, çift kamçılı genç gametlerle eşeyli üremenin nadir vakaları bulunmaktadır (Oliveira vd., 2021: 1595). *T.obliquus*, azot bileşiklerinin tükenmesi, krom ve termal stresler, toprak yığınları gibi stres koşulları altında eğik formlar oluşturmaktadır (Cain ve Trainor, 1976: 384; Corradiet vd., 1995: 109). Daha kolay fark edilebilen başka bir savunma stratejisi de *T. obliquus* hücrelerinin koloniler oluşturmasıdır (Verschooret vd., 2004: 809). *T. obliquus* kültürünün kolonial yapısı Şekil 4.14'de verilmiştir.



Şekil 4.14. *Tetradismus obliquus* Kültürünün Kolonial Yapısı

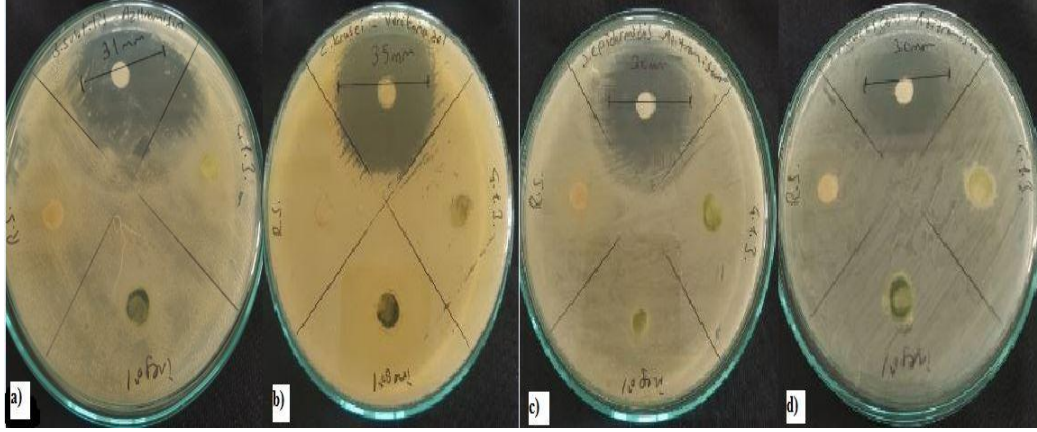
Kaynak: (Öztürk, 2019: 4)

T. obliquus, kuru ağırlığının %40'ına kadar triaçilgliserol (TAG) biriktirebildiği için endüstriyel uygulamalar için umut verici bir aday olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca, *T. obliquus*, azot bileşiklerinin sınırlaması altında nispeten uzun bir süre boyunca yüksek fotosentetik etkinliği koruyabilmekte, bu da ışıkta yüksek lipit verimi gerçekleştirmektedir, dolayısıyla süreçler yüksek hacimsel ve alansal üretkenliklerle sonuçlanmaktadır (Breuer vd., 2012: 222).

T. obliquus; gıda, ilaç ve kozmetik endüstrilerinde uygulanma potansiyeline sahiptir (Gilbert-López vd., 2017: 111; Guedes vd., 2013:478). Ayrıca, Afify vd. (2018:401), *S. obliquus* protein hidrolizatlarının Coxsackie B3 virüsüne karşı antioksidan ve potansiyel antiviral aktivitelerini doğrularken, Marrez vd. (2019: 10), özüt ve özüt fraksiyonlarının umut verici bir antimikrobiyal ve antikanser bileşik kaynağı olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte in vivo bir çalışma, *T. obliquus*'un diyabet ve dislipidemilerin önlenmesinde ve tedavisinde kullanılabileceğini göstermiştir (da Silva vd., 2020: 9). Ayrıca, bu mikroalg biyoetanol, biyodizel, biyogaz ve biyohidrojen üretiminde (Ferreira vd., 2019: 1170; Mandal ve Mallick, 2009: 282; Miranda vd., 2012: 342) ve tarımsal ürünlerin çimlenmesi ve büyümesi için bir biyostimülan olarak önemli bir uygulamaya sahiptir. (Ferreira vd., 2021: 2; Navarro-López vd., 2020: 2; Viegas vd., 2021a: 13). *T. obliquus* hızlı büyümesi ve kolay ekimi göz önüne alındığında, sürdürülebilir üretim süreçlerinde kullanılabilecek umut verici bir hammadde kaynağını temsil etmektedir (Viegas vd. 2021b:2).

4.2. Antimikrobiyal Aktivite Analizleri

Chlorella vulgaris, *Tetrademus obliquus* ve *Rhizopus stolonifer*'in öncelikle etanol ve metanol çözücüleri, sonrasında dietil eter ve diklorometan çözücüleri kullanılarak elde edilen özütlerin antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* ATCC 2942, *Escherichia coli* ATCC 05922, *Klebsiella pneumonia* ATCC 13883, *Serratia marcescens* ATCC 8100 bakterileri ve *Candida albicans* ATCC 24433, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 ve *Candida glabrata* ATCC 9 mayaları üzerinde disk difüzyon testi yapılmıştır. Pozitif kontrol de bakteriler için kullanılan Azitromisin antibiyotiği diskinin oluşturmuş olduğu zon çapları 25 mm ile 35 mm arasında ölçülmüştür. Mayalar için kullanılan Vorikanazol antibiyotik diskinin oluşturmuş olduğu zon çapları da 26 mm ve 32 mm arasında ölçülmüştür. Etanol ve metanol çözücüleri ile elde edilen tüm özütler ile emdirilmiş disklerin hiçbirinin çevresinde zon oluşumu gözlenmemiştir. 3 paralelli ve 2 tekrarlı yapılan denemelerin hiçbirinde zon oluşumu görülmemiştir. Literatürde de etanol ve metanol kullanarak çıkarılan özütlerin, n-butanol, diklorometan ve dietil eter gibi çözücüleri kullanarak çıkarılan özütlere göre ya daha az ya da hiç antimikrobiyal aktivite göstermediği belirtilmiştir (Demiriz vd., 2011: 1385; Bartolomeu vd., 2022: 34; Perveen vd., 2022: 2501). Etanol ve metanol özütleri ile yapılan disk difüzyon yöntemi sonuçlarına ait petri görüntüleri Şekil 4.15'de verilmiştir.



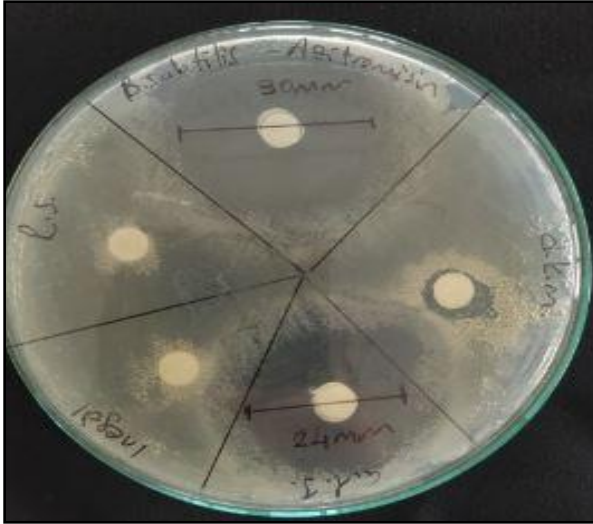
Şekil 4.15. Disk Difüzyon Çalışmaları (*Chlorella vulgaris*, *Tetradesmus obliquus* ve *Rhizopus stolonifer*'in Etanol-Metanol Özütleri)

(a) *B. subtilis*; b) *C. krusei*; c) *S. epidermidis*; d) *S. marcescens*)

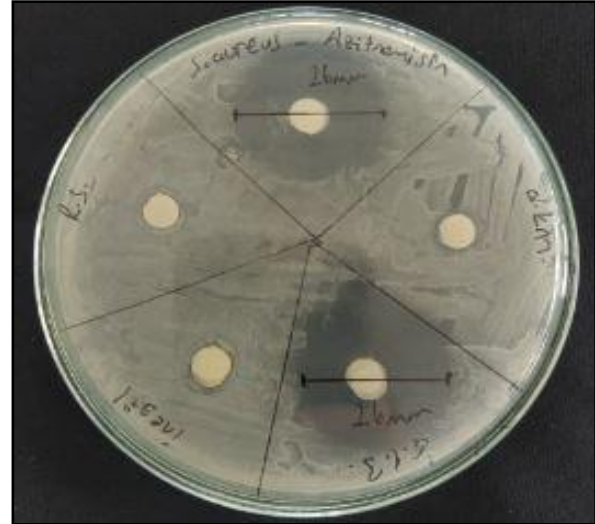
Etanol ve metanol ile çıkarılan özütlerin disk difüzyon sonuçlarının negatif çıkmasından dolayı, dietileter ve diklorametan ile tekrar özütler çıkarılarak denemeler tekrarlanmıştır. Kullanılan numune miktarları ve elde edilen özüt miktarları Tablo 4.1'de verilmiştir. *Tetradesmus obliquus* ve *Rhizopus stolonifer* özütlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin olmadığı gözlenirken, *Chlorella vulgaris*'in diklorametan özütünün *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis*'e karşı, dietil eter özütünün ise *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis*'e karşı güçlü bir aktivite gösterdiği tespit edildi. Diklorametan ile çıkarılan özütün *S. aureus*, *B. subtilis* ve *E. coli*'ye karşı oluşturduğu zon çapları sırasıyla; 26 mm, 24 mm ve 22 mm olarak ölçülmüştür. Dietil eter ile çıkarılan özütün *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı oluşturduğu zon çapları sırasıyla; 25 mm ve 27 mm'dir (Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.20).

Tablo 4.1. Numune ve Özüt Miktarları

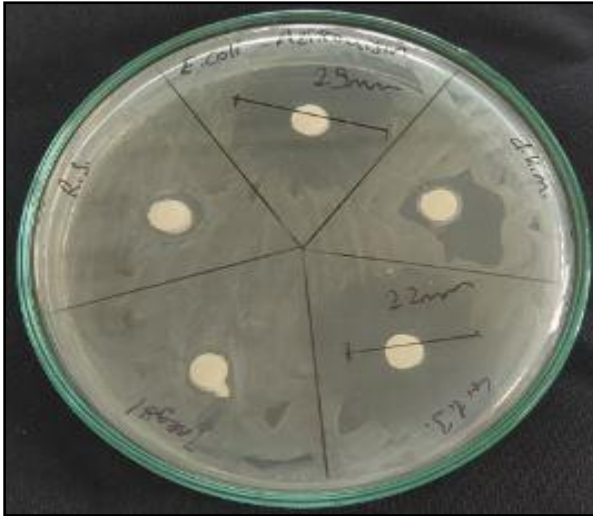
Numune	Numune miktarı	Özüt miktarı
<i>Chlorella vulgaris</i>	5 gr	1,3 gr
<i>Tetradesmus obliquus</i>	5 gr	0,6 gr
<i>Rhizopus stolonifer</i>	5 gr	0,2 gr



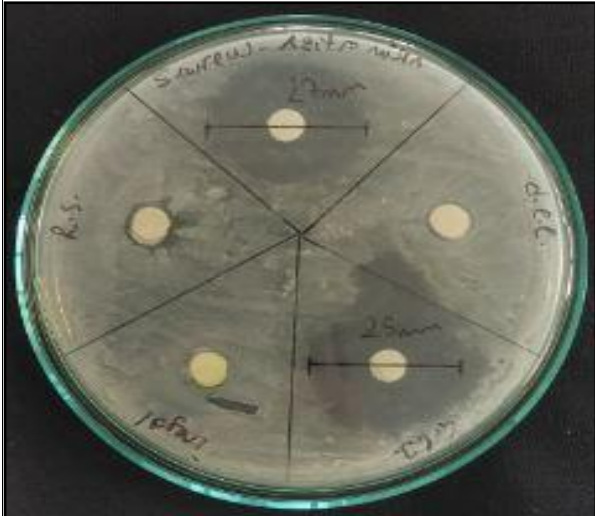
Şekil 4.16. *B. subtilis*- *C. vulgaris* Diklorometan Özüü Disk Difüzyon Sonucu



Şekil 4.17. *S. aureus*- *C. vulgaris* Diklorometan Özüü Disk Difüzyon Sonucu



Şekil 4.18. *E. coli*- *C. vulgaris* Diklorometan Özüü Disk Difüzyon Sonucu

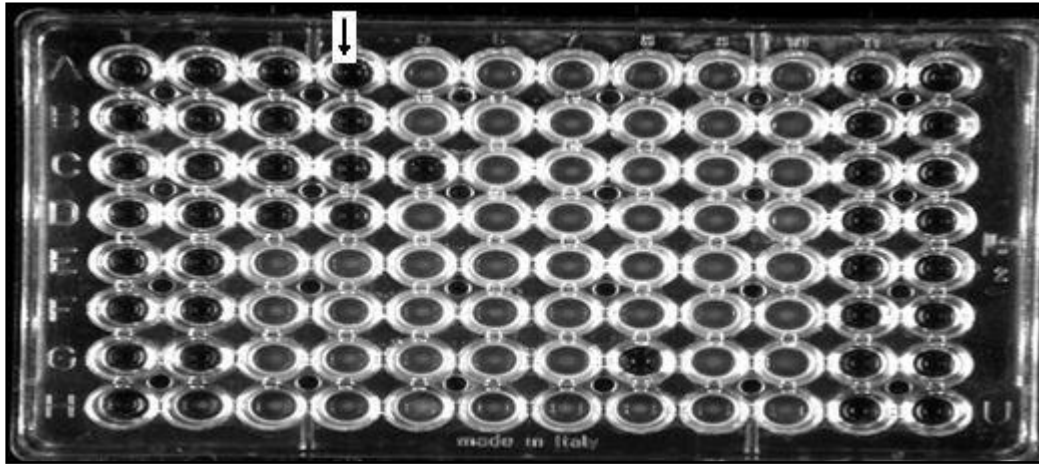


Şekil 4.19. *S. aureus*- *C. vulgaris* Dietil eter Özüü Disk Difüzyon Sonucu

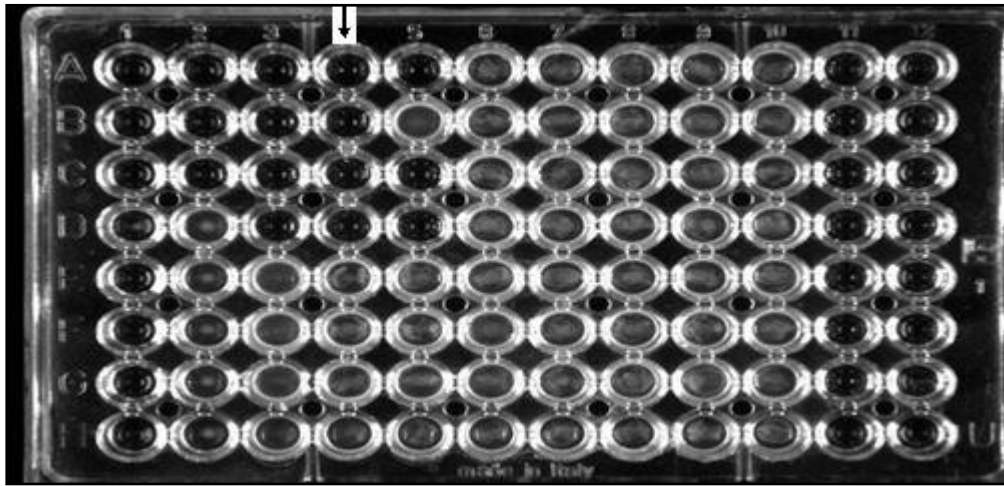


Şekil 4.20. *E. coli*- *C. vulgaris* Dietil eter Özüü Disk Difüzyon Sonucu

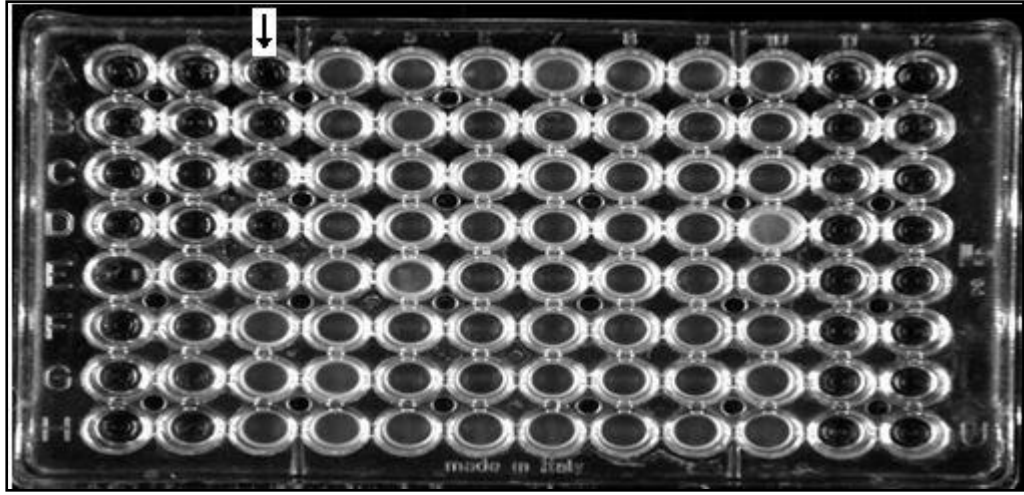
Disk difüzyon sonucunda antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenen özütlerin minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değeri araştırıldı. Özütlerden değişik konsantrasyonlarda (625-4.88 µg/mL) bir seri test tübü hazırlandı. Steril 96'lık mikrolatelerin kuyucukları, MHB (bakteri)/SDB (Maya), inokulum (1.5×10^8 CFU/ml bakteri / 6×10^8 CFU/ml maya) ve özüt eklenerek hazırlandı. Son kuyucuk pozitif kontrol olarak kullanıldı. Mikrolateler Elisa Reader ve Jel Görüntüleme cihazları ile görüntülendi. *Tetrademus obliquus* ve *Rhizopus stolonifer* için pozitif kontrol (ticari antibiyotikler) kuyucukları dışındaki bütün kuyucuklarda üreme olduğu gözlemlendi. *Tetrademus obliquus* ve *Rhizopus stolonifer* özütünün antimikrobiyal aktivitesinin olmadığı tespit edildi. *Chlorella vulgaris*'in *E. coli*, *S. aureus* ve *B. subtilis* üzerine yapılan MİK deney sonuçlarına ait mikrolate görüntüleri Şekil 4.21, 4.22 ve 4.23'de verildi.



Şekil 4.21. *Chlorella vulgaris* Türünden Elde Edilen Özütün *E. coli* Üzerine MİK Analizi Mikrolate Görüntüsü



Şekil 4.22. *Chlorella vulgaris* Türünden Elde Edilen Özütün *S. aureus* Üzerine MİK Analizi Mikrolate Görüntüsü



Şekil 4.23. *Chlorella vulgaris* Türünden Elde Edilen Özütün *B. subtilis* Üzerine MİK Analizi Mikroplate Görüntüsü

Chlorella vulgaris'in hem dietil eter (dee) hem de diklorametan (dkm) özütlerinin *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis*'e karşı MİK sonuçları Tablo 4.2.'de verildi.

Tablo 4.2. *Chlorella vulgaris* Türünden Elde Edilen Özütlerin MİK Değerleri

<i>S. aureus</i> (dkm) (µg/mL)	<i>S. aureus</i> (dee) (µg/mL)	<i>E. coli</i> (dkm) (µg/mL)	<i>E. coli</i> (dee) (µg/mL)	<i>B. subtilis</i> (dkm) (µg/mL)	<i>B. subtilis</i> (dee) (µg/mL)
78,125	625	78,125	312,5	156,25	625

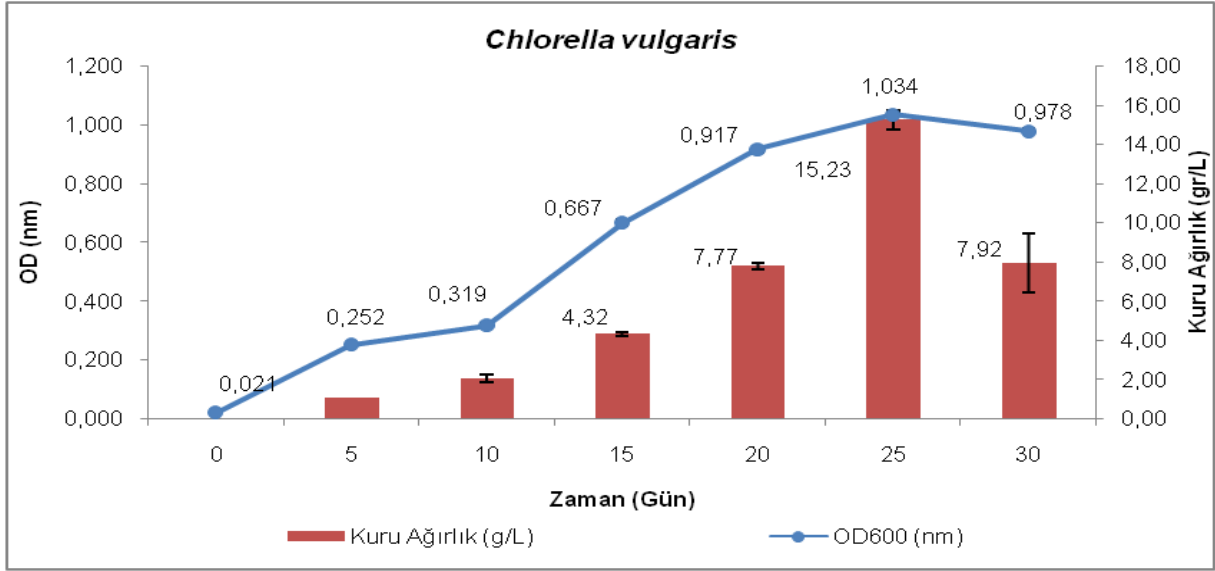
4.3. Mikroalglerin Biyoyakıt Hammaddesi Olarak Kullanım Potansiyelinin Belirlenmesi

Mikroalglerin hücresel gelişim, optik yoğunluk, kuru ağırlık, klorofil, toplam lipid konsantrasyonu ve FAME analizleri yapılmıştır.

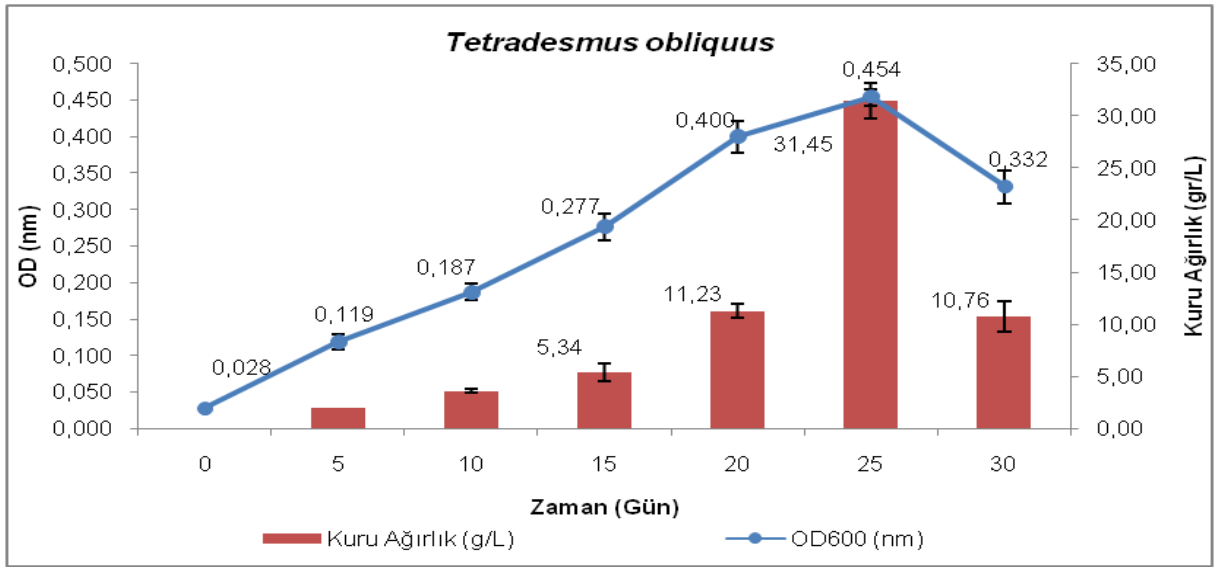
4.3.1. Hücresel Gelişim Analizi

Mikroalglerin optik yoğunluk ölçümleri ve kuru ağırlık tartımları 5'er gün ara ile toplamda 30 gün sonunda belirlendi. Hem *Chlorella vulgaris*'in hem de *Tetradismus obliquus*'un değerlerinde 25. günden sonra azalma görüldü. Erlenlerde yapılan deneyler sonucunda zamana karşı büyüme oranının belirlenmesi ile büyük ölçekte üretim için gerekli

veri sağlamıştır. Mikroalglerin OD ölçüm ve kuru ağırlık ortalama değerleri Grafik 4.1 ve 4.2'de verilmiştir



Grafik 4.1. *Chlorella vulgaris*'in OD ve Kuru Ağırlık Değerleri



Grafik 4.2. *Tetradesmus obliquus*'un OD ve Kuru Ağırlık Değerleri

Mikroalglerin spesifik büyümüş oranları (μ) ve maksimum üretkenlikleri (P_{max}) eşitlik 3.1 ve 3.2'de verilen formüllere göre hesaplandı (Ip ve Chen, 2005: 734). *Chlorella vulgaris* ve *Tetradesmus obliquus*'un büyüme oranları sırası ile $0,13 \text{ gün}^{-1}$ ve $0,14 \text{ gün}^{-1}$, maksimum üretkenlikleri $0,61 \text{ gr/L.gün}$ ve $1,25 \text{ gr/L.gün}$ olarak belirlendi.

4.3.2. Toplam Lipid Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Mikroalgler bitkilere nazaran daha hızlı fotosentez hızına ve daha hızlı büyüme oranına sahiptirler ve buna bağlı olarak da daha yüksek miktarda lipid biriktirmektedirler

(Kar, 2019: 20). Mikroalgelerde biriken lipidler genel olarak doymuş yağ asitleri ve tekli doymamış yağ asitleridir. Bu nedenle mikroalgler, özellikle biyodizel gibi biyoyakıtların üretilmelerinde alternatif bir kaynak olarak gösterilmektedir (Sun vd., 2018: 552).

Chlorella vulgaris ve *Tetradismus obliquus*'un toplam lipid konsantrasyonu değerleri gravimetrik hesaplama ile belirlenmiştir ve sırasıyla; kuru ağırlıklarının % 22,4 ve % 19,6'sının yağ olduğu tespit edilmiştir.

4.3.3. Klorofil Tayini

Fotosentezde aktif rol oynayan klorofil a ve b pigmentlerinin ışık absorpsiyonları fotosentez için en etkin ışık dalga boyunu göstermektedir (Aktar ve Cebe, 2010: 244). Mikroalglerin ürettiği klorofiller mikroalgin büyüme hızını etkilemesinin yanısıra gıda endüstrisinde doğal renklendirici olarak ve antioksidan madde olarak kullanılmaktadır (Gökpınar vd., 2006: 86).

Mikroalglerin klorofil a ve b değerleri 7., 15. ve 20. günlerde alınan örneklerin (klorofil a için 646,6 nm ve klorofil b için 663,6 nm absorbans değerlerinde) ölçümleri sonucu Tablo 4.3'te ve Tablo 4.4'de verilmiştir.

Tablo 4.3. *Chlorella vulgaris*'in Klorofil a ve b Değerleri

<i>Chlorella vulgaris</i> (Gün)	Klorofil a (mg/mL)	Klorofil b (mg/mL)
7	0,17±0,02	0,29±0,01
15	0,85±0,01	0,57±0,02
20	1,14±0,01	0,79±0,02

Tablo 4.4. *Tetradismus obliquus*'un Klorofil a ve b Değerleri

<i>Tetradismus obliquus</i> (Gün)	Klorofil a (mg/mL)	Klorofil b (mg/mL)
7	3,98±0,01	1,61±0,03
15	1,10±0,10	1,12±0,03
20	0,64±0,05	0,55±0,02

4.3.4. Mikroalglerin Serbest Yağ Asitlerinin Kimyasal Analizi

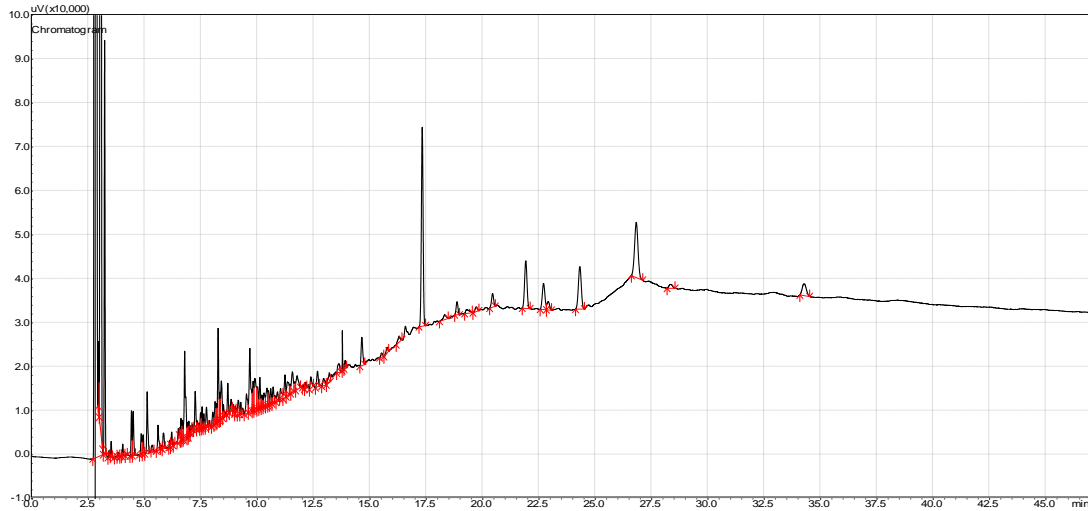
Rhizopus stolonifer, *Chlorella vulgaris* ve *Tetradismus obliquus*'un yağ asidi metil esterlerinin (FAME) analizi GC-FID ile yapıldı. Referans bileşiklerden oluşan standart (37-Component FAME Mix) ile karşılaştırılarak değerlendirilen sonuçlarda, *Chlorella vulgaris*

mikroalginde 62515,62 µg/mL Bütirik asit (C4), 338,62 µg/mL Kaproik asit (C6), 93,26 µg/mL Miristik asit (C14), 10,03 µg/mL Pentadekanoik asit (C15), 45,54 µg/mL Palmitik asit (C16), 16,42 µg/mL Linolelaidik asit (C18:2) ve 55,89 µg/mL Araşidonik asit (C20:4) başta olmak üzere yağ asitleri içerdiği tespit edildi (Tablo 4.5.). Grafik 4.3'de *C. vulgaris*'e ait kromatogram verilmiştir.

Tablo 4.5. *Chlorella vulgaris*'in Yağ Asitleri İçeriği

Yağ Asidi	Konsantrasyon (µg/mL)	Tutma Süresi (dk)	Pik Alanı	Yağ Asidi Grubu
C4-Bütirik asit	62515,62	2,798	69939186	DYA
C6-Kaproik asit	338,62	3,415	3731	DYA
C14-Miristik asit	93,26	5,728	1563	DYA
C14:1-Miristoleik asit	1,25	6,303	1174	TDYA
C15-Pentadekanoik asit	10,03	7,864	3354	DYA
C16-Palmitik asit	45,54	9,663	74608	DYA
C16:1-Palmitoleik asit	1,741	11,027	8031	TDYA
C17-Heptadekanoik asit	0,6	12,025	1783	DYA
C18-Stearik asit	2,78	13,771	8612	DYA
C18:1-Elaidik asit	4,39	15,522	4726	TYA
C18:2-Linoleik asit	1,85	16,293	9857	ÇDYA
C18:2-Linolelaidik asit	16,42	17,316	246132	TYA
C18:3-g-Linolenik asit	4,023	18,314	10448	ÇDYA
C18:3-a-Linolenik asit	3,51	19,287	9606	ÇDYA
C20:1-cis-11-Eikosenoik asit	7,99	21,912	83422	TDYA
C22:3-cis-8,11,14-Eikositrienoik asit	9,024	24,312	87711	ÇDYA
C20:4-Araşidonik asit	55,89	26,816	264602	ÇDYA
C20:5-cis,5,8,11,14,17-Eicosapentanoik asit	1,007	28,353	9697	ÇDYA

DYA: Doymuş yağ asidi; TDYA: Tekli doymamış yağ asidi; TYA: Trans yağ asidi; ÇDYA: Çoklu doymamış yağ asidi.



Grafik 4.3. *Chlorella vulgaris* Yağ Asidinin Kromatogramı

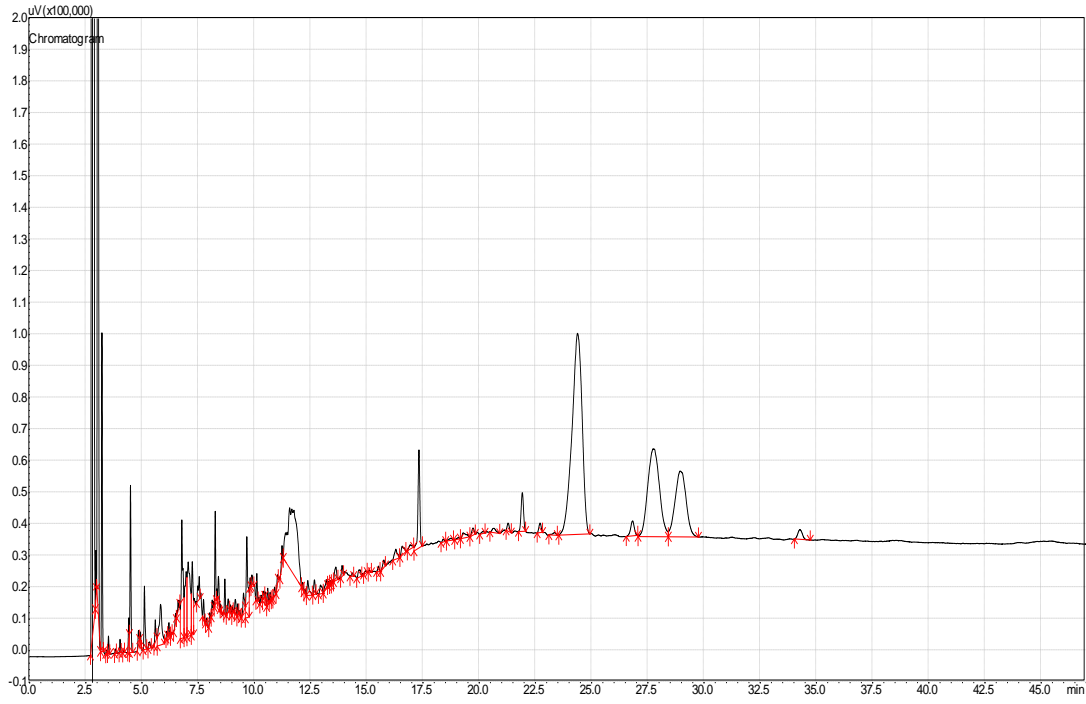
Tetrademus obliquus mikroalginde 54063,79 µg/mL Bütirik asit (C4), 466,09 µg/mL Kaproik asit (C6), 505,28 µg/mL Triundekanoik asit (C13), 2354,08 µg/mL Miristik asit

(C14), 103,92 µg/mL Palmitik asit (C16), 203,68 µg/mL cis-8,11,14-Eikositrienoik asit (C22:3), 225,1 µg/mL Araşidonik asit (C20:4) başta olmak üzere yağ asitleri içerdiği tespit edildi (Tablo 4.6.). Grafik 4.4'de *T. obliquus*'a ait kromatogram verilmiştir.

Tablo 4.6. *Tetrademus obliquus*'un Yağ Asitleri İçeriği

Yağ Asidi	Konsantrasyon (µg/mL)	Tutma Süresi (dk)	Pik Alanı	Yağ Asidi Grubu
C4-Bütirik asit	54063,79	2,799	68886016	DYA
C6-Kaproik asit	466,09	3,417	2652	DYA
C10-Kaprik asit	0,47	4,41	15783	DYA
C11-Undekanoik asit	6,22	4,843	12922	DYA
C13-Triundekanoik asit	505,289	5,59	21916	DYA
C14-Miristik asit	2354,08	5,824	116933	DYA
C14:1-Miristoleik asit	4,11	6,305	1725	TDYA
C15-Pentadekanoik asit	26,88	7,862	5940	DYA
C16-Palmitik asit	103,92	9,345	3332	DYA
C16:1-Palmitoleik asit	13,91	10,295	7263	TDYA
C17-Heptadekanoik asit	24,36	12,256	4612	DYA
C18-Stearik asit	14,15	13,472	1428	DYA
C18:1-Oleik asit	2,87	14,695	17873	TDYA
C18:1-Elaidik asit	8,28	15,519	7991	TYA
C18:2-Linoleik asit	9,94	16,293	28452	ÇDYA
C18:2-Linolelaidik asit	13,09	16,936	12991	TYA
C18:3-g-Linolenik asit	1,818	18,395	4722	ÇDYA
C18:3-a-Linolenik asit	9,63	18,754	6967	ÇDYA
C20-Araşidik asit	4,19	20,171	5184	DYA
C20:1-cis-11-Eikosenoik asit	10,83	21,286	16797	TDYA
C20:2-cis-11,14-Eikosadienoik asit	1,92	22,706	21290	ÇDYA
C22:3-cis-8,11,14-Eikositrienoik asit	203,685	24,373	1979827	ÇDYA
C20:4-Araşidonik asit	225,1	26,825	59307	ÇDYA
C20:5-cis,5,8,11,14,17-Eicosapentanoik asit	73,596	28,955	709026	ÇDYA
C22:1-Erusik asit	8,506	34,269	42447	TDYA

DYA: Doymuş yağ asidi; TDYA: Tekli doymamış yağ asidi; TYA: Trans yağ asidi; ÇDYA: Çoklu doymamış yağ asidi.



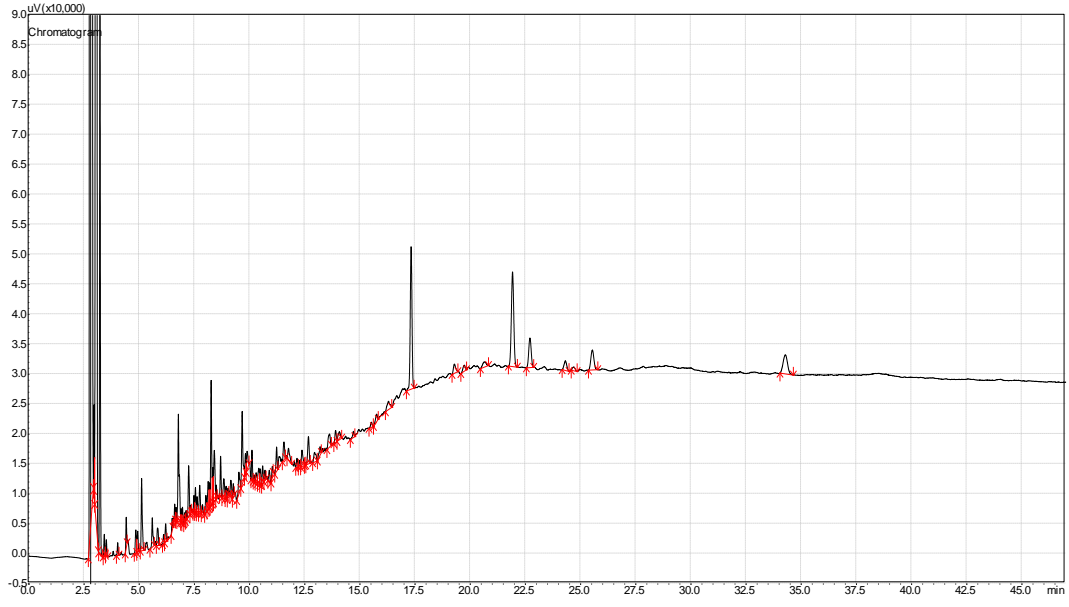
Grafik 4.4. *Tetradesmus obliquus* Yağ Asidinin Kromatogramı

Rhizopus stolonifer'de; 73958,52 µg/mL Bütirik asit (C4), 343,42 µg/mL Kaproik asit (C6) ve 47,5 µg/mL Palmitik asit (C16) başta olmak üzere yağ asitleri olduğu tespit edildi (Tablo 4.7). Grafik 4.5'te *R. stolonifer*'e ait kromatogram verilmiştir.

Tablo 4.7. *Rhizopus stolonifer*'in Yağ Asitleri İçeriği

Yağ Asidi	Konsantrasyon (µg/mL)	Tutma Süresi (dk)	Pik Alanı	Yağ Asidi Grubu
C4-Bütirik asit	73958,52	2,798	713619146	DYA
C6-Kaproik asit	343,42	3,415	12185	DYA
C15:1-cis 10 Pentadekenoik asit	10,485	8,26	77563	DYA
C16-Palmitik asit	47,5	9,664	133004	DYA
C18:1-Elaidik asit	1,57	15,52	4211	TDYA
C18:2,6-Linoleik asit	2,39	16,29	12688	ÇDYA
C18:2-Linoleaidik asit	9,01	17,32	135036	TYA
C20:1-cis-11-Eikosenoik asit	11,52	21,92	120274	TDYA

DYA: Doymuş yağ asidi; TDYA: Tekli doymamış yağ asidi; TYA: Trans yağ asidi; ÇDYA: Çoklu doymamış yağ asidi.



Grafik 4.5. *Rhizopus stolonifer* Yağ Asidinin Kromatogramı

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, İstanbul Bostancı Sahili ve Çanakkale Merkez Limanı'nda meydana gelen müsilaj yapısından alınan tuzlu su (deniz) numunelerinden ve Bursa İnegöl Kalbur Deresi'nden alınan tatlı su (dere) numunesinden izole edilerek moleküler tanımlamaları yapılan bir adet küf ve iki adet mikroalgün antimikrobiyal aktivite ve biyoyakıt hammadde kapasiteleri araştırılmıştır.

Moleküler tanımlamalar sonucunda fungusun *Rhizopus stolonifer*, mikroalgünlerin ise *Chlorella vulgaris* ve *Tetradesmus obliquus* olduğu tespit edilmiştir. Shenoy (2007) yapmış olduğu çalışmada *Rhizopus stolonifer*'in LROR ve LR5 primerleri ile ITS moleküler tanımlamasının yapıldığını belirtmiştir ve aynı yöntemle bu çalışmada da İstanbul Bostancı Sahili'nden alınan fungusun tanımlaması yapılmıştır. Burja vd. (2001) yaptığı çalışmaya göre ökaryotik yeşil alg olan ve tür seviyesinde *Chlorella vulgaris* olarak tanımlanan algün tanımlanmasında sadece kloroplast genomu primerleri olan CYA 359F ve 781R primerleri kullanılarak 16S moleküler tanımlaması yapılmıştır. Benzer yöntemle bu çalışmada da Çanakkale Merkez Liman Kıyısı'ndan alınan yeşil algün *Chlorella vulgaris* olduğu tespit edilmiştir. Andrade vd. (2014) *Scenedesmus obliquus*'un 18S rRNA EuKA ve EuKB primerleri ile moleküler tanımlamasını yaptıklarını belirtmişlerdir. Bu çalışmada da benzer yöntem ile Bursa İnegöl Kalbur Dere'sinden alınan yeşil algün *Tetradesmus obliquus* olduğu belirlenmiştir.

Mikroorganizmaların antimikrobiyal aktivite ve biyokütlelerinin biyoyakıt hammadde kapasitelerinin belirlenmesi için büyük ölçekli üretim çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca mikroalgünlerin büyüme oranları, optik yoğunlukları, kuru ağırlıkları, toplam lipid konsantrasyonları ve klorofil miktarları tespit edilmiştir.

Disk difüzyon ve minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) yöntemi ile *R. stolonifer*, *C. vulgaris* ve *T. obliquus*'un antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Deneyler sonucunda etanol, metanol, dietil eter ve diklorometan çözücülerini ile çıkarılan *Rhizopus stolonifer* ve *Tetradesmus obliquus*'a ait özütlerin antimikrobiyal aktivite göstermediği, *Chlorella vulgaris*'in de sadece diklorometan ve dietil eter özütlerinin antibakteriyel aktivitesi olduğu belirlenmiştir. *Chlorella vulgaris*'in dietileter özütünün *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis*'e karşı MİK değerleri sırasıyla; 625, 312,5, 625 µg/mL ve diklorometan özütünün MİK değerleri ise; 78,125, 78,125 ve 156,25 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Yılmaz (2019) yapmış olduğu bir çalışmada, *Chlorella protothecoides*'in yağınını % 5 ve % 10 luk dimetil sülfoksit (DMSO) konsantrasyonlarında *Penicillium chrysogenum* ve

Aspergillus parasiticus funguslarına karşı disk difüzyon testi uygulamıştır. Her iki fungal patojende misel oluşumunun azaldığı tespit edilmiştir. Kontrol antibiyotığının zon çapları sırasıyla 30 mm ve 20 mm iken, alg ekstraktının zon çapları 21 mm ve 17 mm olarak belirtilmiştir (Yılmaz, 2019: 221). Vehapi vd. (2021) *U. lactuca*, *C. vulgaris*, *C. minutissima* and *C. protothecoides* alglerinin ekstraktlarının *Fusarium oxysporum* fungusunun üzerinde disk difüzyon analizi yapmıştır. Bu analiz sonucunda *C. vulgaris*, *C. minutissima*, *C. protothecoides* ve *U. lactuca* için sırasıyla 53 mm, 59 mm, 54,50 mm ve 47 mm zon çapları belirlenmiştir. Kontrol antibiyotik için zon çapının 76,50 mm olduğu belirtilmiştir (Vehapi vd., 2021: 39).

Mikroalglerin optik yoğunluk ve kuru ağırlık tartımları 5 günde bir yapılarak, spesifik büyüme oranları ve maksimum üretkenlikleri hesaplanmıştır. *Chlorella vulgaris* ve *Tetradesmus obliquus*'un büyüme oranları sırası ile 0,13 gün⁻¹ ve 0,14 gün⁻¹, maksimum üretkenlikleri 0,61 gr/L.gün ve 1,25 gr/L.gün olarak belirlenmiştir. Blair vd. (2014) yapmış oldukları bir çalışmada *C. vulgaris*'in beyaz ışık altındaki büyüme oranının 0,369 gün⁻¹ ve üretkenliğinin 0,019 gr/L.gün olduğunu belirtmişlerdir (Blair vd., 2014: 667). Nadzir vd. (2018) yapmış oldukları bir çalışmada *T. obliquus*'un 0,22 gün⁻¹ büyüme oranı ve 0,115 gr/L.gün üretkenliği olduğunu belirtmişlerdir (Nadzir vd., 2018: 3). Bu çalışmada literatürde benzer çalışmalarda elde edilen sonuçlara göre mikroalglerin üretkenliklerinin daha yüksek olduğu sonuçlar elde edilmiştir.

Chlorella vulgaris ve *Tetradesmus obliquus*'un toplam lipid konsantrasyonu değerleri gravimetrik hesaplama ile belirlenmiştir ve kuru ağırlıklarının sırasıyla; %22,4 ve %19,6'sının yağ olduğu tespit edilmiştir. Literatürde mikroalglerin yapılarında %4-80 lipid, %10-70 protein ve %6-57 karbonhidrat olmak üzere pek çok bileşen bulunduğu belirtilmiştir (Elçik ve Çakmakçı, 2017:796; Şirinyıldız ve Yorulmaz, 2022: 102; Aktar ve Cebe, 2010: 239). Akgül ve Akgül (2022) yapmış oldukları bir çalışmada *Tetradesmus obliquus*'un toplam lipid değerinin %15,6 olduğunu belirtmişlerdir (Akgül ve Akgül, 2022: 532). Akgül (2021) yapmış olduğu çalışmada *Chlorella vulgaris*'in kuru ağırlığının % 10'nun lipid olduğunu belirtmiştir (Akgül, 2021: 99). Bu çalışmada kullanılan mikroalglerin kuru ağırlıklarının toplam lipid içeriklerinin daha önceki yapılan çalışmalarda elde edilen değerlere oranla daha yüksek olduğu görülmüştür.

Klorofil a için 646,6 nm ve klorofil b için 663,6 nm absorbandsa ölçülen değerlere göre yapılan hesaplar sonucunda; en yüksek klorofil a ve b değerlerini *C. vulgaris* 20. günde (1,14 - 0,79 mg/mL) verirken, *T. obliquus* için 7. günde (3,98-1,61 mg/mL) görülmüştür.

Marin vd. (2010) yapmış oldukları çalışmada *C. vulgaris* ve *S. obliquus* mikroalglerinin yüksek oranda klorofil a ve b içerdiklerini belirtmiş ve hücrel klorofil miktarlarını sırasıyla; 0,45 ve 2,21 pg olduğunu belirtmişlerdir (Marin vd., 2010: 60). Akgül (2021) yapmış olduğu çalışmada *C. vulgaris*'in farklı aydınlatma sürelerine göre klorofil a ve b değerlerinin değiştiğini ve en yüksek 7000 lux ışık altında sırasıyla 9 µg/mL ve 4,2 µg/mL olduğunu belirtmiştir (Akgül, 2021: 42).

Chlorella vulgaris ve *Tetrademus obliquus*'un GC-FID (Shimadzu 2010) ile yapılan yağ asidi metil esterlerinin (FAME) analizi sonucunda bütirik asit, kaproik asit, miristik asit, araşidonik asit ve palmitik asit her iki mikroalg içeriğinde yüksek oranlarda bulunmaktadır. *Rhizopus stolonifer*'in GC-FID (Shimadzu 2010) ile yapılan yağ asidi metil esterlerinin (FAME) analizi sonucunda da bütirik asit, kaproik asit, palmitik ve linolelaidik asit yüksek miktarlarda bulunmaktadır. Palmitik asit biyoyakıt (biyodizel) ve kozmetik üretiminde; palmitoleik asit cilt bakım ürünlerinde; oleik asit gıda takviye ürünlerinde ve ilaç maddelerinde kullanılmakta ve γ -linolenik asit de (C18: 3n6) bir omega 6 yağ asididir (Cervantes vd., 2018: 20). Biyodizelde bulunan en yaygın yağ asidi metil esterleri, aynı zamanda bu çalışmada izole edilen iki mikroalg ve bir fungus türünde sentezlenen yağ asitleri olan palmitik asit, stearik asit, oleik asit, linoleik asit ve linolenik asittir. Bu yaygın yağ asitlerinin transesterifikasyonu ile elde edilen biyodizel, petrol türevi dizel yakıtına göre birçok avantaja sahiptir. Biyodizel CO₂, CO ve hidrokarbon emisyonlarını ve partikül emisyonlarını azaltır (Kaur vd., 2012: 339). *C. vulgaris* ve *T. obliquus* mikroalglerinde ortak olarak en yüksek oranda bulunan bütirik asit; gıda maddeleri, içecek endüstrisi, antimikrobiyal ajan, parfüm endüstrisi, plastik malzeme ve tekstil endüstrisinde sıklıkla kullanılmaktadır (Çağlar vd., 2017: 215). Tez kapsamında tanımlanan fungus ve mikroalg lipitlerinin C16 ve C18 numaralı karbon atomca zengin olmaları bu hücrelerin biyodizel üretiminde kullanılacak hammaddeler olduğunu işaret etmektedir (Tekin vd., 2021: 8; Sajjadi vd., 2018: 204). Tez kapsamında tanımlanan mikroalg hücreleri arasında en yüksek C16 ve C18 metil esteri içeriğine sahip olan mikroalg 177,61 µg/mL (C16+C18) ile *T. obliquus*'un olduğu ve *R. stolonifer*'in C16+C18 metil esterleri toplamı da 60,47 µg/mL bulunmuştur. Hogan vd. (2021) *Amphora sp.* isimli mikroalgin yüksek oranda biyodizel ve biyoetanol üretim kapasitesinin olduğunu rapor etmiştir. Mi vd. (2022) *T. obliquus*'un üretiminde karbon kaynağı eklenmesi ile daha fazla biyokütle ve lipit içeriğine sahip olduğunu saptamıştır. Silva vd. (2022) *C. vulgaris*'in yüksek oranlarda palmitoleik, linolenik ve linolelaidic asit içerdiğini ve kaliteli bir biyodizel için ideal özelliklere sahip olduğunu göstermiştir (Hogan vd., 2021:

1; Mi vd.,: 1; 2022; Silva vd., 2022: 1). Hasni vd. (2023) üç farklı fungus türü ile yapmış oldukları çalışmada (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* ve *Rhizophus sp.*) en yüksek yağ içeriğinin *Rhizophus* cinsinde olduğunu belirtmiş ve toplamda % 56 oranında doymuş yağ asitleri içerdiğini tespit etmişlerdir (Hasni vd., 2023: 6). Literatürdeki benzer mikroalgler ve fungus türü ile karşılaştırıldığında, ülkemiz sınırları içerisindeki lokasyonlardan izole edilen ve tez kapsamında tanımlanmış yerli izolatların biyoyakıt hammaddesi olarak kullanılabilir özellikte olduğu tespit edilmiştir.

KAYNAKÇA

- Abacı, Ö. & Haliki, A.** (2005). Fungal Tanıda Polimeraz Zincir Reaksiyonu. *Orlab-Online Mikrobiyoloji Dergisi*, 3 (10), 1-9.
- Abbasoğlu, U.** (1996). Antimikrobiyal Aktivite Araştırma Yöntemleri. *FABAD J. Pharm. Sci.*, 22, 111-118.
- Abed, R. M. M.vd.** (2002). Picobenthic Cyanobacterial Populations Revealed by 16S rRNA-Targeted in situ Hybridization. *Environmental Microbiology*, 4 (7), 375-382.
- Adıyaman, A.** (2021). *Mikrobiyal Lipit Üretiminde Gıdalardan İzole Edilen Mayaların Kullanılması* (Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi). Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği ABD, Nevşehir.
- Afify, A. E. M. R. vd.** (2018). *Scenedesmus obliquus*: Antioxidant and Antiviral Activity of Proteins Hydrolyzed by Three Enzymes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16, 399-408.
- Akgül, G.** (2021). *Chlorella Vulgaris Mikroalg Kültürünün CO₂ Tutma Veriminin ve Farklı Büyüme Koşullarında Biyodizel Üretim Potansiyelinin İncelenmesi* (Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi). Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği ABD, Antalya.
- Akgül, F. & Akgül, R.** (2022). Combined Effect of Nitrogen and Phosphorus on Growth and Biochemical Composition of *Tetradesmus obliquus* (Turpin) M.J. Wynne. *International Journal of Secondary Metabolite*, 9 (4), 525-537.
- Akkara, M. & Tosun, H.** (2014). Funguslardan Elde Edilen Endüstriyel Ürünler. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 9 (2), 46-53.
- Aksungur, N. & Firidin, Ş.** (2008). Su Kaynaklarının Kullanımı ve Sürdürülebilirlik. *Sumae Yunus Araştırma Bülteni*, 8 (2), 9-11.
- Aktar, S. & Cebe, G. E.** (2010). Alglerin Genel Özellikleri, Kullanım Alanları ve Eczacılıktaki Önemi. *Anakara Ecz. Fak. Derg.*, 39 (3), 237-264.
- Al, K. & Bayrakdar Ateş, E.** (2022). Sürdürülebilir Hidrojen Üretim Teknolojileri: Biyokütle Temelli Yaklaşımlar. *Bartın University International Journal of Natural and Applied Sciences*, 5(1), 18-37.

Alizade, H. vd. (2016). Comparison of Disc Diffusion, Broth Microdilution and Modified Hodge Test Susceptibility Testing Of *Escherichia coli* Isolates to Beta-Lactam Antibiotics. *Medical Laboratory Journal*, 10 (2), 19-24.

Alptekin, E. (2008). *Atık Ağartma Toprağı Yağının Enzimatik Hidrolizi* (Yayınlamış Yüksek Lisans Tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği ABD, İstanbul.

Alptekin, E. & Çanakçı, M. (2008). Farklı Hammaddelerden Üretilen Metil Ester Ve Gliserinin Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi. *Gazi Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Dergisi*, 23 (3), 549-556.

Andersen, R. A. (2005). *Algal Culturing Techniques*, Elsevier Academic Press, Hong Kong.

Anderson, M. D. vd. (2001). *Monitoring and Management Strategies for HAB in Coastal Waters (59. Basım) Report*. Singapur. IOC Technical Series.

Andrade, L vd. (2014). Application of Response Surface Methodology (RSM) for Culture Conditions and Biomass Production of Psychrophilic Microalgae Isolated from High Mountains Lake During the ice-free Season. *Int. J. Environ. Res.*, 8(3): 799-812.

Andrade, L. vd. (2018). Surface Water Flooding, Groundwater Contamination, and Enteric Disease in Developed Countries: A Scoping Review of Connections and Consequences. *Environmental Pollution*, 236, 540-549.

Anupama & Ravindra, P. (2000). Value-Added Food: Single Cell Protein. *Biotechnology Advances*.18, 459-479.

Avcı, İ. (2021). Dünya'da ve Türkiye'de Su Politikaları ve Su Yönetimi. *İstanbul Bülten*, 168, 4-12.

Aydın, H. & Uzar, S. (2009). Denizel Mikroalg Biyotoksinleri ve Etkileri. *C.B.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 5 (1), 87–100.

Aydın, Ş. G. (2019). Mikroalg Teknolojisi ve Çevresel Kullanımı. *Harran Üniversitesi Mühendislik Dergisi*, 4 (1), 81-92.

- Balkis, N. vd.** (2011). Role of single-celled organisms in mucilage formation on the shores of Büyükada Island (the Marmara Sea). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 91 (04), 771–781.
- Balouch, H. vd.** (2023). Prospecting the Biofuel Potential of New Microalgae Isolates. *International Journal of Hydrogen Energy*, Çevrimiçi Ön Yayın. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2023.02.028
- Baran, M. A.** (2017). Dünyanın Mevcut Su Potansiyeli ve Deniz Suyu Arıtımı. *ABMYO Dergisi*, 45, 71-83.
- Bartolomeu, M. vd.** (2022). Bioprospecting Antibiotic Properties in Photodynamic Therapy of Lipids from *Codium tomentosum* and *Chlorella vulgaris*. *Biochimie*, 203, 32-39.
- Benkova, M., Soukup, O. & Marek, J.** (2020). Antimicrobial Susceptibility Testing: Currently Used Methods and Devices and The Near Future in Clinical Practice. *Journal of Applied Microbiology*, 129, 806-822.
- Bennet, J. W.** (1998). Mycotechnology: The Role of Fungi in Biotechnology. *Journal of Biotechnology*, 66, 101-107.
- Benny, G. L. vd.** (2016). Biology of Microfungi, Li D. W. (Ed.), *Challenges and Future Perspectives in the Systematics of Kickxellomycotina, Mortierellomycotina, Mucoromycotina, and Zoopagomycotina*. Springer, Cham., 65-126.
- Bera, B. vd.,** (2022). Steady Declining Trend of Groundwater Table and Severe Water Crisis in Unconfined Hard Rock Aquifers in Extended Part of Chota Nagpur Plateau, India. *Applied Water Science*, 12 (3), 1–19.
- Blair, M. F., Kokabian, B & Gude, V. G.** (2014). Light and Growth Medium Effect on *Chlorella vulgaris* Biomass Production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2, 665-674.
- Bligh, E. G. & Dyer, W. J.** (1959). A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.
- Borowitzka M.A. & Moheimani N.R.** (2013). *Algae for Biofuels and Energy*, Cilt 5, Springer.

- Brennan, L. & Owende, P.** (2010). Biofuels from Microalgae—A Review of Technologies for Production, Processing, and Extractions of Biofuels and Co-Products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 557-577.
- Breuer, G. vd.** (2012). The Impact of Nitrogen Starvation on the Dynamics of Triacylglycerol Accumulation in Nine Microalgae Strains. *BioresourceTechnology*, 124, 217-226.
- Burja vd.** (2001). Identification of the Green Alga, *Chlorella vulgaris* (SDC1) Using Cyanobacteria derived 16S rDNA Primers: Targeting the Chloroplast. *FEMS Microbiology Letters*, 202(2), 195-203.
- Cain, J. R. & Trainor, F. R.** (1976). Regulation of Gametogenesis in *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). *J. Phycol.*, 12, 383-390.
- Caldwell, G. S.** (2009). The Influence of Bioactive Oxylipins from Marine Diatoms on Invertebrate Reproduction and Development. *Marine Drugs*, 7, 367-400.
- Catalani, E. vd.** (2016). Natural Products From Aquatic Eukaryotic Microorganisms For Cancer Therapy: Perspectives On Anti-tumour Properties Of Ciliate Bioactive Molecules, *Pharmacological Research*, 113, 409–420.
- Cepak, V. vd.** (2007). The Nucleocytosolic and Chloroplast Cycle in the Green Chlorococcal Alga *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae, Chlorococcales) Grown Under various Temperatures. *Phycologia*, 46 (3), 263-269.
- Cervantes, A. T. vd.** (2018). Characterization of *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM for High-Energy Molecules Accumulation: Deeper Insight into Biotechnological Potential of Strains of The Same Species. *Biotechnology Reports*, 17, 16-23.
- Cheah, W. Y. vd.** (2015). Biosequestration of Atmospheric CO₂ and Flue Gas-Containing CO₂ by Microalgae, *Bioresource Technology*, 184, 190-201.
- Chen, C. Y. vd.** (2011). Cultivation, Photobioreactor Design and Harvesting of Microalgae for Biodiesel Production: A Critical Review, *Bioresource Technology*., 102 (1), 71-81.
- Chen, J. vd.** (2018). The Potential of Microalgae in Biodiesel Production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90, 336–346.

- Chen, K. vd.** (2022). Source Apportionment Of River Water Pollution In A Typical Agricultural City Of Anhui Province, Eastern China Using Multivariate Statistical Techniques With APCS-MLR. *Water Science and Engineering*, 1-10, DOI: 10.1016/j.wse.2022.12.007.
- Chin, D. A.** (2006). *Water-quality Engineering in Natural Systems*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Cho, H. U. & Park, J. M.** (2018). Biodiesel Production by Various Oleaginous Microorganisms From Organic Wastes. *Bioresource Technology*, 256, 502–508.
- Christaki, E., Bonos, E. & Florou-Paneri, P.** (2015). Innovative Microalgae Pigments as Functional Ingredients in Nutrition. *Handbook of Marine Microalgae*, 233-243.
- Cirik, Ş. & Cirik, S.** (2011). Su Bitkileri I-Deniz Bitkilerinin Biyolojisi, Ekolojisi ve Yetiştirme Teknikleri. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları*, 58, 135-145.
- CLSI, Editor.** (2015). *Clinical and Laboratory Standarts Institute*. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition.
- CLSI, Editor.** (2018). *Clinical and Laboratory Standarts Institute*. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—28th Edition.
- Converti, A. vd.** (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: Process Intensification*, 48, 1146-1151.
- Corradi, M. G., Gorbi, G & Bassi, M.** (1995). Hexavalent Chromium Induces Gametogenesis in the Freshwater Alga *Scenedesmus Acutus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 30, 106-110.
- Çağlar, A., Tomar, O. & Ekiz, T.** (2017). Bütirik Asit: Yapısı, Özellikleri ve Sağlık Üzerine Etkileri. *Kocatepe Veterinary Journal*, 10 (3), 213-225.
- Çelik, İ. vd.** (2022). Synthesis, Molecular Docking, Dynamics, Quantum-Chemical Computation, and Antimicrobial Activity Studies of Some New Benzimidazole–Thiadiazole Hybrids. *ACS Omega*, 1-17.

Çınar, S., Özçimen, D. & Yılmaz, M. (2019). Denizel Diatom İzolasyonu, Tanımlanması Ve Besin Maddelerinin Diatom Büyümesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi, *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University*, 34 (3), 1143-1153.

Darienko, T. vd. (2015). Evaluating the Species Boundaries of Green Microalgae (*Coccomyxa*, *Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) Using Integrative Taxonomy and DNA Barcoding with Further Implications for the Species Identification in Environmental Samples. *PLoS One*, 16, 10 (6).

Da Silva, vd. (2020). Food Safety, Hypolipidemic and Hypoglycemic Activities, and in vivo Protein Quality of Microalga *Scenedesmus obliquus* in Wistar Rats. *Journal of Functional Foods*, 65, 1-11.

Das, D. & Veziroğlu, T. N. (2001). Hydrogen Production by Biological Processes: A Survey of Literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26, 13-28.

De Castro-Catal`a, N. vd. (2016). Ecotoxicity Oo Sediments in Rivers: Invertebrate Community, Toxicity Bioassays and the Toxic Unit Approach as Complementary Assessment Tools. *Science of Total Environment*, 540, 297-306.

Demiriz, T., Çokmuş, C & Pabuççu, K. (2011). Antimicrobial Activity of Some Algal Species Belonging to Cyanobacteria and Chlorophyta. *Asian Journal of Chemistry*, 23 (3), 1384-1386.

Dursun, N. & Gülşen, H. (2019). Biyohidrojen Üretim Yöntemleri ve Biyohidrojen Üretiminde Biyoreaktörlerin Kullanımı. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(1), 66-7.

Dote, Y. vd. (1994). Recovery of Liquid Fuel from Hydrocarbon-rich Microalgae by Thermochemical Liquefaction. *Fuel*, 73 (12), 1855-1857.

Ebrahimi, F. vd. (2008). Ethanol Production from Bread Residues. *Biomass and Bioenergy*, 32, 333–337.

Eker-Develi, E. (2009). Denizel Fitoplanktonun Ekolojik Önemi ve Küresel İklim Değişikliğindeki Rolü. *Mersin Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 5 (2), 285-293.

- Elam, C. C. vd.** (2003). Realizing the Hydrogen Future: The International Energy Agency's Efforts to Advance Hydrogen Energy Technologies. *International Journal of Hydrogen Energy*, 28, 601– 607.
- Elcik, H & Çakmakçı, M.** (2017). Mikroalg Üretimi ve Mikroalglerden Biyoyakıt Eldesi. *Gazi Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 32 (3), 795-820.
- Eleren, S. Ç. & Öner, B.** (2019). Sürdürülebilir ve Çevre Dostu Biyoyakıt Hammaddesi: Mikroalgler. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 25 (3), 304-319.
- Eloff, J. N.** (1998). A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria. *Plant Medica*, 64, 711-713.
- Ferreira, A. vd.** (2019). *Scenedesmus obliquus* Microalga-Based Biorefinery – from Brewery Effluent to Bioactive Compounds, Biofuels and Biofertilizers – Aiming at a Circular Bioeconomy. *Biofuels, Bioprod. Bioref.*, 13, 1169-1186.
- Ferreira, A. vd.** (2021). Biostimulant and Biopesticide Potential of Microalgae Growing in Piggery Wastewater. *Environmental Advances*, 4, 1-9.
- Ferruzzi, M. & Blakeslee, J.** (2007). Digestion, absorption, and cancer preventive activity of dietary chlorophyll derivatives. *Nutrition Research*, 27, 1,12.
- Filiz, E. & Koç, İ.** (2012). Bitkilerde DNA Barkotları. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 12, 53-57.
- Folch, J., Lees, M. & Stanley, G. H. S.** (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226 (1), 497-509.
- Gao vd.** (2022). High-Efficiency Biofuel Production by Mixing Seawater and Domestic Sewage to Culture Freshwater Microalgae. *Chemical Engineering Journal*, 443, 1-14.
- Gardes, M. & Bruns, T. D.** (1993). ITS Primers With Enhanced Specificity for Basidiomycetes-Application to the Identification of Mycorrhizae and Rusts. *Molecular Ecology*, 2 (2), 113-118.

- Garcia-Pichel, F., Lopez-Cortes, A. & Nübel, U.** (2002). Phylogenetic and Morphological Diversity of Cyanobacteria in Soil Desert Crusts from the Colorado Plateau. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (4), 1902-1910.
- Ge, S. vd.** (2018). Centrate Wastewater Treatment with *Chlorella Vulgaris*: Simultaneous Enhancement of Nutrient Removal, Biomass and Lipid Production. *Chemical Engineering Journal*, 342, 310-320.
- Gengiah, K. vd.** (2023). Process and Technoeconomic Analysis of Bioethanol Production from Residual Biomass of Marine Macroalgae *Ulva lactuca*. *Science of the Total Environment*, 868, 1-8.
- Gerbersdorf, S. U. vd.** (2011). Anthropogenic Pollutants Affect Ecosystem Services of Freshwater Sediments: The Need For a “Triad Plus X” Approach. *Journal of Soils and Sediments*, 11, 1099-1114.
- Gest, H.** (2004). The Discovery of Microorganisms by Robert Hooke and Antoni Van Leeuwenhoek, Fellows of The Royal Society. *Notes Rec. R. Soc. Lond.*, 58 (2), 187-201.
- Ghorai, S. vd.** (2009). Fungal Biotechnology in Food and Feed Processing. *Food Research International*, 42, 577-587.
- Gilbert-Lopez, B. vd.** (2017). Green Compressed Fluid Technologies for Downstream Processing of *Scenedesmus obliquus* in a Biorefinery Approach. *Algal Research*, 24, 111-121.
- Gillings, M. R.** (2013). Evolutionary Consequences of Antibiotic Use for the Resistome, Mobilome, and Microbial Pangenome. Humans. *Antibiotics and Evolution*, 4 (4), 1-10.
- Gillings, M. R. vd.** (2015). Using The Class 1 Integron-Integrase Gene as a Proxy For Anthropogenic Pollution. *The ISME Journal*, 9, 1269-1279.
- Ginies, C., Brillard, J. & Nguyen-The, C.** (2016). Identification of Fatty Acids in *Bacillus cereus*. *Journal of Visualized Experiments*, 118, 1-9.
- Gökçay, C. F. vd.,** (2001). Anaerobik Biyoteknoloji Teorik Altyapı ve Uygulamalar. IV. *Ulusal Çevre Mühendisliği Kongresi*, 7-10 Kasım 2001, 1-9.
- Gökpinar, Ş. vd.** (2006). Algal Antioksidanlar. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 23 (1), 85-89.

- Guedes, A. C. vd.** (2013). Supercritical Fluid Extraction of Carotenoids and Chlorophylls a, b and c, from a Wild Strain of *Scenedesmus obliquus* for Use in Food Processing. *Journal of Food Engineering*, 116, 478-482.
- Gupta, S. vd.** (2023). Heavy Metal and Antibiotic Resistance in Four Indian and UK Rivers with Different Levels and Types of Water Pollution. *Science of the Total Environment*, 857 (1), 1-10, 159059.
- Gümüş, B., Ünlüsayın, M. & Gümüş, E.** (2019). Gıdalarda Deniz Kaynaklı Makroalg Özütü Kullanımı ve Lipit Oksidasyonunu Önlemede Antioksidan Etkisi. *Akademik Gıda*, 17 (3), 389-400.
- Gündoğdu, A., Gökkurt, O., & Karaçuha, M.E.** (2007). Sucul Ekosistemde Mikroorganizmaların Kimyasal Maddelerle Olan İlişkisi, *Ulusal Su Günleri Konferansı*, s. 496-505.
- Hacettepe Ders Notları.** *Protozoalar.* [Erişim Tarihi: 16.02.2023, <https://yunus.hacettepe.edu.tr>].
- Harun, R. vd.** (2010). Bioprocess Engineering of Microalga to Produce a Variety of Consumer Products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 1037-1047.
- Hasni, M. H., Ahmad, F. B. & Athoillah, A. Z.** (2023). The Production of Microbial Biodiesel From Cellulose-Derived Fungal Lipid Via Consolidated Bioprocessing. *Environmental Technology & Innovation*, 30, 103123.
- Haşimoğlu, A.** (2009). Fitoplanktonik Organizmaların Genel Özellikleri. *SÜMAE YUNUS araştırma Bülteni*, 9 (3), 10-11.
- Heijenoort, J.** (2001). Formation of the Glycan Chains in the Synthesis of Bacterial Peptidoglycan. *Glycobiology*, 11 (3), 25-36.
- Hogan, P. vd.** (2021). Effect of Biomass Pre-Treatment on Supercritical CO₂ Extraction of Lipids From Marine Diatom *Amphora Sp.* and Its Biomass Evaluation as Bioethanol Feedstock. *Heliyon*, 7.
- Hugenholtz, P.** (2002). Exploring Prokaryotic Diversity in the Genomic Era. *Genome Biology*, 3 (2), 1-8.

- Ip, P. F. & Chen, F.** (2005). Production of Astaxanthin by the Green Microalga *Chlorella Zofingiensis* in the Dark, *Process Biochemistry*, 40, 733-738.
- Irmak, H.** (2008). *Sularla İlişkili Hastalıklar*. Sağlık Bakanlığı, Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü. file:///C:/Users/Win7/Downloads/Ekutuphane_kitaplar_B%205.pdf
- Janiak, K. vd.** (2023). Comparing Methods for Protozoa Removal in Activated Sludge. *Separation and Purification Technology*, 306, 1-10.
- Ji, M. K. vd.** (2013). Simultaneous Nutrient Removal and Lipid Production From Pretreated Piggery Wastewater by *Chlorella Vulgaris* YSW-04. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 2701-2710.
- Joseph, A. M. vd.** (2023). Techno-Economic Feasibility and Exergy Analysis of Bioethanol Production from Waste. *Energy Conversion and Management: X*, 18, 1-20.
- Kahraman, N., Akansu, S. O & Albayrak, B.** (2007). İçten Yanmalı Motorlarda Alternatif Yakıt Olarak Hidrojen Kullanılması. *Mühendis ve Makina*, 48 (569), 9-15.
- Kar, F.** (2019). *Scenedesmus Dimorphus* Biyofilm Kültürlerinde Azot Açlığının Lipid Üretimi Üzerine Etkisi (Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi), Kütahya Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji ABD, Kütahya.
- Karatay, S. E.** (2010). *Mikrobiyel Lipitlerin Biyodizel Üretiminde Kullanım Kapasitelerinin Belirlenmesi*. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Karlson, B. vd.** (2021). Harmful algal blooms and their effects in coastal seas of Northern Europe. *Harmful Algae*, 102, 1-22.
- Karpuzcu, M. & Koçalı, M.** (2007). Göllerde Ötrofikasyon Ve Çözüm Önerileri. *GYTE*, 1-10.
- Kars, G.** (2012). Biyokütleden Biyohidrojen Üretimi. *Tarım Makinaları Bilimi Dergisi*, 8 (3), 265-270.
- Kaur, S. vd.** (2012). Fatty Acid Profiling and Molecular Characterization of Some Freshwater Microalgae from India with Potential for Biodiesel Production. *New Biotechnology*, 29 (3), 332-344.

- Kayaer, M. & Çiftçi, S.** (2018). 'Su Sorunu' ve Türkiye'nin Tatlısu Potansiyeli Çerçevesinde Türkiye'nin Sınırşan Sularının Stratejik, Etik ve Hukuki Boyutlarının Değerlendirilmesi. *Pesa Uluslararası Sosyal Araştırmalar Dergisi*, 4 (3), 386-404.
- Kayhan, F. E.** (2022). Müsilaj Sorunu ve Karakterizasyonu. *Doğanın Sesi*, 5 (9), 4-16.
- Kılıç, Ö.** (2018). *Marrubium parviflorum* subsp. *parviflorum* Bitkisinin Yağ Asidi ve Uçucu Yağ Kompozisyonu. *MSU Fen Bilimleri Dergisi*, 6 (1), 487-491.
- Kılınç, B.** (2019). Su Ürünlerinde Halofilik Bakteriler ve Endüstriyel Alanda Kullanımları. *Acta Aquatic Turcica*, 15(4), 535-545.
- Kıran, Ö. E., Çömlekçiöğlü, U. & Dostbil, N.** (2006). Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9 (1), 12-19.
- Kıvanç, M. & Güven, K.** (2009). *Prokaryotlar, Protisler ve Funguslar*. Anadolu Üniversitesi Yayınları, 2, 19-38.
- Kıvanç, M. vd.** (2004). Porsuk Çayı'nda Azot Miktarı ve Nitrifikasyon Bakterilerinin Dağılımı. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 2(1), 1-11.
- Kim, G. M. & Kim, Y. K.** (2022). Drying Techniques of Microalgal Biomass: A Review. *Appl. Chem. Eng.*, 33 (2), 145-150.
- Koch, A. L.** (2002). Control of the Bacterial Cell Cycle by Cytoplasmic Growth. *Critical Reviews in Microbiology*, 28 (1), 61-77.
- Koçan, D.** (2007). *Listeria Monocytogenes'in Belirlenmesinde Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu*. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Korte, I., Petry, M. & Kreyenschmidt, J.** (2023). Antimicrobial Activity of Different Coatings for Packaging Materials Containing Functional Extenders Against Selected Microorganisms Typical for Food. *Food Control*, 148, 1-12.
- Krienitz, L. & Bock, C.** (2012). Present State of the Systematics of Planktonic Coccoid Green Algae of Inland Waters. *Hydrobiologia*, 698, 295-326.
- Kumar, vd.** (2021). Identification, Characterization, and Lipid Profiling of Microalgae *Scenedesmus* sp. NC1, Isolated from Coal Mine Effluent with Potential for Biofuel Production. *Biotechnology Reports*, 30, 1-12.

- Kusmayadi, A. vd.** (2021). Microalgae as Sustainable Food and Feed Sources for Animals and Humans - Biotechnological and Environmental Aspects. *Chemosphere*, 271, 1-9.
- Lauritano, C. vd.** (2016). Bioactivity Screening of Microalgae for Antioxidant, Anti-Inflammatory, Anticancer, Anti-Diabetes, and Antibacterial Activities. *Frontiers in Marine Science*, 3, 1-12.
- Lisha, V. S. vd.** (2022). A Critical Review on Employing Algae as a Feed for Polycarbohydrate Synthesis. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 4, 100242.
- Liu, J. vd.,** (2021). Water Quality Assessment and Source Identification of The Shuangji River (China) Using Multivariate Statistical Methods. *PLoS One* ,16 (1), 0245525.
- Liu, Z. Y., Wang, G. C. & Zhou, B. C.** (2008). Effect of Iron on Growth and Lipid Accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 99, 4717-4722.
- Lodish vd.,** (2002). *Molecular Cell Biology*, Fifth Edition., 1-979.
- Lv, J. M. vd.** (2010). Enhanced Lipid Production of *Chlorella Vulgaris* by Adjustment of Cultivation Conditions. *Bioresource Technology*, 101, 6797-6804.
- Ma, Y. vd.** (2019). Direct Biodiesel Production from Wet Microalgae Assisted by Radio Frequency Heating. *Fuel*, 256, 1-8.
- Manan, S. vd.** (2021). Synthesis and Applications of Fungal Mycelium-Based Advanced Functional Materials. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 6, 1-10.
- Mandal, S & Mallick, N.** (2009). Microalga *Scenedesmus obliquus* as a Potential Source for Biodiesel Production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84, 281-291.
- Marin, A. R., Espinosa, L. G. & M., Stephenson, T.** (2010). Growth and Nutrient Removal in Free and Immobilized Green Algae in Batch and Semi-continuous Cultures Treating Real Wastewater. *Bioresource Technology*, 101, 58-64.
- Marrez, D. A. vd.** (2019). Antimicrobial and Anticancer Activities of *Scenedesmus obliquus* Metabolites. *Heliyon*, 1404, 1-22.
- Mata, T. M., Martins, A. A. & Caetano, N. S.** (2010). Microalgae for Biodiesel Production and Other Applications: A Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 217-232.

- Matsunaga, K., Kubota, K. & Harada, H.** (2014). Molecular Diversity of Eukaryotes in Municipal Wastewater Treatment Processes as Revealed by 18S rRNA Gene Analysis. *Microbes Environments*, 29(4), 401-407.
- Matthews, A. P. & Marsh, M.** (2007). Electron Microscopy Analysis of Viral Morphogenesis. *Methods in Cell Biology*, 79, 515-542.
- McNabney, D. W. G. vd.** (2023). Phytoplankton Metabolite Profiles From Two Lake Ontario Areas of Concern Reveal Differences Associated with Taxonomic Community Composition. *Science of the Total Environment*, 871, 1-12.
- Melikoğlu, M. & Albostan, A.** (2011). Türkiye'de Biyoetanol Üretimi ve Potansiyeli. *Gazi Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 26 (1), 151-160.
- Mi, Y. vd.** (2022). Carbon-Induced Effective Lipid Accumulation and Self-Flocculation For Biofuel Production of *Tetradesmus obliquus* FACHB-12. *Journal of Cleaner Production*, 355, 131813.
- Miao, X. & Wu, Q.** (2006). Biodiesel Production from Heterotrophic Microalgal Oil. *Bioresource Technology*, 97, 841-846.
- Michelon, W. vd.** (2021). Microalgae Produced During Phycoremediation of Swine Wastewater Contains Effective Bacteriostatic Compounds Against Antibiotic-Resistant Bacteria. *Chemosphere*, 283, 1-7.
- Mimouni, V. vd.** (2012). The Potential of Microalgae for the Production of Bioactive Molecules of Pharmaceutical Interest. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13, 2733-2750.
- Minowa, T. vd.** (1995). Oil Production from Algal Cells of *Dunaliella tertiolecta* by Direct Thermochemical Liquefaction. *Fuel*, 74 (12), 1735-1738.
- Miranda, J. R., Passarinho, P. C. & Gouveia, L.** (2012). Pre-treatment Optimization of *Scenedesmus obliquus* Microalga for Bioethanol Production. *Bioresource Technology*, 104, 342-348.
- Mohammed, A. M., Hassan, K. T. & Hassan, O. M.** (2023). Assessment of Antimicrobial Activity of Chitosan/Silver Nanoparticles Hydrogel and Cryogel Microspheres. *International Journal of Biological Macromolecules*, 233, 1-13.

- Mu vd.**, (2023). Exploring Preference And Willingness For Rural Water Pollution Control: A Choice Experiment Approach Incorporating Extended Theory Of Planned Behaviour. *Journal of Environmental Management*, 332, 1-11.
- Mujtaba, G & Lee, K.** (2017). Treatment of Real Wastewater Using Co-Culture of Immobilized *Chlorella Vulgaris* and Suspended Activated Sludge. *Water Research*, 120, 174-184.
- Nadzir, S. M. vd.** (2018). Combination Effect of Temperature and Light Intensity on Lipid Productivity of *Tetrademus obliquus*. *Journal of Physics: Conf. Series*, 1097, 1-9.
- Nakata, S. vd.** (2020). Polyunsaturated Fatty Acids-Enriched Lipid from Reduced Sugar Alcohol Mannitol by Marine Yeast *Rhodospiridiobolus fluvialis* Y2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 526, 1138-1142.
- Navarro-Lopez, E. vd.** (2020). Biostimulant Potential of *Scenedesmus obliquus* Grown in Brewery Wastewater. *Molecules*, 25 (664), 1-16.
- NCCLS.** (2003). *National Committee for Clinical Laboratory Standards (2003) Approved Standard: M2-A8. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*, 8th Edition, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- Nemcova, Y. & Kalina, T.** (2000). Cell Wall Development, Microfibril and Pyrenoid Structure in Type Strains of *Chlorella vulgaris*, *C. kessleri*, *C. sorokiniana* Compared with *C. luteoviridis* (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*). *Arch Hydro- biol*, 100, 95–105.
- Neto, J. A. R., Alves, S. N. & Lima, L. A. R. S.** (2023). Fatty Acid Methyl Esters (FAMES) Obtained From Edible Vegetable Oils: Larvicidal Activity and Melanization Process in *Aedes Aegypti* Larvae. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 50, 1-6.
- Niemi, C., Lage, S & Gentili, F. G.** (2019). Comparisons of Analysis of Fatty Acid Methyl Ester (FAME) of Microalgae by Chromatographic Techniques. *Algal Research*, 39, 1-5.
- Nguyen, T. D. P. vd.** (2019). Auto-Flocculation Through Cultivation of *Chlorella Vulgaris* in Seafood Wastewater Discharge: Influence of Culture Conditions on Microalgae Growth and Nutrient Removal. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 127 (4), 492-498.

Nouri, H. vd. (2019). Enhanced Growth and Lipid Production in Oleaginous Fungus, *Sarocladium Kiliense* ADH17: Study on Fatty Acid Profiling and Prediction of Biodiesel Properties. *Renewable Energy*, 135, 10-20.

Oliveira, C. Y. B. vd. (2021). A Multidisciplinary Review of *Tetradesmus obliquus*: a Microalga Suitable for Large-Scale Biomass Production and Emerging Environmental Applications. *Reviews in Aquaculture*, 13, 1594-1618.

Oswald W.J. & Golueke C.G. (1960). Biological Transformation of Solar Energy, *Adv. Appl. Microbiol.*, 2, 223-262.

Otay, T. vd. (2015). Tunceli İli ve Çevresi Tatlı Su Kaynaklarının Mevsimsel Olarak Bakteriyolojik ve Parazitolojik Yönden Değerlendirilmesi. *Bilim ve Gençlik Dergisi*, 3(2), 1-11.

Özalp, H. B. (2021). First Massive Musilage Event Observed in Deep Waters of Çanakkale Strait (Dardanelles), Turkey. *J. Black Sea/Mediterranean Environment*, 27 (1), 49-66.

Özçimen, D. (2018). *Chlorella protothecoides* Mikroalg Yağının *Botrytis cinerea* ve *Aspergillus niger* Küflerine Karşı Antifungal Etkisinin İncelenmesi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 15 (02), 45-52.

Özdemir, Z. Ö. & Mutlubaş, H. (2016). Biyodizel Üretim Yöntemleri ve Çevresel Etkileri. *Kırklareli University Journal of Engineering and Science*, 2, 129-143.

Öztürk, E. T. (2019). *Sentetik Yeraltı Suyundan Nitrat Kirliliğinin Tetradesmus obliquus Alg Kültürü Kullanılarak Giderilmesi.* (Yayınlanmış Doktora Tezi). Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Eskişehir.

Pegallapati, A. K. & Nirmalakhanda, N. (2013). Internally Illuminated Photobioreactor for Algal Cultivation Under Carbon Dioxide-Supplementation: Performance Evaluation, *Renewable Energy*, 56, 129-135.

Pereira, L. & Magalhaes, J. (2014). *Neto, Marine Algae, Biodiversity, Taxonomy, Environmental Assessment, and Biotechnology* (First Edition). Boca Raton: CRC Press.

Perez, M. J., Falque, E. & Dominguez, H. (2016). Antimicrobial Action of Compounds from Marine Seaweed, *Marine Drugs*, 14 (3), 52.

- Perveen, K. vd. (2022).** Antifungal Potential, Chemical Composition of *Chlorella vulgaris* and SEM Analysis of Morphological Changes in *Fusarium oxysporum*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29, 2501-2505.
- Porra, R. J., Thompson, W. A. & Kreidemann, P. E. (1989).** Determination of Accurate Extinction Coefficients and Simultaneous Equations for Assaying Chlorophylls A and B Extracted With Four Different Solvents: Verification of the Concentration of Chlorophyll Standards by Atomic Absorption Spectroscopy, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 975, 384-394.
- Posthuma, L. vd. (2020).** *Chemical Pollution Imposes Limitations to the Ecological Status of European Surface Waters*, *Scientific Reports*, [Erişim: 08.02.2023, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71537-2>]
- Prakash, J. W., Marimuthu, J. & Jeeva, S. (2011).** Antimicrobial Activity of Certain Fresh Water Microalgae From Thamirabarani River, Tamil Nadu, South India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1, 170-173.
- Precali, R. vd. (2005).** Mucilaginous aggregates in the northern Adriatic in the period 1999–2002: Typology and distribution. *Science of the Total Environment*, 353, 10– 23.
- Prommuak C. vd. (2012).** Microalgal lipid extraction and evaluation of single-step biodiesel production. *Engineering Journal*, 16 (6),157-165.
- Ramaraj, R. vd. (2013).** Chlorophyll is not accurate measurement for algal biomass. *Chiang Mai Journal of Science*, 40 (4), 547-555.
- Rather, R. A. vd. (2023).** Seasonal Fluctuation of Water Quality and Ecogenomic Phylogeny of Novel Potential Microbial Pollution Indicators of Veshaw River Kashmir-Western Himalaya. *Environmental Pollution*, 320, 121104.
- Rheinheimer, G. (1985).** *Aquatic Microbiology*. University of Kiel, West Germany, A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, Chichester- New York –Brisbane - Toronto.
- Richmond, A. vd. (1993).** A New Tubular Reactor for Mass Production of Microalgae Outdoors. *Journal of Applied Phycology*, 5 (3), 327-332.

- Rippka, R.** (1988). Recognition and Identification of Cyanobacteria. *Methods Enzymol*, 167, 28-67.
- Rockström, J. vd.** (2009). Planetary Boundaries: Exploring the Safe Operating Space for Humanity. *Ecology and Society*, 14 (2): 32.
- Rossi, E. vd.** (2022). Production of Biogas by Microorganisms with Saccharine sorghum Straw as Substrate with or without Alkaline and Citric Pretreatment. *Renewable Energy*, 197, 617-626.
- Safafar, H. vd.** (2016). Enhancement of protein and pigment content in two *Chlorella* spp. cultivated on industrial process water. *Journal of Marine Science and Engineering*, 4 (84), 1-15.
- Safi, C. vd.** (2014). Morphology, Composition, Production, Processing and Applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265-278.
- Sajjadi, B. vd.** (2018). Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 97, 200-232.
- Saran, B. & Karahan, Z. C.** (2010). Antimikrobiyal Ajanlara Genel Bakış. *Türk Üroloji Seminerleri*, 1, 216-220.
- Sekora, N. S. vd.** (2009). Using FAME Analysis to Compare, Differentiate, and Identify Multiple Nematode Species. *Journal of Nematology*, 41 (3), 163–173.
- Schramm, B., & Krijnse Locker, J.** (2005). Cytoplasmic Organization of POXvirus DNA Replication. *Traffic*, 6, 839–846.
- Shenoy, B. D.** (2007). *Multigene Phylogeny of Selected Anamorphic Ascomycetes* (Yayınlanmış Doktora Tezi). The University of Hong Kong, School of Biological Sciences, Division of Microbiology.
- Silva, D. A. vd.** (2022). Strategy for the Cultivation of *Chlorella vulgaris* with High Biomass Production and Biofuel Potential in Wastewater From the Oil Industry. *Environmental Technology & Innovation*, 25, 102204.

- Singh, P. K. & Singh, A. K.** (2014). Assessment of the Microbiological Quality of the River Gomati at Jaunpur (UP) India. *Int. J. Life Sci. Pharm. Res.*, 4 (4), 11-16.
- Song, J., Chen, J. & Luan, F.** (2023). Air Pollution, Water Pollution, and robots: Is Technology the Panacea. *Journal of Environmental Management*, 330, 1-17.
- Speece, R. E.** (1983). Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewater Treatment. *Environmental Science and Technology*, 17 (9), 416-427.
- Stirk, W. A. & Staden, J.** (2022). Bioprospecting for Bioactive Compounds in Microalgae: Antimicrobial Compounds. *Biotechnology Advances*, 59, 1-23.
- Stojkovic, I. J. vd.** (2014). Purification Technologies for Crude Biodiesel Obtained by Alkali-Catalyzed Transesterification. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 32, 1-15.
- Sugözü, İ., Öner, C. & Altun, Ş.** (2010). The Performance and Emissions Characteristic of a Diesel Engine Fueled with Biodiesel and Diesel Fuel. *Int.J.Eng.Research & Development*, 2, 50-53.
- Sun, X. M. vd.** (2019). Enhancement of Lipid Accumulation in Microalgae by Metabolic Engineering, *BBA-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1864, 552-566.
- Şener, Ş., Şener, E. & Varol S.** (2020). Hydro-Chemical and Microbiological Pollution Assessment of Irrigation Water in Kızılırmak Delta (Turkey). *Environmental Pollution*, 266, 115214.
- Şenler, N. G. & Yıldız, İ.** (2010). Tatlı Su Protozoonları ve Önemi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 3(1), 7-16.
- Şirinyıldız, D. D. & Yorulmaz, A.** (2022). Alternatif ve Sürdürülebilir Bir Gıda Kaynağı Olarak Algler. *Journal of Food, Nutrition and Gastronomy*, 1, 101-117.
- Takagi, M.** (1975). Seaweeds as Medicine, Tokida J., Hirose, H. (Ed.), *Advance of Phycology in Japan*, Gustav Fischer Verlag, s. 321-327.
- Tanka, Y.** (1969) Application of metal binding properties of marine algae in medicine, In Proceedings of the Food-drugs from the Sea Symposium, *Marine Technology Society*, 351-357.

- Tanvir, R. U. vd.** (2021). Harnessing Solar Energy Using Phototropic Microorganisms: A Sustainable Pathway to Bioenergy, Biomaterials, and Environmental Solutions. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 146.
- Taştan, B. E. & Tekinay, T.** (2016). A Novel Coal Additive from Microalgae Produced from Thermal Power Plant Flue Gas. *Journal of Cleaner Production*, 133, 1086-1094.
- Tekdal, D. & Ünek, C.** (2019). Türkiye’de Bazı Ekstrem Çevre Koşullarında Yaşayan Mikroalgal *sensu lato* Biyoçeşitliliğin Önemi. *Bağbahçe Bilim Dergisi*, 6 (1), 66-72.
- Tekin, N., vd.** (2021). Enhanced lipid accumulation of *Chlorella vulgaris* with agricultural waste under optimized photoheterotrophic conditions. *Biomass Conversion and Biorefinery*, <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01793-3>.
- Teo, C. & Idris, A.** (2014). Enhancing the Various Solvent Extraction Method Via Microwave Irradiation for Extraction of Lipids from Marine Microalgae in Biodiesel Production, *Bioresource Technology*, 171, 477-481.
- Thuy, N. T. T. vd.** (2023). Chemical Constituents from the Heterotrophic Marine Microalgae *Aurantiochytrium Sp.* SC145 and Their Antimicrobial Activities. *Natural Product Research*, <https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2201882>.
- Toprak, K.** (2006). *Rüzgar Enerji Santralleri Yardımıyla Hidrojen Eldesinin Ekonomik Analizi (Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi)*. Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Makina Mühendisliği ABD.
- Toshkova-Yotova vd.** (2022). Antitumor and Antimicrobial Activity of Fatty Acids from Green Microalga *Coelastrella sp.* BGV. *South African Journal of Botany*, 151, 394-402.
- Türk Mühendis ve Mimar Odaları Birliği Çevre Mühendisleri Odası İstanbul Şubesi** (2021). *"Marmara Denizi Müsilaj Sorununun Sebepleri, Değerlendirmesi ve Çözüm Önerileri" Raporu*. [Erişim:26.05.2021, https://www.cmo.org.tr/resimler/ekler/21995cdfa871c80_ek.pdf?tipi=78&turu=H&sube=2]
- Uçar, D.** (2018).Biyokütleden Elde Edilebilen Biyoenerji Türevleri: Biyogaz, Biyodizel, Biyoetanol Ve Biyohidrojen. *Şırnak Enerji ve Maden Potansiyeli*, 1, 143-155.
- Vehapi, M. vd.** (2021). Antimicrobial Activity of Algal Extracts Against Foodborne Pathogens. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 27, 36-43.

- Velasquez-Orta, S. B., Lee, J. G. M. & Harvey, A. P.** (2013). Evaluation of FAME Production From Wet Marine and Freshwater Microalgae by in Situ Transesterification. *Biochemical Engineering Journal*, 76, 83-89.
- Verschoor, A. Stap, I. & Helmsing, N. R.** (2004). Inducible Colony Formation within the Scenedesmaceae: Adaptive Responses to Info chemicals from Two Different Herbivore Taxa. *J. Phycol*, 40, 808-814.
- Viegas, C., Gouveia, L & Gonçalves, M.** (2021a). Aquaculture Wastewater Treatment Through Microalgal. Biomass Potential Applications on Animal Feed, Agriculture, and Energy. *Journal of Environmental Management*, 286, 1-14.
- Viegas, C., Gouveia, L & Gonçalves, M.** (2021b). Bioremediation of Cattle Manure Using Microalgae After Pre-Treatment with Biomass Ash. *Bioresource Technology Reports*, 14, 1-10.
- Viegas, C.V. vd.** (2015). A Route to Produce Renewable Diesel from Algae: Synthesis and Characterization of Biodiesel via in situ Transesterification of *Chlorella* alga and its Catalytic Deoxygenation to Renewable Diesel. *Fuel*, 155, 144-154.
- Voigt, J. vd.** (2014). The Cell-Wall Glycoproteins of the Green Alga *Scenedesmus obliquus*. The Predominant Cell-Wall Polypeptide of *Scenedesmus obliquus* is Related To The Cell-Wall Glycoprotein Gp3 of *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Plant Science*, 215-216, 39-47.
- Wang, J. vd.** (2021). Towards a Systematic Method for Assessing the Impact of Chemical Pollution on Ecosystem Services of Water Systems. *Journal of Environmental Management*, 281, 111873.
- Wang, L. vd.,** (2021). Study on the Governance of Black-Odor Water in Chinese Cities. *Journal of Cleaner Production*, 25 (308), 127290.
- Wei, C. vd. (2010).** Effects of Silica Nanoparticles on Growth and Photosynthetic Pigment Contents of *Scenedesmus obliquus*. *Journal of Environmental Sciences*, 22 (1), 155-160.
- Wei, Z. vd.** (2021). A Review on Phytoremediation of Contaminants in Air, Water and Soil. *Journal of Hazard Materials*, 403, 123658.

- Wen, Y. vd.** (2017). Isolation of an Indigenous *Chlorella Vulgaris* From Swine Wastewater and Characterization of Its Nutrient Removal Ability in Undiluted Sewage. *Bioresource Technology*, 243, 247-253.
- Widjaja, A., Chien, C. C. & 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.
- Wieser, M. F.** (2022). Protozoa. *Reference Module in Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822562-2.00064-5>.
- WWAP, 2016** (2016). *The United Nations World Water Development Report*. [Erişim: 08.02.2023, <https://www.unescap.org/sites/default/files/2016%20UN%20World%20Water%20Development%20Report-%20Water%20and%20Jobs.pdf>]
- Yadav, G. vd.** (2015). Performance Evaluation of a Green Process For Microalgal CO₂ Sequestration in Closed Photobioreactor Using Flue Gas Generated In-Situ, *Bioresource Technology*, 191, 399-406.
- Yamamoto, M. vd.** (2004). Regeneration and Maturation of Daughter Cell Walls in the Autospore-Forming Green Alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Journal of Plant Research*, 117, 257–264.
- Yamamoto, M., Kurihara, I. & Kawano, S.** (2005). Late Type of Daughter Cell Wall Synthesis in one of the *Chlorellaceae*, *Parachlorella kessleri* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Planta*, 221,766–775.
- Yan, L. vd.,** (2021). Phytoremediation of Radionuclides in Soil, Sediments and Water. *Journal of Hazard Materials*, 407, 124771.
- Yang, W. vd.** (2022). Diversity and Fate of Human Pathogenic Bacteria, Fungi, Protozoa, and Viruses in Full-Scale Sludge Treatment Plants. *Journal of Cleaner Production*, 380, 1-10.
- Yıldırım, İ., Turhan, H., Özgen, B.** (2010). The Effects of Head Rot Disease (*Rhizopus stolonifer*) on Sunflower Genotypes at Two Different Growth Stages. *Turkish Journal of Field Crops*, 15(1), 94-98.

- Yılmaz, A.** (2019). *Chlorella protothecoides* Mikroalg Yağının Karakterizasyonu, Biyoaktif Özellikleri ve Antifungal Etkinliği. *Akademik Gıda*, 17 (2), 217-225.
- Yılmaz, C., Kanoğlu, M. & Bolattürk, A.** (2011). Jeotermal Enerji ile Hidrojen Üretilmesi ve Sıvılaştırılması. X. *Ulusal Tesisat Mühendisliği Kongresi*, 259-279.
- Zang, L. Y. vd.** (1996). Elimination of n-Butylated Hydroxytoluene Methylation During Fatty Acid Analysis by Gas Chromatography. *Journal of Chromatography B*, 677, 209-216.
- Zaporozec, A. & Miller, J.C.** (2000). Groundwater Pollution, *UNESCO-IHP*, 1-27.
- Zhang, W. vd.** (2019). Comprehensive Evaluation of a Cost-Effective Method of Culturing *Chlorella pyrenoidosa* with Unsterilized Piggery Wastewater for Biofuel Production. *Biotechnology for Biofuels*, 12 (69), 1-11.
- Zhao, M. M. vd.,** (2020). Three Kinds of Ammonia Oxidizing Microorganisms Play an Important Role in Ammonia Nitrogen Self-Purification in The Yellow River. *Chemosphere*, 243, 125405.
- Zhu L.** (2015). Biorefinery as a Promising Approach to Promote Microalgae Industry: An Innovative Framework. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, 1376-1384.
- Zhu, X. vd.,** (2022). Effects of Different Types of Anthropogenic Disturbances and Natural Wetlands on Water Quality and Microbial Communities in A Typical Black-Odor River. *Ecological Indicators*, 136, 108613.
- Zingone, A. & Enevoldsen, H. O.** (2000). The Diversity of Harmful Algal Blooms: A Challenge for Science and Management. *Ocean and Coastal Management*, 43, 725-748.
- Zingone, A. vd.** (2021). Toxic marine microalgae and noxious blooms in the Mediterranean Sea: A contribution to the Global HAB Status Report", *Harmful Algae*, 102, 1-17.