

***Chlamydomonas* Suşlarının Farklı Kültür Besi Ortamları ve Doğal Mineralli Su Kullanılarak Biyomas ve Üreme Oranlarının Artırılması**

Dilek YALÇIN DUYGU*¹, Tülay ÖZER²

¹Gazi Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Beşevler, ANKARA
²Ahi Evran Üniversitesi, Kaman Yüksek Okulu, Gıda İşleme Bölümü, KIRŞEHİR
*dilekduygu06@hotmail.com

(Geliş/Received: 06.03.2018; Kabul/Accepted: 03.08.2018)

Özet

Bu çalışmada; mikroalg kültürlerinin üremeleri üzerine farklı besi ortamlarının etkileri ve farklı suşların üreme kabiliyetleri gözlemlenmiştir. *Chlamydomonas* fotosentetik, tek hücreli, ökaryotik yeşil algdir. Genetik, biyokimyasal ve fotosentez çalışmalarında hızlı büyümesi, kısa üreme döngüsüne sahip olması ve düşük maliyetli kültürünün yapılabilmesi nedeniyle cazip bir çalışma materyalidir. Çalışmamızda tatlı su birikintilerinden toplanan örneklerden *Chlamydomonas* cinsine ait iki suş izole edilmiştir. İzole edilen bu suşlar laboratuvar şartlarında, BG 11 ve Allen besi ortamları ile, doğal mineralli su kullanılarak üretilmiştir. Farklı besi ortamlarının *Chlamydomonas*'ın üreme dinamikleri üzerindeki etkileri hücre yoğunluğu, klorofil-*a*, kuru ağırlık ve optik yoğunluk tayinleri ile yapılmıştır. *Chlamydomonas* sp.1 (CCA02Chl01) suşu en iyi gelişmeyi Allen besi ortamında göstermiştir. *Chlamydomonas* sp.1 (CCA02Chl01) suşunun Allen besi ortamındaki hücre yoğunluğu ($3,95 \times 10^6$ hücre/mL), klorofil-*a* miktarı ($3,166 \mu\text{gL}^{-1}$), kuru ağırlık ($0,5347 \text{ g/mL}$) ve 685 nm 'de optikal yoğunluk ($0,5115 \text{ d}^{-1}$) olarak en yüksek bulunmuştur. *Chlamydomonas* sp.2 (CCA02Chl02) suşunun en iyi gelişmesi ise BG 11 besi ortamında olmuştur. *Chlamydomonas* sp.2 (CCA02Chl02) suşunun BG 11 besi ortamındaki hücre yoğunluğu ($6,0 \times 10^6$ hücre/mL), klorofil-*a* miktarı ($6,343 \mu\text{gL}^{-1}$), kuru ağırlığı ($0,5425 \text{ g/mL}$) ve 685 nm 'de optikal yoğunluğu ($0,7986 \text{ d}^{-1}$) olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Chlamydomonas*, Mikroalg, Hücre Yoğunluğu, Üreme Dinamikleri, Kültür Şartları

Increasing Biomass and Growth Rates of *Chlamydomonas* Strains Using Different Culture Media and Natural Mineral Water

Abstract

In this study, the effects of different mediums on the growth of different strains of *Chlamydomonas* was observed. *Chlamydomonas* is a photosynthetic, unicellular, eukaryotic green alga. It is an attractive study material because of its rapid growth, short growth cycle, and cost-efficient cultures for genetic, biochemistry and photosynthesis. In our study, two strains belonging to *Chlamydomonas* were isolated from samples collected from freshwater deposits. These strains were produced from natural mineral water, BG 11 and Allen media under laboratory conditions. The effects of different media on the growth dynamics of *Chlamydomonas* were determined by cell density, chlorophyll-*a*, dry weight and optical density. Allen medium is the best growth medium for *Chlamydomonas* sp.1 (CCA02Chl01) strain. The cell density (3.95×10^6 cells/mL), chlorophyll-*a* concentration ($3.166 \mu\text{gL}^{-1}$), dry weight (0.5347 g/mL), and optical density at 685 nm (0.5115 d^{-1}) were maximum for *Chlamydomonas* sp.1 (CCA02Chl01) strain on the Allen medium. *Chlamydomonas* sp.2 (CCA02Chl02) strain showed its best growth in the BG 11 medium. The cell density (6.0×10^6 cells/mL), chlorophyll-*a* concentration ($6.343 \mu\text{gL}^{-1}$), dry weight (0.5425 g/mL), and optical density at 685 nm (0.7986 d^{-1}) were found in *Chlamydomonas* sp.2 (CCA02Chl02) strain growing on the BG 11 medium.

Keywords: *Chlamydomonas*, Microalgae, Cell Density, Growth Dynamics, Culture Conditions

1. Giriş

Algler, sucül ekosistemlerde güneş ışığı ve karbondioksiti kullanarak organik moleküller sentezleyen birincil üreticiler olarak önemli ekolojik rol oynamaktadırlar [1,2]. Mikroalgler deniz, tatlı su ve karasal ortamlar gibi çok çeşitli

habitatlarda yaşayan, mikroskobik organizmalardır. Ökaryotik mikroalgler ve siyanobakteriler, gıda ve yakıt üretimi için yakın gelecekte umut verici organizmalar olarak görülmektedirler. Mikroalgler, hızlı büyümeleri, yüksek üreme hızları ile biyoteknoloji alanında ilaç ve kozmetik sanayi, su ürünleri

yetiştiriciliği, atıksuların arıtımı gibi birçok alanda hammadde olarak kullanılmaktadırlar [3,4]. *Chlamydomonas*, tatlı ve tuzlu sularda yaşayan, yaklaşık 500 tür içeren, tek hücreli ve hareketli bir mikroalgdır. Hücreler genellikle küresel, oval veya dikdörtgen biçimli olmakla birlikte, elipsoidal, piriform gibi diğer formları da mevcuttur. Hücre duvarı ince ve pürüzsüz olup, selülozdan oluşur. Hücre duvarının en büyük yapısal bileşeni glikoproteindir. *Chlamydomonas* türleri biyomaslarında lipitler, yağ asitleri, vitaminler, karotenoidler ve diğer hücresel bileşikleri biriktirir ve algal biyohidrojen ile biyofuel üretiminde değerlendirilmektedir [5,6]. *Chlamydomonas* genetik çalışmalar, hücre etkileşimi, çevresel koşulların değişimi ile tepki mekanizması çalışmaları, hücre ve moleküler biyoloji araştırmaları için güçlü bir model sistemi oluşturmaktadırlar [7]. Ayrıca, biyoteknoloji ve çeşitli endüstri alanlarında kullanılan değerli hammaddelerin üretimi ve biodizel üretimi için biyokütle üretiminde kullanılmaya başlanmıştır [8,9,10]. *Chlamydomonas* türleri farklı ortamlarda yaşayabilir, çevresel kısıtlamalara karşı adaptasyonu yüksek ve hızlıdır. Laboratuvar ortamlarında ucuz besi yerlerinde hızlı ve kolay ürettiği için çalışma materyali olarak tercih edilmektedirler [11,12,13]. *Chlamydomonas*'ın bütün bu özellikleri göz önüne alındığında çalışmalarımız bu tür üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu çalışmanın temel amacı, *Chlamydomonas* türlerinin tatlısu ortamlarından izole edilmesi, laboratuvar koşullarında üretimlerinin yapılması ve farklı besi yerlerinin üreme dinamikleri üzerindeki etkilerinin araştırılmasıdır.

2. Materyal ve Metot

2.1. İzolasyon ve kültür koşulları

Chlamydomonas, önceki çalışmalarımızda Ankara ilindeki (Türkiye) çeşitli tatlısu birikintilerinden toplanan örneklerden izole edilmişlerdir. Suşların izolasyonlarında tek hücreden üretme yöntemi kullanılmış [14,15] ve iki suş izole edilmiştir. Bu suşlar, Ahi Evran Üniversitesi (AEU-CCA) kültür koleksiyonunda muhafaza edilmekte olup, *Chlamydomonas* sp.1 (CCA02Chl01) ve *Chlamydomonas* sp.2

(CCA02Chl02) olarak kodlanmıştır. Önceki çalışmalarımızda, bu izolatların moleküler karakterizasyonu Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) ve Polymerase Chain Reaction (PCR) kullanılarak belirlenmiştir. Kültürler, BG 11 ve Allen besi yeri ile doğal mineralli suya (MS) (Beypazarı Doğal Maden Suyu®) 270 ml besi ortamı + 30 ml süspanse kültür olacak şekilde ekilmişlerdir. Denemeler sırasında kullanılan sentetik besi ortamlarının ve doğal maden suyunun kimyasal bileşimi Tablo 1 ve Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 1. Doğal maden suyunun kimyasal kompozisyonu

Anyonlar (mg/L)	Katyonlar (mg/L)
SO ₄ 147.300	Na 152.812
Cl 19.525	Ca 172.344
HCO ₃ 1.415.200	Mg 138.578
H ₂ SiO ₃ 52.100	Fe-Al 4.816

Işık kaynağı (50 µmol.m⁻².s⁻¹) kültürler 22 cm uzaklıkta yatay olarak yerleştirilmiş, 16 aydınlık: 8 karanlık ışık periyodu uygulanmış ve 22-25°C'de oda sıcaklığında kültüre edilmişlerdir. Besi ortamlarının pH'ı 6.5-7'ye ayarlanmıştır. Kültürlerin yetiştirilmesinde kesikli kültür sistemi kullanılmış ve bütün testler üç paralelli olarak yapılmıştır.

Tablo 2. BG 11 ve Allen Besi ortamlarının kimyasal kompozisyonları

Makroelementler	Besi Ortamı Kompozisyonu		
	BG 11 (g/L)	ALLEN (g/L)	(ml)
NaNO ₃	1,5	1,5 g	
K ₂ HPO ₄	0,04	-	
K ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	-	6 g/L	5 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,075	6 g/L	5 ml
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,036	2,5 g/L	10 ml
Citric acid	0,006	4,8 g/L	1 ml
Ferric ammonium citrate	0,006	-	
EDTA (disodium salt)	0,001	-	
Na ₂ CO ₃	0,02	4 g/L	5 ml
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	-	4,64 g/L	10 ml
Trace metal miks A5	1.0 ml	-	
P-IV metal solüsyonu	-	1 ml	
Distile su	1.0 L	200 ml	
Trace Metal miks A5		P-IV metal solüsyonu	
H ₃ BO ₃	2,86	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0,75 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,81	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,041 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,222	ZnCl ₂	0,005 g
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,39	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,097 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,079	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,004 g
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	49,4	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,002 g
Distile su	1.0 L	Distilled water	1.0 L

2.2 Mikroalg üremesinin tespiti

Chlamydomonas suşlarının toplam üreme miktarları hücre sayımları, klorofil-a, kuru ağırlık ve optikal yoğunluk tayini ile tespit edilmiştir. Hücre yoğunluğu (hücre/mL) Thoma lamında 16 kareye düşen hücrelerin sayılmasıyla yapılmıştır. Hücre sayımı ve optik yoğunluk ekim anında, 1, 3, 5, 8, 10, 12 ve 15. günlerde gerçekleştirilmiştir. Hücre yoğunlukları aşağıda verilen eşitlik (2.1)'e göre hesaplanmıştır [16]:

$$HY = \frac{T \times 4000}{16} \quad (2.1)$$

(T: 16 kareye düşen toplam hücre sayısı; 4000: bir karenin hacmi)

Mikroalg örneklerin biyokütlesinin klorofil-a tayinleri 15. günün sonunda, metanol metodu kullanılarak yapılmıştır [17]. Önceden kurutulmuş ve tartılmış cam elyaf filtresinden (Whatman GF/C) 10 mL mikroalg kültürü süzülüş, 105°C'de 24 saat kurutulmuş ve kuru ağırlık tayini gerçekleştirilmiştir [18]. Maksimum absorban, spektrofotometre (Biochrom Libra S22) kullanılarak, kültür örneğinin 600 ila 800 nm arasında taranması ile incelenmiştir [19]. Optikal yoğunluk *Chlamydomonas* (CCA02Chl01) ve (CCA02Chl02) suşları için 685 nm olarak tespit edilmiştir. Doğrusal regresyon denkliği, optik yoğunluk ile hücre yoğunluğu arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla elde edilmiştir [20]. Üreme kinetikleri kullanılarak spesifik üreme oranı ve hücrelerin ikilenme süreleri eşitlik (2.2) ve (2.3)'teki formüllere göre hesaplanmıştır [21].

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t} \quad (2.2)$$

(μ : Spesifik üreme oranı - X_1 ve $X_2 = t_1$ ve t_2 'deki biyomas konsantrasyonu)

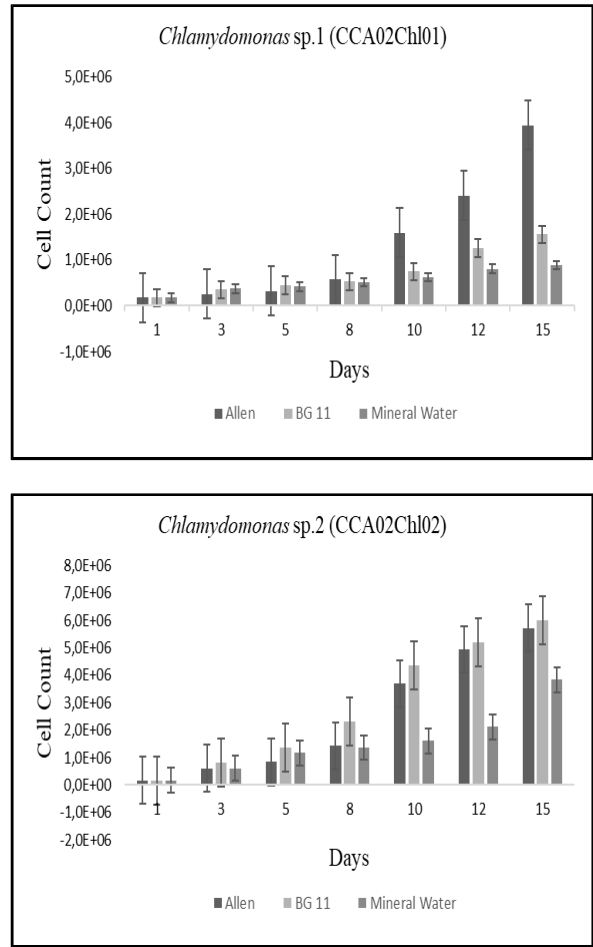
$$DT = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (2.3)$$

(DT: İkilenme süresi)

3. Sonuçlar

Chlamydomonas, Chlorophyceae sınıfına mensup olup, ~10 mikron çapında, tek hücreli, ökaryotik yeşil algdir. *Chlamydomonas* biflagellate, ellipsoidal, tek ya da büyük bir parietal kloroplasta sahip ve küresel hücre

şekline sahiptir [22,23]. Bu çalışmada, *Chlamydomonas* (CCA02Chl01) ve (CCA02Chl02) suşlarının farklı kültür besi ortamındaki hücre sayısı, klorofil-a, optik yoğunluk ve kuru ağırlığın tespit edilmesi amaçlanmış, benzer başlangıç inokulumları tüm kültür koşullarına uygulanmasına rağmen farklı büyüme oranları gözlenmiştir. *Chlamydomonas* (CCA02Chl01) ve (CCA02Chl02) suşlarının hücre sayımları mikroskop altında gerçekleştirilmiştir (Şekil 1).

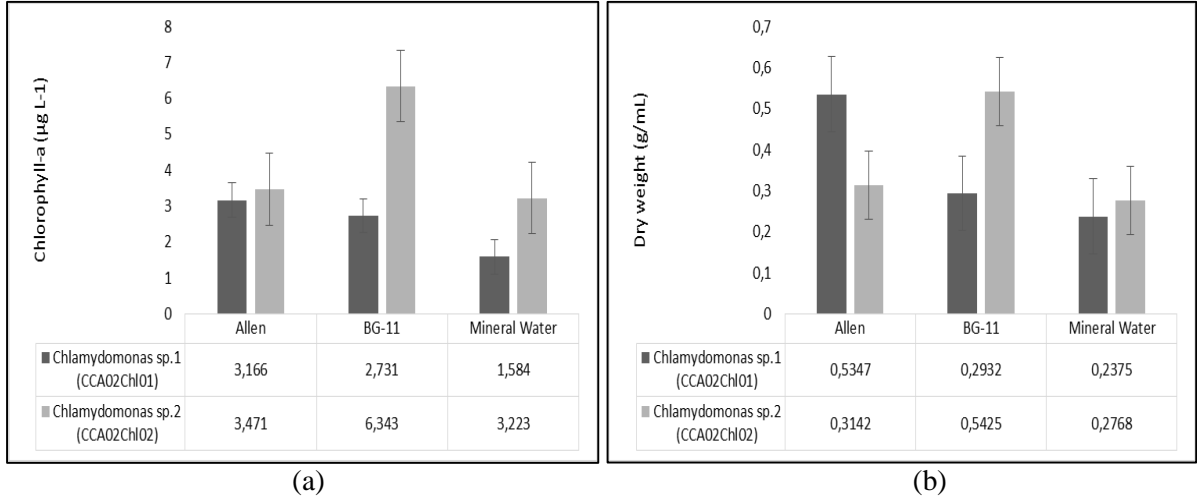


Şekil 1. Hücre yoğunluğu (hücre/mL) *Chlamydomonas* (CCA02Chl01) ve (CCA02Chl02). Hata çubukları $n=3$ için standart sapmayı temsil etmektedir.

Hücre yoğunluğu; *Chlamydomonas* sp.1 (CCA02Chl01) suşu için Allen besi ortamında ($3,95 \times 10^6$ hücre/mL), *Chlamydomonas* sp.2 (CCA02Chl02) suşunda BG 11 besi ortamında ($6,0 \times 10^6$ hücre/mL) maksimum hücre sayısı olarak tespit edilmiştir (Tablo 3). Klorofil-a

içeriği (Şekil 2a) çalışmanın 15. günü yapılmış olup, *Chlamydomonas* sp.1 (CCA02Chl01) suşunda Allen besi ortamında ($3.166 \mu\text{g L}^{-1}$), *Chlamydomonas* sp.2 (CCA02Chl02) suşunda BG 11 besi ortamında ($6.343 \mu\text{g L}^{-1}$) en yüksek olarak ölçülmüştür. 15. günün sonunda en

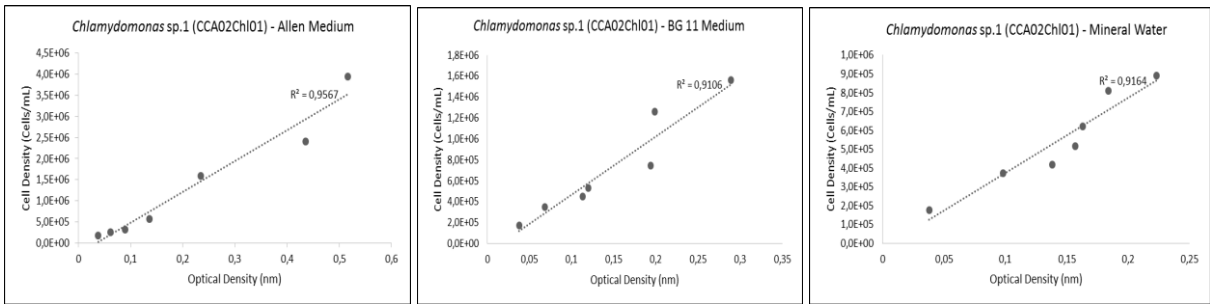
yüksek kuru ağırlık *Chlamydomonas* sp.1 (CCA02Chl01) suşu için Allen besi ortamında (0.5347 g/mL) olarak tespit edilirken, *Chlamydomonas* sp.2 (CCA02Chl02) suşu için en yüksek kuru ağırlık BG 11 besi ortamında (0.5425 g/mL) olarak ölçülmüştür (Şekil 2b).



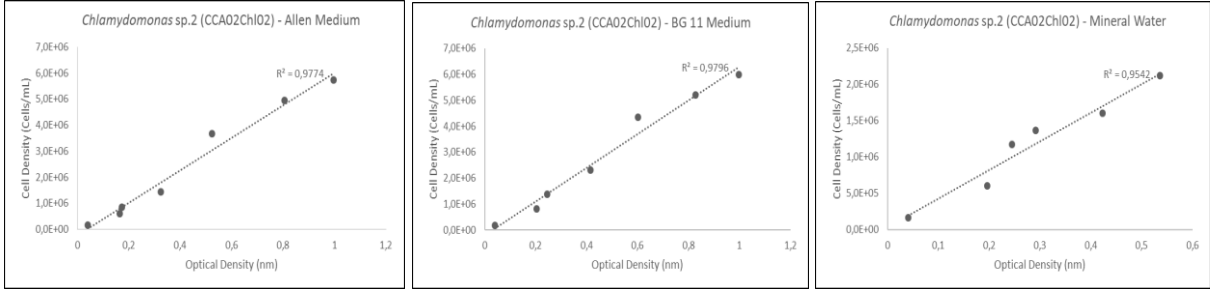
Şekil 2. (a) Klorofil-a ($\mu\text{g L}^{-1}$); (b) kuru ağırlık (g/mL); Hata çubukları $n=3$ için standart sapmayı temsil etmektedir.

Chlamydomonas (CCA02Chl01 ve CCA02Chl02) suşlarının absorbans ve hücre yoğunluğu arasındaki ilişkiye ait kalibre edilmiş veriler aşağıdaki (Şekil 3 ve 4)'te gösterilmiştir. Pearson korelasyon katsayısı kullanılarak, *Chlamydomonas* sp.1 (CCA02Chl01) [Allen ($R^2=0.9567$), BG 11 ($R^2=0.9106$), MS

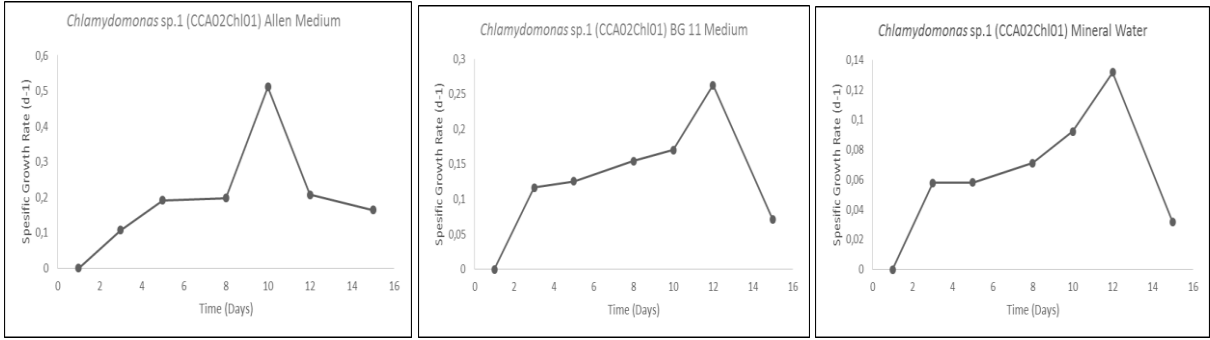
($R^2=0.9164$)] ve *Chlamydomonas* sp.2 (CCA02Chl02) [Allen ($R^2=0.9774$), BG 11 ($R^2=0.9796$), MS ($R^2=0.9542$)] için optik yoğunluk (nm) ve hücre sayısı (hücre/mL) karşılaştırıldığında iyi bir pozitif korelasyon elde edilmiştir (Şekil 3 ve 4).



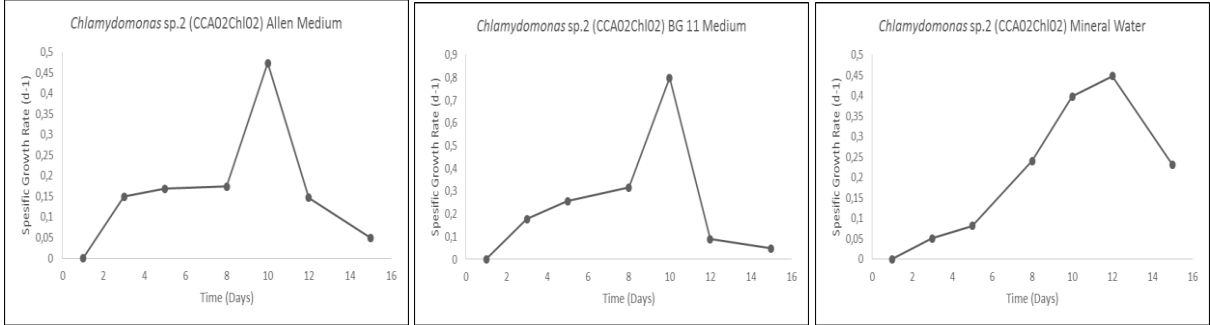
Şekil 3. *Chlamydomonas* sp.1 (CCA02Chl01) farklı besi ortamlarındaki optik yoğunluk ve hücre yoğunluğu arasındaki ilişki için kalibrasyon eğrisi.



Şekil 4. *Chlamydomonas* sp.1 (CCA02Chl02) farklı besi ortamlarındaki optik yoğunluk ve hücre yoğunluğu arasındaki ilişki için kalibrasyon eğrisi.



Şekil 5. *Chlamydomonas* sp.1 (CCA02Chl01)'in Allen, BG11 ve MS için spesifik üreme oranı



Şekil 6. *Chlamydomonas* sp.2 (CCA02Chl02)'in Allen, BG11 ve MS için spesifik üreme oranı

Chlamydomonas sp.1 (CCA02Chl01)' in 683 nm'deki optik yoğunluğu Allen besi ortamında (0.5115 d^{-1}) en yüksek tespit edilirken bu değeri sırasıyla BG 11 besi ortamı (0.2627 d^{-1}) ve MS (0.1316 d^{-1}) takip etmiştir. BG 11 ortamında yetiştirilen *Chlamydomonas* sp.2

(CCA02Chl02)'nin 685 nm'deki optikal yoğunluğu (0.7986 nm) olarak ölçülürken, bu değeri sırasıyla Allen medium (0.4734 nm) ve MW (0.4476 nm) izlemiştir (Şekil 5, 6 ve Tablo 3).

Tablo 3. *Chlamydomonas* (CCA02Chl01) ve (CCA02Chl02) suşlarının üreme performansları

Suşlar	[max] (hücre/mL)	[max] abs	[max] (d)	μ (d ⁻¹)	dt (d)
CCA02Chl01- Allen	3,95x10 ⁶ ± 1,37x10 ⁶	0.516 ± 0.0142	10	0.5115	1.355
CCA02Chl01- BG 11	1,56x10 ⁶ ± 1,60x10 ⁵	0.289 ± 0,0123	12	0.2627	2.638
CCA02Chl01- MW	8,91x10 ⁵ ± 8,95x10 ⁴	0.223 ± 0.0023	12	0,1316	5,2653
CCA02Chl02- Allen	5,72x10 ⁶ ± 3,20x10 ⁵	0.997 ± 0,0094	10	0,4734	1,4641
CCA02Chl02- BG 11	6,0x10 ⁶ ± 9,05x10 ⁵	0.997 ± 0,0072	10	0,7986	0,8679
CCA02Chl02- MW	3,84x10 ⁶ ± 1,08x10 ⁶	0.575 ± 0.0119	12	0,4476	1,5486

(abs: absorbans; d: gün; μ : spesifik üreme oranı; dt: ikilenme süresi)

4. Tartışma

Mikroalg kültürlerinde dört büyüme eğrisi görülmektedir. Stok kültürlerden alınan ve yeni bir kültür ortamına aşılana hücrelerin ortama uyum sağlaması gerekir. Dolayısıyla, birkaç saat boyunca hücre bölünmesi olmaz ve bu aşama giriş veya indüksiyon aşaması olarak bilinir. Hücreler ortama alıştığında çoğalma başlar ve kültür maksimum konsantrasyonuna 12-18 saat içinde ulaşır. Bu faz üstel faz olarak bilinir. Bu evrede hücreler eşit ve ardıl zaman aralıklarında logaritmik olarak artmaktadır. Hücreler maksimum konsantrasyona ulaştığında, hücrelerin büyümesi ve çoğalması yavaş yavaş azalma durumu gösterir. Bu evre, yavaşlayan evre olarak bilinir. Durgun fazdaki kültürlerde net üreme sıfırdır ve belli saatler içinde hücreler biyokimyasal değişim geçirirler. Ölüm fazında, vejetatif hücre metabolizması uzun süre iyi durumda tutulamaz ve bu faz çok hızlı bir şekilde gerçekleşir. Besleyici tuzların azalması, oksijen eksikliği, aşırı ısınma ve pH değişimleri kültürün bozulmasına neden olan faktörler arasındadır [24,25]. Çalışmamızda üç farklı besi ortamında iki *Chlamydomonas* suşunun üremeleri sırasında dört büyüme fazı görülmektedir (Şekil 5 ve 6). *Chlamydomonas* sp.1 (CCA02Chl01) ve *Chlamydomonas* sp.2 (CCA02Chl02) suşlarının başlangıç ekimlerinde inokulum miktarı aynı tutulmaya çalışılmıştır. Başlangıç hücre sayısı ve optik yoğunluk *Chlamydomonas* sp.1 (CCA02Chl01) için (~1,75x10⁵ hücre/mL; 0,038 nm), *Chlamydomonas* sp.2 (CCA02Chl02) için (~1,65x10⁵ hücre/mL; 0,041 nm) olarak tespit edilmiştir. *Chlamydomonas* sp.1 (CCA02Chl01) suşunda Allen besi ortamında 10. günde, BG 11 ve MS'da 12. günde maksimum üreme oranına ulaşmıştır. *Chlamydomonas* sp.2 (CCA02Chl02) suşunda Allen ve BG 11 besi ortamında 10.

günde, MS'da ise 12. günde maksimum üreme oranı gerçekleşmiştir (Tablo 3).

Besin varlığı, sıcaklık, ışık şiddeti, pH ve tuzluluk mikroalg büyüme, üreme ve morfolojinin başlıca belirleyicileridir. Mikroalglerin üremesini ve gelişmesini düzenleyen en önemli parametrelerinden biri besin miktarı ve kalitesidir. Laboratuvar koşullarında mikroalglerin yetiştirilmeleri ve büyümeleri için söz konusu besleyici maddelerin tümünün uygun konsantrasyonda sağlanması gerekmektedir. Üreme ortamlarında azot, fosfor, sülfür ve iz element kaynaklarının varlığı mikroalglerin üremeleri için önem taşımaktadır [26,27]. Azot, algal hücrelerdeki tüm yapısal ve fonksiyonel proteinlerin vazgeçilmez unsurudur. Fosfor, mikroalglerin büyümesi ve gelişimi için gerekli olan birçok yapısal ve fonksiyonel bileşenleri (nükleik asitler ve fosfolipidler) oluşturur. Sülfür ağırlıklı olarak proteinlerde ve çeşitli koenzimlerde bulunan önemli bir elementtir [12]. Denemelerimiz sırasında kullandığımız sentetik besi ortamlarındaki azot kaynakları NaNO₃, ferric ammonium citrate (C₆H₈FeNO₇) ve EDTA (C₁₀H₁₆N₂O₈); fosfor kaynağı K₂HPO₄ ve sülfür kaynağı MgSO₄·7H₂O'dür. Farklı besi ortamlarının etkileri hücre yoğunluğu, klorofil-*a* ve kuru ağırlık bakımından (Şekil 1 ve 2)'de görülmektedir. Besi ortamlarının yanı sıra suşlar arasındaki üreme farklılıkları da tespit edilmiştir. Alg konsantrasyonunun ölçülmesinde doğrudan hücre sayımı, klorofil içeriği ölçümü ve absorbans veya bulanıklık sayısal korelasyonları en çok kullanılan metotlardır [20]. Önemli bir biyokütle parametresi olan hücre yoğunluğu *Chlamydomonas* sp.1 (CCA02Chl01) suşunda en yüksek Allen besi ortamında (3,95x10⁶ hücre/mL) tespit edilirken onu sırasıyla BG 11 besi ortamı (1,6x10⁶ hücre/mL) ve MS (8,91x10⁵ hücre/mL) izlemiştir. *Chlamydomonas* sp.2 (CCA02Chl02) suşunda hücre yoğunluğu en

yüksek BG 11 besi ortamında ($6,0 \times 10^6$ hücre/mL) bulunurken, bu değeri sırasıyla Allen besi ortamı ($5,72 \times 10^6$ hücre/mL) ve MS ($3,8 \times 10^6$ hücre/mL) takip etmiştir. 15. günde, Allen ortamında yetiştirilen *Chlamydomonas* sp.1'in (CCA02Chl01) kuru ağırlığı ($0,5347$ g/mL), BG 11 ($0,2932$ g/mL) ve MS ($0,2375$ g/mL) ile karşılaştırıldığında en yüksek değer olarak bulunmuştur (Şekil 2b). *Chlamydomonas* sp.2 (CCA02Chl02) için en yüksek kuru ağırlık BG 11 besi ortamında tespit edilirken ($0,5425$ g/mL), bu değeri sırasıyla Allen besi ortamı ($0,3142$ g/mL) ve MS ($0,2768$ g/mL) takip etmiştir (Şekil 2b). Kültürlerimizin hücre yoğunlukları için elde ettiğimiz sonuçlar Taghavi ve Robinson [28] ile Kropat ve ark. [29]'nın kontrollü koşullar altında ve farklı besi ortamlarında *Chlamydomonas* suşlarının gelişimi üzerine yaptıkları çalışmalarla benzer sonuçları taşımaktadır. Çalışmamıza benzer şekilde, Chen ve Johns [30] test ettikleri besi ortamından ($0,84$ g/L ve $1,5$ g/L) arasında kuru ağırlık elde etmişlerdir. Çalışmamızda elde ettiğimiz kuru ağırlık değeri Bhamawat [12]'ın yaptığı benzer çalışmada elde ettiği değerden ($0,071$ g/L) daha yüksek bulunmuştur.

Klorofil-*a* miktarı, hücre yoğunluğu ve kuru ağırlık miktarı ile orantılı olarak tespit edilmiştir. *Chlamydomonas* sp.1 (CCA02Chl01) suşunda klorofil-*a* miktarı BG 11 ($2,731$ μgL^{-1}) ve MS ($1,584$ μgL^{-1}) ile kıyaslandığında en yüksek Allen besi ortamında ($3,166$ μgL^{-1}) bulunmuştur. *Chlamydomonas* sp.2 (CCA02Chl02) suşunda klorofil-*a* miktarı Allen ($3,471$ μgL^{-1}) ve MS ($3,223$ μgL^{-1}) ile kıyaslandığında en yüksek BG 11 ($6,343$ μgL^{-1}) besi ortamında tespit edilmiştir. Therien ve ark. [31] ile Wu ve ark. [32] tarafından *Chlamydomonas reinhardtii*'nin farklı besi ortamları kullanılarak üretilmeleri üzerine yaptıkları çalışmada, klorofil üretimlerinin besi ortamlarına göre farklılık gösterdiklerini belirtmişlerdir. Sonuçlardan da görüleceği gibi *Chlamydomonas* sp.2 (CCA02Chl02) suşunda hücre yoğunluğu, kuru ağırlık ve klorofil-*a* miktarı BG 11 besi ortamında daha yüksek çıkarken *Chlamydomonas* sp.1 (CCA02Chl01) suşunda Allen besi ortamından daha iyi sonuç alınmıştır. BG 11 ve Allen besi ortamının *Chlamydomonas* suşlarının üretilmesinde kullanılmasının nedeni, pek çok mikroalg türünün üretilmesinde bu besiyerlerinden başarılı sonuçların alınmış olmasıdır. Al-Shatri ve ark.

[33] tarafından farklı besin ortamlarının *Scenedesmus dimorphus*'un hücre sayısını artırma çalışmasında, BG 11 besi ortamının Bold's Basal Medium'a göre daha başarılı sonuç verdiği gösterilmiştir. *Lyngbya bipunctata* üzerinde yapılan çalışmada, farklı besin ortamının etkisi araştırılmış, BG 11 ve Allen besin ortamının yaş ve kuru ağırlık ile karotenoid miktarını arttırdığı belirlenmiştir [34]. Farklı mikroalg türleri üzerinde yapılan çalışmalar, mikroalgların kültürlenmesinde BG 11 ve Allen besin ortamının etkili olduğunu ortaya çıkarmıştır. MS ile yapılan denemelerde her iki suşta da en düşük değerler elde edilmiştir. Mineralli su ile yapılan denemeler sırasında, kültürlerin başlangıçta oldukça hızlı üredikleri tespit edilirken sonraki günlerde minerallerin tükenmesi ile hücre yoğunluğunun giderek yavaşladığı gözlenmiştir.

Optik yoğunluk, mikroalgal biyokütle büyümesinin kontrolü ve ortamdaki hücre sayısı ile doğrudan ilişkisi nedeniyle çok kullanılan bir metottur [19,20]. Spektrofotometrik absorbans ölçümünde 680 ve 687 nm en çok kullanılan dalga boyudur [20,35]. Çalışmamızda *Chlamydomonas* (CCA02Chl01) ve (CCA02Chl02) suşları için en yüksek absorbans 685 nm'de saptanmıştır. Her bir besi ortamındaki maksimum büyüme oranı μ (d^{-1}) ve ikilenme zamanı dt (d), hesaplanarak (Şekil 5 ve 6) ve (Tablo 3)'te verilmiştir. Suşların büyüme performansı besi ortamı bileşenlerinden etkilenmiştir. Kesikli kültür şartları altında test edilen *Chlamydomonas* sp.1 (CCA02Chl01) suşu için diğer iki kültür besi ortamı ile karşılaştırıldığında, Allen besi ortamında daha yüksek spesifik büyüme oranını ($0,5115$ d^{-1}) meydana gelmiştir. *Chlamydomonas* sp.2 (CCA02Chl02) suşu için BG 11 ortamında spesifik büyüme oranı ($0,7986$ d^{-1}) ve ikilenme süresinin ($0,8679$ d) olduğu bulunmuştur. Elde ettiğimiz spesifik üreme oranı sonuçları Kropat ve ark. [29] tarafından yapılan, *Chlamydomonas reinhardtii*'nin üretiminde mineral besleyici bileşenlerin biyomas ve spesifik üreme oranı üzerine etkilerinin araştırması çalışması ile paralellik taşımaktadır. Fischer ve ark. [36] tarafından farklı fizyolojik parametreler kullanılarak yapılan çalışmada, spesifik üreme oranları Tris-acetate-phosphate medium da ($0,074$ h^{-1}) ve high salt medium da ($0,039$ h^{-1})

olarak bulunmuştur. Bizim elde ettiğimiz sonuçlar bu çalışma ile kıyaslandığında daha yüksektir.

Chlamydomonas ekonomik değeri yüksek ve bilimsel çalışmalarda en çok kullanılan mikroalglerden birisidir. Bu çalışmada, *Chlamydomonas* suşlarının gelişimi üzerindeki Allen, BG 11 besi ortamları ile doğal maden suyunun etkisi araştırılmıştır. BG 11 ortamının *Chlamydomonas* sp.2 (CCA02Ch102), Allen besi ortamının *Chlamydomonas* sp.1 (CCA02Ch101) suşunun gelişiminde daha etkili olduğu görülmüştür. Ucuz ve bol bir kaynak olarak doğal mineralli suyun kullanılması türlerin üretilmesi için denenmiş ve yapılan denemelerde kültürlerin başlangıçta oldukça hızlı üredikleri tespit edilmiş ancak ortamda minerallerin tükenmesi ile hücre yoğunluğunun giderek yavaşladığı gözlenmiştir. Doğal mineralli suyun mikroalg üretilmesinde kullanılmasının faydalı olabileceği düşünülmeyle birlikte mineralli suda mikroalg yetiştirme prosesinin geliştirilmesi gerektiği gözlenmiştir.

5. Kaynaklar

- Lewis, M.A. (1995). Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review. *Environmental Pollution*, **87**: 319-336.
- Fuentes-Grünwald, C., Alacid, E., Garcés, E., Rossi, S. and Camp, J. (2012). Biomass and lipid production of dinoflagellates and raphidophytes in indoor and outdoor photobioreactors. *Marine Biotechnology*, **15**: 37-47.
- Santhosh, S., Dhandapani, R. and Hemalatha, N. (2016). A Review on potential biotechnological applications of microalgae. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **6**: 179-184.
- Chuntapa, D., Powtongsook, S. and Menasveta, P. (2003). Water quality control using *Spirulina platensis* in shrimp culture tanks. *Aquaculture*, **220**: 355-366.
- Brown, M. and Robert, R. (2002). Preparation and assessment of microalgal concentrates as feeds for larval and juvenile pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, **207**: 289-309.
- Stephens, E., Ross, I.L., Mussgnug, J.H., Wagner, L.D, Borowitzka, M.A., Posten, C., Kruse, O. and Hankamer, B. (2010). Future prospects of microalgal biofuel production systems. *Trends Plant Science*, **15**: 554-564.
- Gross, C.H., Ranum, L.P.W. and Lefebvre, P.A. (1988). Extensive restriction fragment length polymorphisms in a new isolate of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Current Genetics*, **13**:503-508.
- Scholz, M., Hoshino, T., Johnson, D., Riley, M.R. and Cuello, J. (2011). Flocculation of wall-deficient cells of *Chlamydomonas reinhardtii* mutant cw15 by calcium and methanol. *Biomass and Bioenergy*, **35**: 4835-4840. doi: 10.1016/j.biombioe.2011.08.020.
- Duong, V.T., Li, Y., Nowak, E. and Schenk, P.M. (2012). Microalgae isolation and selection for prospective biodiesel production. *Energies*, **5**: 1835-1849. doi:10.3390/en5061835.
- Tamburic, B., Zemichael, F.W., Maitland, G.C. and Hellgardt, K. (2012). Effect of the light regime and phototrophic conditions on growth of the H2-producing green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Energy Procedia*, **29**: 710-719. doi: 10.1016/j.egypro.2012.09.083.
- Merchant, S., Prochnik, S., Vallon, O., Harris, E., Karpowicz, S., Witman, G., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L. and Marechal-Drouard, L. (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, **318**: 245-250.
- Bhamawat, P.M. (2010). Growth of *Chlamydomonas reinhardtii* under nutrient-limited conditions in steady-state bioreactors. Master of Science Thesis. Faculty of the Graduate School of Cornell University, p: 1-83.
- Meslet-Cladiere, L., and Vallon, O. (2011). Novel shuttle markers for nuclear transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell*, **10**: 1670-1678.
- Duygu Yalçın, D., Erkaya Açıkgoz, İ. and Özer, T. (2018). Investigating the effect of different growth media on biomass production of *Pseudopediastrum boryanum* (Turpin) E. Hegewald isolates. *Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research*, **4**: 6-12.
- Parvin, M., Zannat, M.N. and Habib, M.A.B. (2007). Two important technique for isolation of microalgae. *Asian Fisheries Science*. **20**: 117-124.
- Guillard, R.R.L., Sierachiki, M.S. (2005). Counting cells in cultures with the light microscope. Pp. 239-252. In: Andersen, R.A. (eds) *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press, London, 589 pp.
- Hipkins, M.F. and Baker, N.R. (1986). *Photosynthesis: Energy Transduction: A Practical Approach*. Oxford University Press, London, 212 pp.
- Chia, M.A., Lombardi, A.T. and Melao, M.G.G. (2013). Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* **85**: 1427-38. doi: 10.1590/0001-3765201393312.

19. Santos-Ballardo, D.U., Víctor Hernández, S.R., Gómez R.V., Rendón-Unceta, M.C., Corrales, J.C. and Valdez-Ortiz, A. (2015). A simple spectrophotometric method for biomass measurement of important microalgae species in aquaculture. *Aquaculture*, **448**: 87-92.
20. Ribeiro-Rodrigues, L.H., Arenzon, A., Raya-Rodriguez, M.T. & Fontoura, N.F. (2011). Algal density assessed by spectrophotometry: a calibration curve for the unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, **3**: 225-228.
21. Godoy-Hernández, G. and Vázquez-Flota, F.A. (2006). Growth measurements: estimation of cell division and cell expansion. Pp. 51-58. In: Loyola-Vargas, V.M. & Vázquez-Flota, F. (eds) *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., New Jersey, 318 pp.
22. Lemaire, S., Collin, V., Keryer, E., Issakidis-Bourguet, E., Lavergne, D., and Miginiac-Maslow, M. (2003). *Chlamydomonas reinhardtii*: a model organism for the study of the thioredoxin family. *Plant Physiology and Biochemistry*, **41**: 513-521.
23. Mayfield, S., Manuell, A., Chen, S., Wu, J., Tran, M., Siefker, D., Muto, M., & Marin-Navarro, J. (2007). *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories. *Current Opinion in Biotechnology*, **18**: 126-133. doi:10.1016/j.copbio.2007.02.001.
24. Michelle, A., Everroad, R.C. and Wingard, L.M. (2005). Measuring Growth Rates in Microalgal Cultures. Pp. 269-287. In: Andersen, R.A. (eds). *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press, London, 589 pp.
25. Ammar, S.H. (2016). Cultivation of microalgae *Chlorella vulgaris* in airlift photobioreactor for biomass production using commercial NPK nutrients. *Al-Khwarizmi Engineering Journal*, **12**: 90- 99.
26. Deng, X., Zhou, Y., Li, Y. and Fei, X. (2012). Optimization of the culture conditions of a *Chlamydomonas* high oil content ultraviolet mutant CC124-M25 and polymorphism analysis by inter-simple sequence repeat (ISSR). *African Journal of Microbiology Research*, **6**: 3604-3619.
27. Blair, M.F., Kokabian, B. and Gude, V.G. (2013). Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, **2**: 665-674. doi:10.1016/j.jece.2013.11.005
28. Taghavi, N. and Robinson, G. (2016). Improving the optimum yield and growth of *Chlamydomonas reinhardtii* CC125 and CW15 using various carbon sources and growth regimes. *African Journal of Biotechnology*, **15**: 1083-1100.
29. Kropat, J., Hong-Hermesdorf, A., Casero, D., Ent, P., Castruita, M., Pellegrini, M., Merchant, S.S. and Malasarn, D. (2011). A revised mineral nutrient supplement increases biomass and growth rate in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal*, **66**: 770-780.
30. Chen, F., and Johns, M. (1996). Relationship between substrate inhibition and maintenance energy of *Chlamydomonas reinhardtii* in heterotrophic culture. *Journal of Applied Phycology*, **8**: 15-19.
31. Therien, J.B., Zadvornyy, O.A., Posewitz, M.C., Bryant, D.A. and Peters, J.W. (2014). Growth of *Chlamydomonas reinhardtii* in acetate-free medium when co-cultured with alginate-encapsulated, acetate-producing strains of *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Biotechnology for Biofuels*, **7**: 1-8. doi: 10.1186/s13068-014-0154-2.
32. Wu, Y., Li, P. and Zhao, X. (2007). Effect of fluoride on carbonic anhydrase activity and photosynthetic oxygen evolution of the algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Fluoride*, **40**: 51-54.
33. Al-Shatri, A.H.A., Ali, E., Al-Shorgani, N.K.N. and Kalil, M.S. (2014). Growth of *Scenedesmus dimorphus* in different algal media and pH profile due to secreted metabolites. *African Journal of Biotechnology*, **13**:1714-1720. doi:10.5897/AJB2013.13455.
34. Nehul, J.N. (2014). Influence of various culture media on growth and production of carotenoids in a cyanobacterium *Lyngbya bipunctata* Lemm. *Bioscience Discovery*, **5**:60-63.
35. Havlik, I., Lindner, P., Scheper, T. and Reardon, K.F. (2013). On-line monitoring of large cultivations of microalgae and cyanobacteria. *Trends Biotechnology*, **31**: 406-414.
36. Fischer, B.B., Wiesendanger, M. & Eggen, R.I.L. (2006). Growth condition-dependent sensitivity, photodamage and stress response of *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to high light conditions. *Plant and Cell Physiology*, **47**: 1135-1145.