



**T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**FARKLI AZOT VE FOSFOR
KONSANTRASYONLARININ *ACUTODESMUS*
DESERTICOLA MİKROALGİNİN KÜLTÜR
BÜYÜMESİ VE BİYOKİMYASAL KOMPOZİSYONU
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Samet KÖSEL

BURDUR, 2023

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI AZOT VE FOSFOR
KONSANTRASYONLARININ *ACUTODESMUS*
DESERTICOLA MİKROALGİNİN KÜLTÜR
BÜYÜMESİ VE BİYOKİMYASAL KOMPOZİSYONU
ÜZERİNE ETKİLERİ

Samet KÖSEL

Danışman: Doç. Dr. Füsun AKGÜL

BURDUR, 2023

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum **“Farklı azot ve fosfor konsantrasyonlarının *Acutodesmus deserticola* türünün kültür büyümesi ve biyokimyasal kompozisyonu üzerine etkileri”** başlıklı bu tezin;

- Kendi çalışmam olduğunu,
- Sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi,
- Bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi,
- Kullandığım verilerde değişiklik yapmadığımı,
- Tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı,
- Bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı,

bildirir, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

06. / 01/ 2023

(İmza)

Samet KÖSEL

TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan değerli Danışman hocam Doç. Dr. Füsun AKGÜL'e teşekkürlerimi sunarım. Deneylerimi yapmam için laboratuvarlarını bana açan ve araştırmalarımnda hiçbir yardımı esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Rıza AKGÜL ve Doç. Dr. Ülkü BAYHAN'a teşekkür ederim.

Antimikrobiyal analiz ve yağ asitleri analizleri için hiçbir desteğini eksik etmeyen Öğr. Gör. Dr. Ali KIYAK ve Öğr. Gör. Orhan YAVUZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmalarım sırasında yardımlarını gördüğüm laboratuvar arkadaşım Simge BULUT'a teşekkür ederim.

Tez yazımı aşamasında desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen arkadaşlarım; Zeynep EREN, İnanç YILMAZ, Büşra ALADAĞ, Nagehan GÜL ve Yakuphan BAYKAN'a teşekkür ederim.

2021-YL-0784 No`lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Eğitim hayatımın her aşamasında beni her anlamda destekleyen aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Ocak, 2023

Samet KÖSEL

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL DİZİNİ	iv
ÇİZELGE DİZİNİ	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ÖZET	viii
SUMMARY	ix
1. GİRİŞ	10
2. GENEL BİLGİLER	12
2.1. Mikroalgler	12
2.2. Mikroalglerin Biyoteknolojideki Kullanım Alanları	15
2.2.1. Mikroalglerin Biyoyakıt Üretiminde Kullanımı	16
2.2.2. Mikroalglerin Biyogübre Üretiminde Kullanımı	17
2.2.3. Mikroalglerin İnsan Gıdası Üretiminde Kullanımı	18
2.2.4. Mikroalglerin Atık Su Arıtımında Kullanımı	19
2.2.5. Mikroalglerin Kozmetik Alanında Kullanımı	21
2.2.6. Mikroalglerin Hayvan Yemi Olarak Kullanımı	22
2.3. Mikroalglerin Ürettiği Değerli Metabolitler	23
2.3.1. Birincil (Primer) Metabolitler	23
2.3.2. İkincil (Sekonder) Metabolitler	24
2.4. Mikroalg Kültüründe Kullanılan Stres Parametreleri	25
2.4.1. Besin tuzları (Nutrient)	25
2.4.2. Işık Şiddeti	27
2.4.3. Sıcaklık	27
2.4.4. pH	28
2.4.5. Tuzluluk	29
3. MATERYAL VE METOT	35
3.1. Mikroalgin Temini ve Kültürü	35
3.2. Hücre Sayısının Belirlenmesi	38
3.3. Optik Yoğunluğun Belirlenmesi (OD)	38
3.4. Kuru Biyokütle Ağırlık Tespiti	38
3.5. Spesifik Büyüme Oranı ve İkiye Katlanma Süresi	38
3.6. Klorofil-a Miktarının Tespiti	39
3.7. Toplam Protein Tayini	39
3.8. Amino Asit Analizi	40
3.9. Ham Yağ Analizi (Soxhlet)	40
3.10. Yağ Asitleri Analizi	40
3.11. Toplam Fenolik Madde Analizi	41
3.12. Antioksidan Aktivite Tayini	41
3.13. Antimikrobiyal Aktivite Tayini (MIC Analizi)	42
3.14. İstatiksel Analiz	43
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	44
4.1. Mikroskopik Gözlem Sonuçları	44
4.2. Kültür Büyüme Parametreleri	47

4.3. Biyokimyasal Analiz Sonuçları	55
4.3.1. Protein ve Amino Asit Analizi sonuçları	55
4.3.2. Yağ ve Yağ Asidi Analizi Sonuçları.....	58
4.3.3. Yağ Asidi Analiz Sonuçları	59
4.3.4. Toplam Fenolik Madde Analizi Sonuçları.....	61
4.3.5. Antioksidan Analiz Sonuçları	62
4.3.6. Antimikrobiyal Analiz Sonuçları	64
5. SONUÇ	67
KAYNAKLAR.....	69



ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Alglerin filogenetik sınıflandırılması (Levasseur vd., 2020).....	13
Şekil 3.1. <i>Acutodesmus deserticola</i> türünün taramalı elektron mikrografları (Özgün fotoğraf, MAKUMACC) ölçek çubuğu: 10 µm;.....	36
Şekil 3.2. <i>Acutodesmus deserticola</i> türünün ışık mikroskobu görüntüleri (Özgün fotoğraf, MAKUMACC) ölçek çubuğu: 10 µm.....	36
Şekil 4.1. <i>Acutodesmus deserticola</i> türünün K grubu ışık mikroskobu görüntüsü (Özgün fotoğraf, MAKUMACC) ölçek çubuğu: 20 µm.....	45
Şekil 4.2. <i>Acutodesmus deserticola</i> türünün N ⁺ grubu ışık mikroskobu görüntüsü (Özgün fotoğraf, MAKUMACC) ölçek çubuğu: 20 µm.....	45
Şekil 4.3. <i>Acutodesmus deserticola</i> türünün N ⁻ grubu ışık mikroskobu görüntüsü (Özgün fotoğraf, MAKUMACC) ölçek çubuğu: 20 µm.....	45
Şekil 4.4. <i>Acutodesmus deserticola</i> türünün P ⁺ grubu ışık mikroskobu görüntüsü (Özgün fotoğraf, MAKUMACC) ölçek çubuğu: 20 µm.....	46
Şekil 4.5. <i>Acutodesmus deserticola</i> türünün P ⁻ grubu ışık mikroskobu görüntüsü (Özgün fotoğraf, MAKUMACC) ölçek çubuğu: 20 µm.....	46
Şekil 4.6. Beş farklı kültür ortamında yetiştirilen <i>Acutodesmus deserticola</i> türünün hücre sayısı değerleri. Hata çubukları, 3 tekrar arasındaki standart sapmayı temsil eder (n=3).	47
Şekil 4.7. Beş farklı kültür ortamında yetiştirilen <i>Acutodesmus deserticola</i> türünün kuru ağırlık değerleri. Hata çubukları, 3 tekrar arasındaki standart sapmayı temsil eder (n=3).	48
Şekil 4.8. Beş farklı kültür ortamında yetiştirilen <i>Acutodesmus</i> türünün 680 nm'deki OD değerleri. Hata çubukları (SD, n=3), 3 tekrar arasındaki standart sapmayı temsil eder (n=3).	49
Şekil 4.9. Beş farklı kültür ortamında yetiştirilen <i>Acutodesmus deserticola</i> türünün klorofil-a değerleri. Hata çubukları, 3 tekrar arasındaki standart sapmayı temsil eder (n=3).	50
Şekil 4.10. Beş farklı kültür ortamından hasat edilen <i>Acutodesmus deserticola</i> türünün % N ve Toplam Protein miktarları (% kuru biyokütle). (Hata çubukları, 3 tekrar arasındaki standart sapmayı temsil eder (n=3), p<0,05).....	56
Şekil 4.11. Beş farklı kültür ortamından hasat edilen <i>Acutodesmus deserticola</i> türünün toplam fenolik madde miktarları (mg GAE/kg kuru biyokütle) (n=3, p<0,05). 61	
Şekil 4.12. Beş farklı kültür ortamından hasat edilen <i>Acutodesmus deserticola</i> türünün DPPH süpürülme aktivitesi sonuçları.....	63

ÇİZELGE DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 3.1. Kontrol grubu, Bold Basal besi ortamının içeriği (Bold, 1966)	37
Tablo 3.2. <i>Acutodesmus deserticola</i> türünün kültür koşulları	37
Tablo.3.3. <i>Acutodesmus deserticola</i> türünün kültürdeki nutrient değerleri ve oranları.....	38
Tablo 4.1. <i>Acutodesmus deserticola</i> mikroalg hücre ve kolonilerinin beş farklı kültür ortamındaki morfolojik özellikleri.....	44
Tablo.4.2. Çalışmada kullanılan 5 farklı kültür ortamının kültür süresi boyunca ölçülen pH değerleri	55
Tablo 4.4. Beş farklı kültür ortamından hasat edilen <i>Acutodesmus deserticola</i> türünün toplam yağ analizi sonuçları (Kuru biyokütledeki %yağ) (Hata çubukları, 3 tekrar arasındaki standart sapmayı temsil eder (n=3), p<0,05)	59
Tablo 4.5. Beş farklı kültür ortamından hasat edilen <i>Acutodesmus deserticola</i> türünün yağ asidi analizi sonuçları (% toplam yağ asidi)	59
Tablo 4.6. Beş farklı kültür ortamından hasat edilen <i>Acutodesmus deserticola</i> türünün IC50 değerleri sonuçları	63
Tablo 4.7. Beş farklı kültür ortamından hasat edilen <i>Acutodesmus deserticola</i> türünün 600 nm'de <i>E. coli</i> antimikrobiyal analizi sonuçları (abs).....	64
Tablo 4.8. Beş farklı kültür ortamından hasat edilen <i>Acutodesmus deserticola</i> türünün 600nm'de <i>S.aureus</i> antimikrobiyal analizi sonuçları (abs)	65
Tablo 4.9. Beş farklı kültür ortamından hasat edilen <i>Acutodesmus deserticola</i> türünün 600 nm'de <i>C. albicans</i> antimikrobiyal analizi sonuçları (abs)	65

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μL	Mikrolitre
μM	Mikromol
AA	Askorbik Asit
ABS	Absorbans
ALA	Alanin
ARG	Arjinin
ASP	Aspartik Asit
BBM	Bold Basal Medium (Bold Bazal Ortamı)
BG-11	Blue- Green 11
BM	Bristol Medium
BOİ	Biyokimyasal Oksijen İhtiyacı
CaCl₂.2H₂O	Kalsyum Klorit Dihidrat
CLSM	Konfokal Lazer Taralamalı Mikroskop
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EPA	Eikosapentaenoik asit
FCM	Akış Sitometrisi
FDA	Food and Drug Administration (Gıda ve İlaç İdaresi)
GLU	Glutamat
GRAS	Genel Olarak Güvenli (Generally Recognised as Safe)
GS-MS	Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
H₃BO₃	Borik Asit
IC₅₀	%50 İnhibition Concentration
JM	Jaworski Medium
K₂HPO₄	Potasyumhidrojen Fosfat
KH₂PO₄	Potasyum Fosfat
Kl-a	Klorofil a
KOİ	Kimyasal Oksijen İhtiyacı
LC-PUFA	Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids (Uzun Zincirli Çoklu Doymamış) Yağ Asitleri

LYS	Lizin
MgSO₄.7H₂O	Magnezyum Sülfat Heptahidrat
MIC	Minimum Inhibitor Concentration (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu)
MS	Kütle Spektrometresi
MUFA	Mono Unsaturated Fatty Acids (Tekli Doymamış Yağ Asitleri)
N	Azot
N⁻	Azot Bakımından Eksik
N⁺	Azot Bakımından Zengin
NaCl	Sodyum Klorür
NaNO₃	Sodyum Nitrat
NM	Nanometre
OD	Optical Density (Optik Yoğunluk)
P	Fosfor
P⁻	Fosfor Bakımından Eksik
P⁺	Fosfor Bakımından Zengin
pH	Potantiel of Hydrogen (Asitlik)
PHE	Fenilalanin
PPT	Binde Bir
RNA	Ribonükleik asit
RPM	Revolutions per Minute (Sabit ekseninde 1 dakikadaki dönüş)
RSA	Radikal Süpürme Aktivitesi
SFA	Saturated Fatty Acids (Doymuş Yağ Asitleri)
STPP	Sodyum Tripolifosfat
TAG	Triasilgliserol
TLC	İnce Tabaka Krom
TRY	Trozin
TWW	Tabakhane Atık Suyu
UV	Ultraviyole
VAL	Valin
VFA	Volatile Fatty Acids (Uçucu Yağ Asitleri)

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Farklı Azot ve Fosfor Konsantrasyonlarının *Acutodesmus deserticola* Türünün Kültür Büyümesi ve Biyokimyasal Kompozisyonu Üzerine Etkileri

Samet KÖSEL

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Füsün AKGÜL

Ocak, 2023

Bu tez çalışmasında *Acutodesmus. deserticola* türü 5 farklı stres koşullarında bold basal ortamında (BBM) 24 gün boyunca kültür büyüme parametreleri açısından incelenmiş ve 24. günün sonunda, farklı kültür ortamlarında en yüksek hücre sayısı değeri K (6100×10^4) grubunda, en düşük hücre sayısı ise N⁻ (405×10^4) grubunda; en yüksek kuru ağırlık değeri K (0,011 mg/L) grubunda, en düşük kuru ağırlık değeri N⁺ (0,0047 mg/L) grubunda; en yüksek OD₆₈₀ (optik yoğunluk) değeri K grubunda (2,139 abs) en düşük OD değeri N⁻ (1,256 abs) grubunda; en yüksek klorofil-a değeri N⁺ (8,660 mg/L) en düşük klorofil a değeri ise N⁻ (1,434 mg/L) grubunda tespit edilmiştir. Biyokimyasal analiz sonuçları değerlendirilirken N⁺ grubunun protein içeriği maksimum değerde (kuru biyokütlenin %8,517'si) görülmüştür. Amino asit sonuçları, Arg ve Lys amino asitleri hariç en yüksek değerler fosforca zengin (P⁺) grupta görülmüştür. Total yağ analizi sonuçlarına bakıldığında en yüksek değerlerin %7,1 ile yüksek azot içeren (N⁺) grupta olduğu gözlenmiştir. Yağ asitleri sonuçları incelendiğinde, azot bakımından kısıtlı grupta (N⁻) (%35,605) linoleik asit seviyesinin kontrol grubuna (%6,814) göre oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Antioksidan aktivite sonuçları, uygulanan tüm stres parametreleri altında DPPH süpürme aktivitesi, 87-700 µg/mL konsantrasyon aralığında 37,61-75,83% scv süpürme aktivitesi gözlenmiştir. Yapılan çalışmanın sonuçları, *A. deserticola* türünün azot ve fosfor konsantrasyonu düşük olan ortamlarda hızlı bir şekilde çoğalabildiğini göstermektedir. Farklı ortamlardaki kültür büyüme parametrelerine bakıldığında klorofil a değeri dışındaki tüm parametreler kontrol grubunda daha yüksek sonuçlar vermiştir. Çalışmanın sonucunda azot ve fosforun ortamdaki varlığı ve yokluğu *A. deserticola* türünün kültür büyüme parametrelerine ve türün biyokimyasal kompozisyonu üzerine farklı etkilerinin olduğunu göstermektedir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular, mikroalglerin biyoteknolojik uygulamalarda optimal kültür koşulları açısından yol gösterici olması düşünülmektedir

Anahtar Kelimeler: Mikroalg, Kültür Büyüme Parametreleri, Biyokimyasal Kompozisyon, Biyoteknoloji

Hazırlanan bu Yüksek Lisans tezi BAP tarafından 0784-YL-21 proje numarası ile desteklenmiştir.

SUMMARY

M. Sc. Thesis

Effects of Different Nitrogen and Phosphorus Concentrations on Culture Growth and Biochemical Composition of *Acutodesmus deserticola* Microalgae

Samet KÖSEL

Burdur Mehmet Akif Ersoy University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Molecular Biology and Genetics Department

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Füsün AKGÜL

January, 2023

In this study, *Acutodesmus deserticola* species were examined in terms of culture growth parameters in bold basal medium (BBM) under 5 different stress conditions for 24 days, and at the end of the 24th day, the highest cell count value was in the K (6100×10^4) group and the lowest cell number was N⁻ (405×10^4) in different culture media. In the group; the highest dry weight value in the K (0.011 mg/L) group, the lowest dry weight value in the N⁺ (0.0047 mg/L) group; highest OD₆₈₀ (optical density) value in K group (2,139 abs) lowest OD value in N⁻ (1,256 abs) group; The highest chlorophyll-a value was found in N⁺ (8,660 mg/L) and the lowest chlorophyll a value was found in the N⁻ (1,434 mg/L) group. The protein content of the N⁺ group was determined at the maximum value (8,517% of the dry biomass) in the results of the biochemical analysis. In amino acid results, except for Arg and Lys amino acids, the highest values are seen in the phosphorus-rich (P⁺) group. As the results of all the oil analyses were analyzed, it was found that the high nitrogen (N⁺) group had the highest values at 7.1%. When the fatty acid results are examined, it is seen that the linoleic acid level in the nitrogen-restricted group (N⁻) (%35,605) is quite high compared to the control group (6,814%). As the phenolic substance analyses were examined, it was noted that the control group had the highest value. As were considered antioxidant activity results, DPPH scavenging activity under all applied stress parameters, 37.61-75.83% scv scavenging activity were observed in the concentration range of 87-700 µg/mL. *A. deserticola* microalgae can grow quickly in environments with low nitrogen and phosphorus concentrations, according to the study's findings. Investigating the culture growth parameters in different media, all parameters except the chlorophyll-a value gave higher results in the control group. The outcomes of the study demonstrate that *Acutodesmus deserticola* has distinct impacts on the culture growth parameters and the biochemical makeup of the species depending on the presence or absence of nitrogen and phosphorus in the medium. The results from this study are expected to play a leading role when considering culture conditions for biotechnological applications of microalgae.

Keywords: Microalgae, Culture Growth Parameters, Biochemical Composition, Biotechnology

The present M.Sc. thesis was supported by BAP Under the Project number of 0784-YL-21

1. GİRİŞ

Algler sucul ortamdan karasal ortamlara kadar çok çeşitli habitatlarda yaşayan, fotosentez ile besin zincirine önemli katkıları bulunan prokaryotik ya da ökaryotik primer üreticilerdir (Prata vd., 2019). Mikroalgler çeşitli sıcaklıkları, tuz konsantrasyonlarını, pH değerlerini ve farklı ışık yoğunluklarını tolere edebilmektedir (Barsanti vd., 2008). Bununla beraber farklı ortam koşullarına bağlı olarak büyüebilmekte ve bunu hem tek başına hem de diğer organizmalarla birlikte simbiyoz halde yapabilmektedir (Khan vd., 2018). Mikroalglerin pek çok çeşidi bulunmakta ve bu çeşitlilik, onlara farklı habitatlarda bulunma ve yaşama şansı vermektedir. Dünya'nın büyük çoğunluğunu oluşturan okyanus ve denizler gibi sucul ortamlarda yoğun hacme sahiplerdir. Sucul besin zincirinin temelini oluşturmasının yanı sıra havadaki oksijenin yaklaşık %70' ini üreterek ekosisteme önemli katkı sağlamaktadırlar. Çoğu mikroalg, fotosentez sırasında sürekli oksijen üretimine yardımcı olan fitokimyasallar içerir. Bu nedenle, mikroalgler oksijen jeneratörleri olarak kabul edilir (Cui vd., 2022).

Günümüzde teknolojinin gelişmesiyle beraber biyoteknolojinin önemi giderek artmaya devam etmektedir (Abu-Ghosh vd., 2021). Mikroalgal üretim ve buna bağlı olarak mikroalg biyoteknolojinin gelişmesinde ciddi bir artış gözlenmektedir. Çok çeşitli ve verimli olan mikroalglerin üretimi laboratuvar ortamında olduğu kadar açık havuzlarda da mümkün hale gelmiştir. Mikroalgler hem açık (dış mekân) hem de kapalı (laboratuvar) alanlarda yetiştirilebilir. Doğal göller, göletler ve her türlü şeffaf plastikten yapılmış havuz ve tanklar, dış mekân üretim sistemleri olarak kabul edilmektedir (Kargın vd., 2020).

Yakın geçmişte artan biyoteknolojik çalışmalara bağlı olarak mikrolaglerin farklı uygulamalarda kullanımı yaygınlaşmıştır. Enerji ihtiyacının artan nüfus ile artmasıyla birlikte biyodizel üretimi amacıyla yüksek lipid konsantrasyonuna sahip *Chlorella vulgaris* ve *Isochrysis* sp. gibi mikroalg türleri kullanılmıştır. Yine mikroalgler, sera gazı emisyonu ve küresel ısınma gibi olumsuz etkiler ile mücadelede önemli bir role sahiptirler (Maity vd., 2014). Bunun yanında, dünyada artan besin ihtiyacına paralel olarak tarımsal faaliyetler de artmaktadır. Ancak, tarım arazilerinin geniş ve engebesiz toprakların üzerine kurulması gerekliliği gıda ürünleri maliyetlerini önemli ölçüde arttırmaktadır (Herrea vd., 2021). Kimyasal gübre kullanımı gibi tarım arazilerinde uygulanan yanlış tarım politikaları, küresel ısınma ve sera gazını salınımını tetikleyen olumsuz etkiler ortaya çıkarmakta hem

sağlığını hem de ekosistemimizi negatif yönde etkilemektedir. Algler hammadde olarak taze, dondurulmuş veya kurutulmuş olarak farklı şekillerde kullanılabilirken, ekstraksiyon yoluyla elde edilen lipit veya formüle edilmiş özütler halinde de diyetlere eklenebilmektedir. Algal ekstraktlarının özellikleri diğer formlardan daha az çalışılmıştır ancak son zamanlarda hayvan sağlığını ve ürün kalitesini iyileştirmesi, biyolojik olarak aktif bileşikler içermeleri nedeniyle mikroalglerle karşı pozitif yönde artan bir ilgi vardır (Coudert vd., 2020). Mikroalg bazlı ürünlerin elde edildiği *Spirulina* sp., *Arthrospira* sp., *Chlorella* sp. ve *Aphanizomenon* sp. mikroalgleri “alg” diyet takviyeleri arasında en yüksek pazar payına sahiptir. *Spirulina* sp. mikroalginden üretilen tablet veya toz halindeki ürünlerin protein içeriği %60–70; karbonhidrat içeriği %14–19; yağ içeriği %8; lif içeriği %3; vitamin içeriği %<1 olduğundan ve yapılarında değerli fitokimyasallar bulundurduklarından gıda takviyesi olarak kullanılmaya uygundurlar (Gouda, 2021). Algal takviye ürünleri ayrıca demir (Fe), kalsiyum (Ca), fosfor (P), potasyum (K), sodyum (Na), magnezyum (Mg) ve eser elementlerin bir kaynağı olarak kabul edilmektedirler (Tokuşoğlu ve Ünal, 2003). Manganez (Mn), çinko (Zn), bakır (Cu), selenyum (Se) ve krom (Cr) dahil yetişkin bir insanın günlük besin ihtiyacının önemli bir miktarını karşılamaktadır (Kejzar vd., 2021).

Mikroalglerin kültürü yapılırken optimum yetiştirme koşulları kullanılabileceği gibi bazı stres koşulları da kullanılabilir. Bu stres koşulları, mikroalglerin ürettiği biyokimyasal maddelerin kompozisyonu, kültürün büyüme hızını ve yaşamlarını sürdürebilmek için ürettiği ikincil metabolitlerin oranını ciddi anlamda etkilemektedir (Prabakaran vd., 2018). Üretilen bu metabolitler hücrelerin bir nevi korunma mekanizmasıdır. Mikroalgleri etkileyen başlıca stres parametreleri ise nutrient (N, P vb.), ışık, pH, tuzluluk gibi faktörlerde yapılan farklı uygulamalardır.

Bu tez çalışmasında, literatürde hakkında kısıtlı bilgi olan *Acutodesmus deserticola* (*Scenedesmaceae*) türünün farklı azot (0,98 mmol/L; 2,94 mmol/L (Kont.); 8,82 mmol/L) ve fosfor (0,573 mmol/L; 1,72 mmol/L (Kont.); 5,16 mmol/L) konsantrasyonları altında kültürü yapılmış ve kültür büyüme parametreleri izlenmiştir. Her modifiye kültürden elde edilen biyokütlenin biyokimyasal kompozisyonu, toplam antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesi ve fenolik madde miktarı araştırılmıştır.

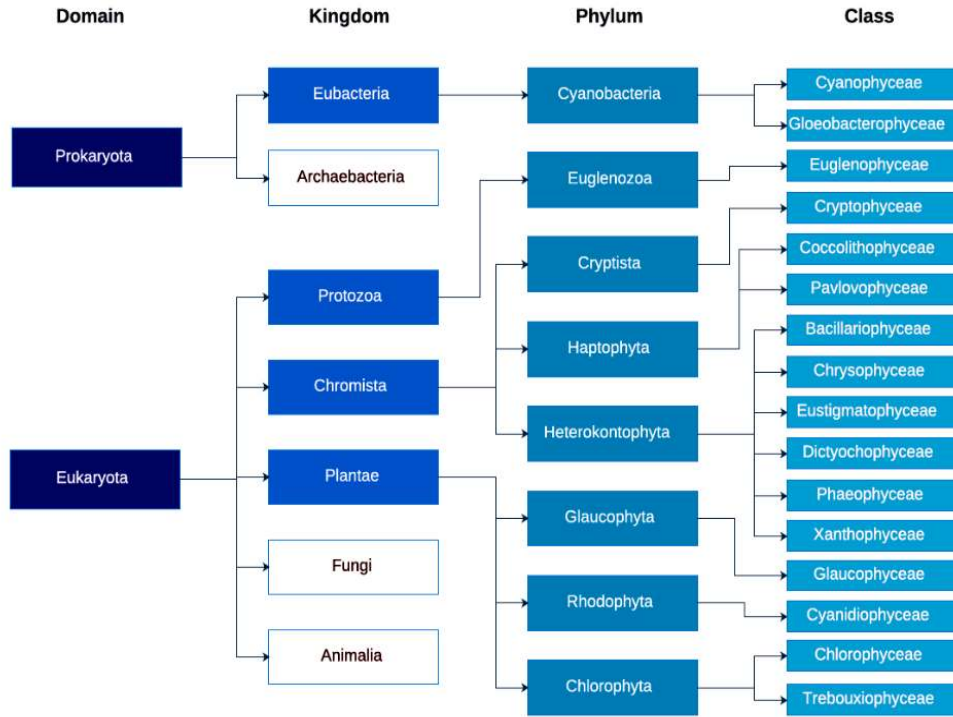
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikroalgler

Algler farklı alemlerde ve buna bağlı farklı alt filumlarda bulunmaktadır. Alg üyelerinin bulunduğu filumlar *Cyanobacteria*, *Euglenozoa*, *Cryptista*, *Haptophyta*, *Heterokontophyta*, *Glaucophyta*, *Rhodophyta* ve *Chlorophyta* filumlarıdır ve **Şekil 2.1.**'de alglerin filogenetik sınıflandırılması gösterilmektedir (Levasseur vd., 2020). Algler, boyutlarına göre makroalg veya mikroalg olarak da sınıflandırılabilir. Makroalgler, çıplak gözle görülebilen çok hücreli, büyük boyutlu alglerdir. Tallusun rengine göre üç büyük ve farklı grupta taksonomik olarak düzenlenirler: *Chlorophyta* (yeşil algler), *Rhodophyta* (kırmızı algler) ve *Phaeophyceae* (kahverengi algler). Bu türler, enerji deposu olarak hücrelerinin iç kısmında nişasta ve büyük moleküler zincirli diğer farklı polisakkaritleri biriktirmektedirler. Yeşil algler ulvan üretir ve pigment olarak karoten, ksantofil ve klorofil a ve b (bitkilerin atası olduğu fikrini destekleyen) içerir (Goiris vd., 2014). Kırmızı algler (en yaygın olarak sıcak denizlerde bulunur) klorofil a ve b ile karotenoidlere sahiptir ve renkli olmaları fikoeritrin (pigment) varlığından kaynaklanır. Kahverengi alglerde fukoksantin pigmentleri, klorofil a, c ve karotenoidler bulunurken yedek besin olarak yağ ve polisakkarit (laminarin gibi) bulunur (Leandro vd., 2019; Barsanti vd., 2014; Vidotti vd., 2004).

Makroalgler, kara bitkilerine benzer ekolojik rollere sahiptir. Bazı makroalg türleri, suyun kalitesinin biyoidikatörleri olarak hizmet edebilir, buna ek olarak, bazıları biyoabsorpsiyon ve biyobirikim yoluyla biyoremediasyon yapabilir (Neveux vd., 2018; Henriques vd., 2017; Yu vd., 2016).

Mikroalgler (prokaryotik ve ökaryotik), tıpkı karadaki bitkiler gibi fotosentez yoluyla büyüyen çok çeşitli ototrofik organizmalardan oluşur. Siyanobakteriler ve ökaryotik bir hücreli mikroorganizmalar mikroalgleri oluşturmaktadır. Tek hücreli yapıları, CO₂'yi yakalamak ve biyokütle depolamak için iyi bir şekilde adapte olmalarını ve güneş enerjisini kolayca kimyasal enerjiye dönüştürmelerine imkân tanımaktadırlar (Marques vd., 2011).



Şekil 2.1. Alglerin filogenetik sınıflandırılması (Levasseur vd., 2020)

Lehninger (1975), siyanobakterilerin evrim sırasında karada bulunan ilk mikroorganizmalar olduğunu; 1883'te Krakatoa Dağı'nda oluşan bir patlama sonrası okyanustaki yaşamın tümüyle yok olmasından sonra oluşan ilk mikroorganizmanın da yine siyanobakteriler olduğunu savunmaktadır (Lehninger, 1975).

Redfield oranı, derin okyanusun kimyası ile yüzey okyanusunda fitoplankton gibi canlıların kimyası arasındaki dikkate değer uyumu keşfetmiştir ((Lenton ve Watson 2000).). Okyanusun kimyası ile yüzey okyanusundaki atomlar açısından yaklaşık 16:1'lik N:P oranlarının olduğu tespit edilmiştir. Besin maddeleri olmadığında fitoplanktondaki element oranı C: N: P 106: 16: 1'olarak belirlemiştir. Redfield, geniş okyanusların canlı organizmaların gereksinimlerine mükemmel şekilde uyan bir kimyaya sahip olmasının tamamen tesadüf olmadığını dile getirmiştir Kontrollü kimyasal koşullar altında yapılan laboratuvar deneyleri, fitoplankton biyokütlesinin, çevresel besin seviyeleri onları aşsa bile Redfield oranına uygun olacağını bulmuştur.

Siyanobakteriler azotu fikse ettiklerinden dolayı bulundukları yerlerde toprakta bulunan azot ve organik madde miktarını arttırmaktadır. Böylelikle toprağın azalan azotu desteklenmekte ve eklenen organik madde de humuslaşarak toprağın su tutma kapasitesini

arttırmakta ve böylece toprağın fiziksel, kimyasal ve biyolojik yapısı düzenlemektedir. Bu şekilde toprak verimliliği artmaktadır (Guo vd., 2020).

Yeşil algler ve karasal bitkiler arasındaki bağlantı, evrimsel filogeninin henüz ortaya çıkmadığı zamanlardan beri bilinmektedir. 1950 yılından itibaren *Chlorophyta* ve karasal bitkilerin monofiletik bir grup olduğu ortaya çıkmıştır (Fang vd., 2018). Fosil verileri, morfolojik ve moleküler verilerin yardımıyla tüm alglerin ve karasal bitkilerin evrimsel bağlantıları ortaya koymaktadır. (Popper vd., 2011; Gensel vd., 2020). 4,65 milyar yıl yaşındaki gezegenimizin ilk atmosferinde oksijen (O_2) bulunmadığı pek çok bilim insanı tarafından fikir birliği ile kabul edilmiştir (Lin vd., 2022). Jeolojik zamanın gidişatı boyunca, atmosferdeki serbest oksijenin çoğu biyolojik aktiviteden kaynaklanmıştır. Böylece atmosferin bileşimindeki değişimler, özellikle de mevcut moleküler oksijen miktarındaki artış, yeni yaşam formlarının ortaya çıkmasını ve çeşitlenmesini mümkün kılan büyük biyolojik değişimleri tetiklemiştir. Bu süreçte en etkili ve en önemli olan ilkel canlı organizmalar, yerkürenin en yaşlı bireyleri olan siyanobakterilerdir. Bu durum 3,5 milyar yıl yaşındaki mikrofosillerden açıkça anlaşılmaktadır (Altermann vd., 2006).

Siyanobakterilerin evrimi sonucunda yerkürede ve ilkin atmosferde değişimler meydana gelmiştir. Gezegenin evrimi süresince siyanobakteriler, aynı hücre ya da aynı koloni içerisinde oksijene duyarlı azot fiksasyonu ve fotosentezin mekanizmasına uyum göstermek için, denizler ve atmosferin değişen oksidasyon durumları ile birlikte evrim geçirmişlerdir (Demolin vd., 2019). İlkin atmosferde oksijen olmadığından, radyasyondan korunabilmek için 3,8milyar yıl önce ilk yaşam belirtileri suyun içinde görülmeye başlamıştır. Denizlerde bol miktarda fotosentetik mikroorganizma, atmosferde ise bol miktarda karbondioksit bulunuyordu. Bu mikroorganizmalar, güneşten gelen enerjiyi kullanarak, karbondioksiti, basit karbonhidratlara dönüştürmüşlerdir. Bu esnada güneşten gelen enerji, karbonhidratların kimyasal bağlarında depolanmış, tepkime ürünü olarak da oksijen açığa çıkmıştır. Bu oksijen atmosfere geçmiş ve orada yavaş yavaş birikmiştir. Böylece, milyonlarca yıl boyunca, atmosferik karbondioksit oranı azalmış, oksijen miktarı ise artmıştır. Atmosferdeki bu oksijenin bir kısmı ozonu (O_3) oluşturmak için birbirleriyle birleşmişlerdir (Berman -Frank vd., 2003).

Yapılan çalışmalara göre yeşil alglerin karasal bitkilerin soyundan ayrılması 425–490 milyon yıl önce gerçekleşmiştir. Stres faktörlerinin çoğaldığı dönemlerde meydana gelen yoğun seçilim baskıları canlıların çeşitlenmesinde itici bir güç olmuştur. Suların gelgitlerle çekildiği Silüriyen çağının şartları, kıyılarda alglerin kuruluğa ve diğer ekstrem koşullara dayanabilecek şekilde seçilmesine neden olurken, çeşitli lagünlerin ve

bataklıkların da yeni habitatlar oluşturmasına izin vermiştir. Bu farklı ekstrem koşullar altında yaşayan algler ciddi bir eşitililiğe sahiptir. Bu eşitlilik de onların çok farklı biyoteknolojik uygulamalarda kullanılması için temel sebeplerindendir (Chapman vd., 1992; McCourt 1995). Mikroalgler denizler ve göllerde birincil üreticiler olarak ilk organik maddeyi üretirler. Mikroalglerin içerisindeki değerli metabolitleri sayesinde sıklıkla ve takviye gıda sektörlerinde değerlendirilmelerinin yansıya içerdikleri pigmentler, yağlar, yağ asitleri, protein polisakkaritleri ile bağışıklığı güçlendirici özelliklerinin olması sebebi ile antioksidan olarak tüketilmektedirler. Son yıllarda, tarıma uygun olmayan alanlarda üretilebilmeleri yıl boyu kültüre alınabilmeleri suyu ve güneş enerjisini en verimli kullanan sistemler olmaları nedeniyle biyoyakıt, gübre, insan gıdası, yem hammaddesi, atık su arıtımı ve kozmetik gibi çeşitli biyoteknoloji alanlarında kullanımı hızla artmaktadır (Gökpınar vd., 2013).

2.2. Mikroalglerin Biyoteknolojideki Kullanım Alanları

Mikroalglerin insanlar tarafından ilk kullanımı, 2000 yıl öncesine kadar dayanmaktadır. Mikroalgler, yerli in halkı tarafından yüzyıllardır kullanılmaktadır. Yaşanan kıtlık esnasında in halkı *Nostoc* sp. tüketerek hayatlarını sürdürebilmişlerdir. Aradan geçen uzun yıllara rağmen, *Arthrospira platensis* (*Spirulina*), *Chlorella vulgaris* (*Chlorella*) ve *Aphanizomenon* gibi sadece birkaç yabancı mikroalg türü kültüre alınarak insan tüketimi ve kullanımı için yetiştirilmiştir (Wang vd., 2021).

İlk kültür alışması Cohn tarafından 1850 yılında *Haematococcus pluvialis* türü ile yapılmış, daha sonra Famintzin vd. (1871) tarafından yeşil alglerden *Chlorococcum infusionum* ve *Desmococcus olivaceus* basit inorganik kültür ortamında yetiştirilmiştir. Modern mikroalg kültür alışmaları Beijerinck vd. (1890) tarafından *C. vulgaris* ile başlamıştır. İlk olarak, zengin lipid içeriklerine sahip olan mikroalglerin, besin ve yakıt üretimi için kullanılabileceği Harder ve Von Witsch tarafından önerilmiştir (Famintzin vd., 1871). Daha sonra Milner tarafından algler kullanarak fotosentetik yağ üretiminin mümkün olabileceği ifade edilmiştir. Bu konuyla ilgili detaylı araştırma Aach tarafından 1952 yılında *Chlorella pyrenoidosa* ile yapılmış, mikroalglerin azot sınırlayıcı ortamda bünyelerinde %70 (kuru ağırlık)'den fazla lipid biriktirebildikleri rapor edilmiştir (Elcik vd., 2017).

Günümüzde mikroalglerin kullanımı, geçtiğimiz yüzyılın ortalarına doğru pozitif yönde ivmelenmeye başlamıştır. 50.000'den fazla türün var olduğu tahmin edilen buna karşın yalnızca 30.000 kadarı araştırılan mikroalgler, biyoyakıt, hayvan yemi, bitkisel yağ,

insan gıda takviyesi, gübre, biyoplastik, atık su arıtma, kozmetik ve ilaç endüstrisi gibi pek çok alanda aktif bir şekilde kullanılmaktadır (Spolaore vd., 2006).

Mikroalgler, karbonhidrat, protein, lipid, pigment ve karotenoid bakımından oldukça zengin bir yapıya sahiptir. Örnek olarak *C. vulgaris*, *Chlamydomonas* sp. ve *Isochrysis* sp. türleri yüksek lipid konsantrasyonu içermesinden dolayı günümüzde biyoteknolojinin artan önemi ile birlikte biyodizel üretimi için kullanılmaktadır. Bununla birlikte, *Spirulina platensis* içerdiği yüksek protein konsantrasyonları sebebiyle gıda takviyesi olarak da kullanılmaktadır (Zarrinmehr vd., 2020). Aynı zamanda mikroalgler, enerji ihtiyacının nüfus ile doğru orantılı olarak artması ile beraber artan sera gazı ve küresel ısınma ile mücadelede önemli bir role sahiptir. Ayrıca, dünya nüfusunun artışına bağlı olarak besin ihtiyacında da kayda değer artış gözlemlenmiştir. Bu ihtiyacın karşılanmasına yardımcı olmak amacıyla *Spirulina* sp., *Chlorella* sp. ve *Dunaliella* sp. yoğurt, kurabiye, bisküvi, ekmek, yağ/su emülsiyonları ve makarna gibi gıdalara ilave edilerek ihtiyacın giderilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca, mikroalgler insan ve hayvan gıda beslenmesinde kullanılan temel besin maddelerinin (karbonhidrat, lipid, protein, yağ) kaynağıdır (Koyande vd., 2019). Son 20 yılda mikroalglerden elde edilen söz konusu biyomoleküllerin antibiyotik, antiviral, antikanser, antifungal, antibakteriyel ve antienflamatuvar etkilerinin yanı sıra hipokolestrolemik enzim inhibisyonu ve diğer bazı farmakolojik etkilerini ortaya koyan çalışmalara literatürde sıkça rastlanmaktadır (Quinn vd., 1993; El-Sheekh vd., 2006).

2.2.1. Mikroalglerin Biyoyakıt Üretiminde Kullanımı

21. yüzyılda petrol, kömür ve doğalgaz bazlı rafinerilerin geliştirilmesine dair fosil hammaddelerinden daha ucuza yararlanmak adına çalışmalar yapılmaktadır (Farias vd., 2022). Söz konusu hammaddeler, nüfusun artan ihtiyaçlarını karşılamak için yakıt, hassas kimyasallar, farmasötikler, deterjanlar, sentetik elyaf, plastikler, böcek ilaçları, gübreler, çözücüler, mumlar, kok, asfalt vb. gibi birden fazla ürünü üretmek için endüstride yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Freed vd., 2005).

Son yıllarda, azalan petrol rezervleri ve aynı zamanda artan küresel ısınma problemiyle doğrudan ilişkili olan atmosferdeki sera gazının çevre üzerindeki olumsuz etkisi, fosil yakıtların yakılmasıyla birlikte hızlanmaktadır. Hatta fosil yakıtların yakılması atmosferdeki sera gazının doğa üzerindeki negatif etkilerine ivme kazandırdığına dair raporlar mevcuttur. (Chia vd., 2022) Bu nedenle, endüstriyel ekonominin ve tüketim

toplumlarının ihtiyaçlarını karşılamak için sürdürülebilir ve çevreye zarar vermeyen enerji kaynakları arayışı dramatik ölçüde önemli bir hale gelmiştir (Suganya vd., 2016).

Algal biyokütle, çok yüksek bir yağ fraksiyonu içerebilir ve bu nedenle, farklı dönüşüm süreçleri yoluyla gelişmiş biyoyakıtların üretimi için kullanılabilir. Büyük yağ fraksiyonunun en büyük avantajı, hammaddeden gelen neredeyse tüm enerjiyi farklı faydalı ürün çeşitlerine dönüştürme yeteneğinin olmasıdır. Fosil yakıtların yerini almaya yönelik araştırmalarda, alg hammaddesi, yalnızca yenilenebilir ve sürdürülebilir özellikleri nedeniyle değil, aynı zamanda ulaşım yakıtlarına yönelik küresel talebi karşılama potansiyeline dayalı ekonomik güvenilirliği nedeniyle de uygun bir aday olarak öne çıkmaktadır (Adeniyi vd., 2018). Güneş ışığını ve CO₂'yi daha verimli kullanabilen organizmalar olan mikroalgler, diğer yağ üretimi yapan bitkilere göre büyüme potansiyelleri oldukça yüksektir. Bununla birlikte, mikroalgler sahip oldukları yüksek yağ oranından dolayı biyodizel eldesinde de kullanılmaktadır. Bu nedenle, büyük tarım alanları değerlendirilerek elde edilen yağ bitkilerine (soya, ayeği, mısır, vs.) kıyasla mikroalgler, küçük ölçekli arazilerde daha büyük miktarlarda ve düşük ekonomi ile retilibilme potansiyeline sahiptirler (ılgın vd., 2015).

Mikroalgler karbondioksit tketerек karbonhidrat, hidrojen, protein ve lipit üretir; bunlar ayrıca biyodizel, biyogaz, biyo-hidrojen, biyo-etanol, bütanol, biyo-yağ ve kömür olmak üzere biyoyakıtların hammaddesi olarak kullanılmaktadır (Peng vd., 2019). Bazı tipik mikroalg türleri, içerdiği yüksek lipit konsantrasyonlarına sahip olmasından dolayı, istenilen biyoyakıt hacimlerine ulaşabilir. Örneğin, *Chlorella protothecoides*, azot sınırlaması altında heterotrofik olarak kültüre alındıklarında, lipit miktarının %55'ini biriktirebildikleri için mükemmel bir biyodizel kullanım stoğu olarak kabul edilmektedir (Xu vd., 2006).

2.2.2. Mikroalglerin Biyogübre retiminde Kullanımı

Günümüzde gübre olarak tanımlanan bitkilerin gelişimini ve büyümesini, daha kısa sürede daha fazla verim alabileceğimiz ve ürün kalitesinin artmasında büyük role sahip olan yardımcı kimyasal maddeler olarak ele alınabilir. Kimyasal gübrenin toprak, bitki ve çevreyi olumsuz etkilediğine dair raporlar mevcut olup literatürde çokça tartışılan bir konu olduğu bilinmektedir (Chandini vd., 2019). Son yıllarda bu etkiyi azaltmak için organik tarıma olan ilgi gözle görülür bir şekilde pozitif yönde artmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda mikroalglerden elde edilen mikrobiyal gübreler, topraktaki organik madde miktarında ve su tutma kapasitesinde bir artışa neden olduğu raporlanmıştır (Uysal vd., 2015). Bu bağlamda

mikroalglerden elde edilen mikrobiyal gübrelerin toprak, bitkiler ve dolayısıyla çevre üzerinde olumlu etkileri olduğunu söylemek mümkündür. Mikroalglerin, birçok biyoteknolojik kullanım alanlarından sadece biri olan biyogübre üretimi, bitki yetiştiriciliği ve daha yüksek verim alınabilmesi için kullanımı muhtemeldir. Mikroalgler, bitkiler için topraktaki besin maddelerinin mevcudiyetini arttırmasının yanı sıra büyüme hormonlarının salınımı ile birlikte bitki büyümesinin hızlanmasına yardımcı olmaktadır (Markou vd., 2011).

Başka bir örnek verecek olursak, *Acutodesmus dimorphus* türünde kuru hücre içeriği, Roma domatesi bitkilerinde tohum çimlenmesi, bitki büyümesi ve meyve üretimi üzerindeki etkileri izlemek için biyogübre olarak kullanılmış ve araştırılan üç parametrenin tümünde olumlu etki gösterdiği raporlanmıştır (Gonzales vd., 2016). Başka bir çalışmada, pirinç değirmeni atık suyuna adapte olmuş alglerin fosfor (%93), azot (%100), BOİ (Biyolojik Oksijen İhtiyacı) azaltma (%98,7) ve KOİ (Kimyasal Oksijen İhtiyacı) karşılamada (%93,5) en verimli olduğu bulunmuştur. Ek olarak, mikroalglerin poli-p biriktirirken biyogübre olarak kullanılabilme kabiliyetleri olduğu da gözlemlenmiştir. Öte yandan, mikroalgal gübrelerin toprak fosforunu çözen organizmalarla karıştırıldığında, steril olmayan toprakta daha yüksek bir fosfor salınımına sebep oldukları gözlemlenmiştir (Renuka vd., 2016).

2.2.3. Mikroalglerin İnsan Gıdası Üretiminde Kullanımı

Mikroalgler, yeni gıda ve fonksiyonel ürünler için en umut verici ve yenilikçi kaynaklardan biri haline gelmiştir (Vieria vd., 2021). Mikroalgler, vitaminler, esansiyel amino asitler, çoklu doymamış yağ asitleri, mineraller, karotenoidler, enzimler ve lif gibi oldukça değerli biyoaktif bileşiklerin doğal bir kaynağıdır (López-Pedrouso vd., 2020). Ayrıca mikroalgler, gıdaların besinsel değerini arttırması, böylece yaşam kalitesini ve refahını arttırarak insan sağlığını olumlu yönde etkilemesi, aynı zamanda hastalık risklerini azalttığı için fonksiyonel bileşenler olarak kullanılabilme potansiyeline sahiptir.

Son yıllarda mikroalgal biyokütleden hazırlanan bir dizi yeni çekici sağlıklı gıdanın geliştirilmesine ilişkin araştırmalar yapılmıştır. Mikroalglerin kullanımı genellikle tablet, kapsül ve sıvı halde piyasaya sürülmüş olup, aynı zamanda makarnalarda, atıştırmalık yiyeceklerde, şekerlemelerde, sakızlarda ve içeceklerde besin takviyesi ve doğal renklendirici kaynaklar takviye olarak kullanılmıştır (Goh vd., 2009). Doğada çok sayıda mikroalg türü olduğundan mikroalglerin ayrıntılı bir fizikobiyokimyasal karakterizasyonu, belirli gıda teknolojisi uygulamaları için en uygun mikroalglerin seçilmesi ve sonuç olarak

başarılı yeni gıdaların geliştirilmesi için esastır. Mikroalg kültürleri, yüksek konsantrasyonlarda hedef biyoaktif bileşikler üretmek için kültüre alınabilmektedir (Elisabeth vd., 2021). Bununla birlikte, biyokütle üretim sistemleri, bazı biyoaktif maddelerin zenginleştirilmesini amaçlayan çeşitli koşullara, operasyonel ve teknolojik beceri seviyelerine kolayca uyarlanabilmektedir (Matos vd., 2017).

1950'lerin başından beri, insanlar diyetlerine mikroalg tabanlı besinleri dahil etmiştir. İnsanların tüketimi için sıklıkla kullanılan mikroalg suşları, *Chlorella* sp., *Dunaliella* sp., *Haematococcus* sp., *Chlamydomonas reinhardtii*, *Schizochytrium* sp. ve *Spirulina* sp., ABD Gıda ve İlaç İdaresi tarafından “Genel Olarak Güvenli” (Generally Recognised as Safe (GRAS)) olarak sınıflandırılmaktadır (Torres vd., 2022). Bu nedenle, bol miktarda lipit, protein ve karbonhidrat bileşikleriyle mikroalglerden elde edilen pigment ve vitamin gibi diğer besinsel bileşikler doğrudan kuru toz halinde tüketilmektedir (Chacón vd., 2010). Geçtiğimiz yıllarda mikroalg biyokütle neredeyse sadece sağlıklı gıda ürünleri olarak pazarlanmıştır. *Spirulina* sp. ve *Dunaliella* sp. cinsine ait mikroalg türleri, tabletlerin yanı sıra kapsüller ve toz formda da bulunabilmektedir. (Christaki vd., 2011). Besin açısından zengin mikroalglerin ekmek gibi yaygın gıda ürünlerine dahil edilmesi, bazı gelişmekte olan ülkelerde gıda güvenliğinin iyileştirilmesine ve yetersiz beslenme sorunlarının üstesinden gelinmesine yardımcı olmuştur. Benzer şekilde, mikroalg biyokütlenin atıştırılabilirliklere ve alkolsüz içeceklerle eklenmesi (örn. *Spirulina* sp.), tüketiciler için daha sağlıklı bir alternatif olarak sunulmuştur. (Kusmayadi vd., 2021).

2.2.4. Mikroalglerin Atık Su Arıtımında Kullanımı

Su kaynaklarının ekolojik durumunun iyileştirilmesi, özellikle atık sudaki azot ve fosforun azaltılması yoluyla, birçok sanayileşmiş ve gelişmekte olan ülke için artan bir ilgi gözlenmektedir (You vd., 2022). Son yıllarda, miksotrofik mikroalgler atık sulardaki organik ve inorganik karbonun yanı sıra inorganik azot ve fosforu kullanma yeteneklerine ve atık sulardaki bu maddelerin konsantrasyonunda istenen bir azalmanın gözlemlenmesi ile atık su artırımının bir parçası olarak bu uygulamalara artan bir ilgi gözlemlenmiştir (Mohsenpour vd., 2021).

Atık su çıkışlarında, mikroalgler yoluyla karbonlu, azotlu ve fosforlu materyallerin biyolojik olarak uzaklaştırılmasının araştırılması, çeşitli çalışmalarla ele alınmıştır. Arıtma performansında ve mikroalg büyümesinde değişen verimliliklere sahip belediye, bira fabrikası, rafineri tarım ve endüstriyel atık sular dahil olmak üzere çeşitli atık su türleri üzerinde farklı mikroalg türleri ile karbonlu, fosforlu ve azotlu materyallerin biyolojik olarak

uzaklaştırılması gerçekleştirilmiştir (Das vd., 2022). Bu tür çalışmalara örnek olarak, *Scenedesmus obliquus* suşunun besinlerinin (C, N ve P) domuz çiftliği atık sularından başarılı bir şekilde uzaklaştırması (Ji vd., 2013) (Prandini vd., 2016) ve *C. pyrenoidosa* türünün süt fabrikası atıklarında verimli bir şekilde büyümesi verilebilir (Kothari vd.,2012). Hatta *C. vulgaris* dahil olmak üzere diğer *Chlorella* sp. türlerinin, ilk aşamada belediye atık suyundan N ve P'nin uzaklaştırmasına uygun adaylar olduğunu gösteren raporlar literatürde bulunmaktadır (Mohsenpour vd., 2021).

Atık su arıtımı için mikroalg türü seçilirken göz önüne alınan özellikler; (1) hızlı büyüme oranı; (2) yüksek besin giderme oranı; (3) farklı atık su türlerine ve yerel iklime güçlü uyum ve (4) yüksek biyokütle üretkenliğidir. Çoğu durumda, birden fazla kriter aynı anda karşılanmayabilir. Birden fazla kriter karşılanamadığında, hızlı büyüme oranının ilk tercihi takip edilecek en iyi seçenek olmalıdır. Yüksek büyüme hızı, seçilen bir türün uyarlanabilirliğini gösterir ve bu genellikle yüksek besin giderme oranı ve türün sağlamlığı ile pozitif ilişkilidir. Göreceli olarak düşük lipid içeriğiyle bile hızlı büyüme oranı bu eksikliği telafi etmesi ile biyokütle ve lipid üretkenliği, kolay çalıştırma ve atık su arıtımı açısından daha iyi bir genel performans elde edilmiştir. Atık su arıtımında yaygın olarak kullanılan alg türleri, *Chlorella emersonii*, *C. kessleri*, *C. pyrenoidosa*, *C. sorokiniana*, *C. vulgaris* ve *C. reinhardtii* vb. dahil olmak üzere *Chlorella* sp. genusudur (Arita vd., 2015; Cai vd., 2013, Kesaano vd., 2014; Pires vd., 2013; Razzak vd., 2013; Wang vd., 2010). *Anabaena* sp. cinsine ait bazı türler de vardır (*A. doliolum*, *A. flosaquae*). *A. platensis*, *Auxenochlorella protothecoides*, *Botryococcus braunii*, *C.reinhardtii*, *Desmodesmus* sp., *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*, *Hindakia* sp., *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis* sp., *Neoklorofiloris oleoabundans*, *Microcystic aeruginosa*, *Oscillatoria* sp., *Phaeodactylum tricornutum*, *Phormidium bohneri*, *P. laminosum*, *Scenedesmus bicellalis*, *S. bijugatus*, *S. dimorphus*, *S. intermedius*, *S. obliquus*, *S. quadricauda*, *S. rubescens*, *Spirulina maxima*, *Synechococcus* sp., *Trentepohlia aurea* (Arita vd., 2015, Cai vd., 2013, Kesaano vd., 2014, Pires vd., 2013, Razzak vd., 2013). Bu türlerin çoğu, besleme akışı olarak sentetik atık su veya evsel atık su kullanılarak incelenirken, *Chlorella* sp. içinde yalnızca çok sınırlı miktarda suş bulunmaktadır. Yine *Scenedesmus* sp. cinsinin tarımsal atık sular ve endüstriyel atık sular üzerinde yetiştirilmeye uygun olduğu tespit edilmiştir (Cai vd., 2013, Zhou vd., 2012b; Li vd., 2019).

2.2.5. Mikroalglerin Kozmetik Alanında Kullanımı

Cildin fizyolojik durumunu değiştirmeden takip eden ürünler güzellik bakım ürünleri ve kozmetik olarak adlandırılmaktadır. Kozmetik ürünleri; fitokimyasallar, temel yağlar, besinler, antioksidanlar vb. gibi doğal olarak dinamik sabitleyicileri içermektedir (Cannell, 2006). Kozmetiklerin kullanım sonuçları, herhangi bir şekilde ilaç kullanımına benzer olabilmektedir. Güzelleştiriciler veya kozmetikler, Food and Drug Administration (Gıda ve İlaç İdaresi) FDA tarafından onaylanmamasına ve satın alınabilmesine rağmen cildi iyileştirmeye ve temizlemeye yöneliktir. Kozmetiklerin yağ kesici losyonlardan aromalara, saç bakım ürünlerinden duş jellerine kadar geniş bir ürün yelpazesi bulunmaktadır (Pereira, 2018). Bugünlerde herkes, soruların çok sayıda cevabının doğanın kendisinde bulunduğuna dair bir inançla yaşam tarzını iyileştirebilecek her şeye ilgi göstermekte, bu nedenle doğal kaynaklardan elde edilen ürünlere olan ilgi, alglerin inanılmaz derecede önemsendiği bir şekilde artmaktadır (Mafinowska, 2011). Kozmetik endüstrisi için kahverengi algler (*Saccharina japonica*), kırmızı algler (*Gracilaria* sp.) ve yeşil algler (*Monostroma nitidum*) yetiştirilmiştir. Ek olarak, mikroalgler (*Spirulina/Arthrospira* sp.) de geliştirilenler arasında bulunmakta ve önemli üreticilerin başında Avustralya, Hindistan, İsrail, Japonya, Malezya ve Myanmar gelmektedir. Bugün, alg endüstrisinin dünya çapındaki değeri yılda 6 milyar ABD dolarından fazladır ve bunun %85'i insan kullanımı için besin maddeleri içermektedir. Karagenan ve aljinatlar gibi alg özleri, kozmetikler açasından önemlidir ve dünya hidrokolloidal pazarının %40'ını oluşturmaktadır (Yarnold vd.,2019).

Kozmetik sektöründe ilgi çekici mikroalgler, yaşlanma karşıtı özelliklere sahip bir ajan olarak kolajen sentezi için *Chlorella vulgaris* ve renklendirici ajan olarak kullanımı karotenoid içeriği ve UV koruması için *Dunaliella salina* ve *Haematococcus pluvialis* türleri kullanılmaktadır. Yüksek lipit verimliliğine sahip mikroalgler, cilt yumuşaklığı için aktif bir bileşen olarak linoleik asit üretimi için kullanılabilir (Molino vd., 2018).

Arthrospira ve *Chlorella* cinslerine ait türler, cilt ve saç bakım ürünlerinin üretiminde kullanılmaktadır (Spolaore vd., 2006). LVMH ve Daniel Jouvance gibi şirketler kendi mikroalg üretim sistemlerine sahiptirler. Kozmetik ürünlerin üretiminde kullanılan başlıca mikroalg türlerinden bazıları, *Ascophyllum nodosum*, *C. vulgaris*, *Alaria esculenta*, *Chondrus crispus*, *Mastocarpus stellatus*, *S. platensis*, *D. salina* ve *Nannochloropsis oculata* türleridir. Mikroalgal bileşenler, kozmetik ürünlerinde antioksidan, koyulaştırıcı ve su bağlayıcı ajanlar olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Bazı mikroalg bileşikleri için

gösterilen farklı farmakolojik aktiviteler arasında, yakın zamanda bildirildiği üzere mikroalglerden elde edilen pigmentler kozmetikte kullanılmaktadır (Jacome vd., 2020).

Üreticileri tarafından talep edilen bazı ticari ürün örnekleri ve özellikleri; *Arthrospira* sp. tercih edilmesinin sebebi yaşlanma karşıtı ajan olarak kullanılması ve protein açısından zengin bir özüt üretmesidir (Protulines, Exsymol S.A.M., Monaco). Benzer şekilde, *C. vulgaris* özü, ciltte kolajen üretimini uyarır, bu da dokuların yenilenmesine ve kırışıklık oluşumunun azalmasına neden olmasından dolayı kullanımı mevcuttur. (Dermochlorella, Codif, St. Malo, Fransa). Son zamanlarda, Pentapharm iki yeni ürün piyasaya sürmüş, (Basel, İsviçre): Pepha-Tight adlı ürünlerden birinde *N. oculata* kullanılmıştır. Bu ürünün olağanüstü cilt sıkılaştırma özelliklerine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Pepha-Ctive adlı diğer üründe, hücre büyümesini önemli ölçüde teşvik etme ve aynı zamanda cildin enerji metabolizmasını geliştirme yeteneğine sahip olan *D. salina* türünden elde edilen ekstraktlar kullanılmıştır (Rizwan vd., 2018).

Alglerin faydaları, özellikle cilt tedavisinde veya kozmetiklerde kullanımı, antioksidan oldukları için akne ve reaktif oksijen türleri ile savaşma yetenekleri nedeniyle büyük önem taşımaktadır. Mikroalgler aynı zamanda yaşlanmayı geciktirici ve iltihap önleyici ajan olarak da kullanılmaktadırlar (Berthon vd., 2017). Yine mikroalgler, melanogenezi inhibe edici özelliklere ve UV ışınlarına karşı koruyucu ve melanoma önleyici etkilere de sahiptirler (Corinaldesi vd., 2017). Alg biyoaktif bileşiklerinin Matriks metalloproteinazların (MMP) ve tirozinaz inhibitör aktivitesinin uygun şekilde aşağı düzenlenmesinde patolojik etkilerini göstermek için pek çok araştırma yapılmıştır. Alglerden elde edilen bileşiklerin cilt sağlığı ve bakımı üzerinde çeşitli faydalı etkileri vardır. Kahverengi alg türevli florotaninler ve çeşitli polisakaritler, kozmetikte birçok uygulamaya sahiptir (Choi vd., 2018). Alglerin biyoteknolojik uygulamalarda tercih edilmesinin temel sebebi kolay hasat edilmesi ve hızlı büyümesinden dolayı kaynaklanmaktadır (Guleri vd., 2020).

2.2.6. Mikroalglerin Hayvan Yemi Olarak Kullanımı

Mikroalglerin hayvan yemi olarak kullanımı, büyük ölçüde mikroalglerin türüne ve aynı zamanda protein, karbonhidrat, lipit, vitamin ve antioksidan madde gibi besin bileşimlerine bağlıdır (Fradique vd., 2013). Ek olarak, diğer bir etkileyen faktör ise hayvanın bu besin kompozisyonuna olan adaptasyonudur. Alglerin hayvan yemi olarak kullanılmasıyla ilgili çalışmalar 1950'li yıllardan itibaren başlamıştır. Mikroalg

biyokütlesinin yem olarak kullanılmasının, özellikle hayvanların fizyolojisinde olumlu etkilerinin olduğu bağışıklığın ve hastalığa karşı direncin ayrıca antibakteriyel ve antiviral etkinin de artmasında olumlu etkilerinin olduğu bilinmektedir (Kusmayadi vd., 2021).

Mikroalg türevli yemler şu anda esas olarak iki ana hayvan kategorisi için kullanılmaktadır. İlk grup, larva ve yavru kabuklu deniz ürünleri, yüzgeçli balıklar, yumuşakçalar (istiridyeler), kabuklular (karides) ve zooplankton gibi kültür balıkçılığına dayalı hayvanlardan oluşur. Bu grup, balıklar için yem olarak kullanılabilir. İkinci kategori, damızlık boğalar, besi sığırları, süt inekleri, atlar, akvaryum balıkları ve çeşitli kümes hayvanları gibi evcil hayvanları ve çiftlik hayvanlarını içermektedir (Hashemian vd., 2019). Şimdiye kadar raporlanan araştırma kanıtları, mikroalglerin balık diyetlerinde, balık unu ve balık yağının yerini başarıyla alabileceğini aynı zamanda domuz, kümes hayvanları ve tavşanlarda büyüme ve et kalitesini iyileştirebileceği gözlemlenmiştir. Ruminantlarda, deniz mikroalglerinin diyetle dahil edilmesi, süt ve et yağ asidi profilini iyileştirmiştir. Mikroalgler, çeşitli hayvan türlerinde savunma aktivitesini ve sağlık durumunu iyileştirdiği, doku koruması ve antioksidan etkiler sağladığı ve balıklarda pigmentasyonu etkilediği gösteren çeşitli biyoaktif bileşiklere sahiptir (Sedra vd., 2009).

2.3. Mikroalglerin Ürettiği Değerli Metabolitler

Alglerin çok çeşitli biyoteknolojik kullanım alanının olması aslında onların metabolizmaları sonuçları üretebildikleri değerli biyokimyasal maddelerden kaynaklanmaktadır. Bu canlılar, doğal süreçte ürettikleri birincil (primer) metabolitlerin yanında, stres koşullarından korunmak için ürettikleri ikincil (sekonder) metabolitler ile de dikkat çekmeye devam etmektedirler. Bu tez çalışmasının kurgulanma sebebi de materyal olarak seçilen türünün besin tuzu stresine bağlı olarak biyokimyasal kompozisyonunu nasıl değiştireceğini açığa çıkarmak ve üretebileceği değerli metabolitlerin tespitini yapmaktır.

2.3.1. Birincil (Primer) Metabolitler

Yaygın olarak bilinen monosakkaritler, amino asitler, proteinler ve nükleik asitlerdir. Adlarından da anlaşılacağı gibi, birincil metabolitler tüm bitki ve alg hücrelerinde bulunur ve diğer tüm organizmalar gibi alglerin varlığı için temel biyomoleküllerdir (Alaca vd., 2012).

2.3.2. İkincil (Sekonder) Metabolitler

İkincil (sekonder) metabolitler; 3 başlıkta gruplandırılır: alkaloidler (amin yapıları), terpenoidler (C_5H_8 (izopren) türevleri) ve fenollerdir (fenol türevleri) (Sruthi vd., 2021). Primer metabolitlerin aksine, ikincil metabolitler bir zamanlar "artık ürünler" olarak kabul edilmiştir. Ancak artık ürünleri üreten bitkilerin hayatta kalması ve üretimi için önemli olduğu düşünülmektedir (Alaca vd., 2012).

Mikroalgler kültüre alındığında, maruz kaldıkları stres faktörleri dolayısıyla (Azot, Fosfor, Işık, Ph, Sıcaklık ve Tuzluluk değerlerinde farklılık) canlılığının devam etmesine yardımcı olacak ikincil metabolit üretirler. Ürettikleri bu ikincil metabolitler yaşama şansını artırır, ortama adapte olmalarını sağlar, evrimleşmelerine yardımcı olur ve daha verimli bir şekilde büyümelerini destekler (Sruthi vd., 2021).

İkincil ürünler veya doğal ürünler olarak da adlandırılan ikincil metabolitler, organizmanın normal büyümesine, gelişmesine veya üremesine doğrudan dahil olmayan bakteri, mantar, bitkiler ve mikroalgler tarafından üretilen organik bileşiklerdir. Genellikle, organizmanın hayatta kalmasını veya üretkenliğini artırarak organizma için seçici bir avantaj üretebilen ekolojik etkileşimlere aracılık ederler (Koksharova vd., 2022).

İkincil metabolitler, birincil metabolizmanın ara ürünleri aracılığıyla sentezlenir ve genellikle ekolojik etkileşimler tarafından indüklenir (Yang vd., 2018). Stres koşulları veya belirli çevresel koşullar altında, yanıt veren genlerin ifadesi aktive edilir ve ardından değişken profilli metabolitler sentezlenir (Liang vd., 2018). İkincil metabolizma ile ilişkili çoğu enzim, nükleer genomda kodlanabilir, ancak bazıları işlevlerini yerine getirmek için kloroplasta yönlendirilir (Gimpel vd., 2015).

Birincil metabolitlere ek olarak ikincil metabolitler genellikle, pigment bazı maddeler, vitaminler, anti-inflamatuar ve antikanser etkileri gibi çeşitli terapötik etkilere sahip olan geniş bir ikincil metabolit spektrumun biyosentezini sağlamaktadır. Bu nedenle mikroalgal ikincil metabolitler, tıbbi durumların tedavisi ve sağlık takviyesi olarak endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır (Park vd., 2022).

İkincil metabolitler genellikle canlının dış etkenlere karşı savunmasında önemli bir rol oynar. İnsanlar ikincil metabolitleri ilaçlar, tatlandırıcılar, pigmentler olarak kullanabilmektedir (Yadav vd., 2019). Örnek olarak; nutrasötiklerde yaygın olarak kullanılan karotenoidler (lutein, zeaksantin ve astaksantin), uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri (LC-PUFA) ve vitaminler gibi metabolitler de üretirler.

2.4. Mikroalg Kültüründe Kullanılan Stres Parametreleri

Mikroalgler, ışık enerjisi ve inorganik besinlerden lipitler, karbonhidratlar, proteinler ve pigmentler gibi katma değerli ürünler açısından zengin biyokütle üreten organizmalardır. Mikroalgler, farklı stres koşulları altında farklı davranışlar göstererek biyokimyasal aktivitelerinde değişiklik gösterebilmektedir (Minhas vd., 2016). *C.reinhardtii* türünde Azot (N) ve Fosfor (P) eksikliğinin büyümeye etkisini ve yağ asidi verimliliğini incelenmiş ve azot ve fosfor eksikliği biyokütleyi düşürürken, hücrelerdeki lipit içeriği ve yağ asidi verimliliğini önemli ölçüde arttırdığı gözlemlenmiştir (Yang vd.,2018). Buna örnek olarak *Scenedesmus acuminatus* türünde Azot (N) varlığı veya yokluğu durumunda pigmentlerdeki değişim incelenmiştir. Azot eklenmesi hücre içi karotenoid ve pigment içeriği üzerindeki etkilere göre değişiklik göstermiştir. Neoksantin ve lutein içerikleri azota duyarlı olmakla birlikte, azot açlığı durumunda önemli ölçüde azalmış ve azot eklenmesiyle artış gözlemlenmiştir. Bunun tersine, zeaksantin ve kewanantin miktarları, azot varlığına duyarlı olduğu ve kültür dönemi boyunca nispeten stabil kaldığı gözlemlenmiştir (Zhang vd., 2019).

Genel olarak mikroalg kültür çalışmalarında sıklıkla kullanılan stres parametreleri; besin tuzu konsantrasyonu (özellikle azot, fosfor ve diğer mikromineraler), ışık şiddeti, tayfi ve fotoperiyot, pH, tuzluluk ve sıcaklık değerlerinde uygulanan uç değerlerdir.

2.4.1. Besin tuzları (Nutrient)

Azot

Mikroalg büyümesi için gerekli bir makro besindir. Protein, lipit ve karbonhidrat sentezinde önemli bir rol oynar. Genel olarak, azot konsantrasyonu, mikroalg büyümesini ve bunların biyokimyasal bileşimlerini önemli ölçüde etkiler (DNA, RNA ve ATP için gereklidir. Azot, protein ve klorofil üretiminde aktif kullanılmaktadır (Wong, vd., 2016). Lipit içeriğinin arttırılmasında azot eksiltme yönteminin kullanılmasının nedeni ucuz, kolay ve farklı alg türleri üzerinde güçlü ve güvenilir etki göstermesinden dolayıdır (Griffiths, vd., 2011). Azot, Blue-Green 11(BG11), Bold Basal medium (BBM) ve Bristol Medium (BM) dahil olmak üzere farklı ortamlar için gerekli birincil bileşendir. Ayrıca mikroalgal hücrelerde ikincil metabolizmayı düzenleyen en etkili faktördür. Bu nedenle azot, yalnızca mikroalgal biyokimyasal bileşimi değil, aynı zamanda yenilenebilir yakıtı yönelik işleme yolunun olası seçimini de etkiler. Örneğin, yüksek lipid içeriğine sahip mikroalglerin transesterifikasyon yoluyla biyodizele dönüştürülmesi tercih edilir. Çeşitli azot kaynakları

ve bunların konsantrasyonları, etkileşimleri ile birlikte alg biyokütlesinin büyümesini etkilemektedir (Zhu vd., 2019).

Mikroalgler azotu nitrat, nitrit, üre ve amonyum formunda kullanabilirler (Xu vd., 2001; Yaakob vd., 2021). Nitrat, pH değişimi olasılığı ile daha az stabil olduğundan, amonyum tuzlarına kıyasla mikroalg kültürü için yaygın olarak kullanılır (Procházková vd., 2013; Yaakob vd., 2021). Bununla birlikte, kültür ortamında azot sınırlandırılması biyokütle üretimini azaltabilir ancak lipid üretimini arttırabilmektedir. Sonuç olarak, mikroalglerin lipid metabolizması sürecinin optimizasyonuna yönelik en çok uygulanan besinsel stres faktörüdür. Azot açlığına yanıt olarak, *C. vulgaris* (Yeh vd., 2011), *Chlorella* sp., (Praveenkumar vd., 2012), *Scenedesmus* sp. (Pancha vd., 2014) azot stres koşulu altında *P. tricornutum* türünde artan eikosapentaenoik asit (EPA) birikimi Yongmanitchai ve Ward (1991) tarafından rapor edilirken, ortama azot kaynağı olarak üre eklendiğinde EPA üretkenliği *N. laevis* türünde maksimum olmuştur. Bununla birlikte, diatom yetiştiriciliğinde tek azot kaynağı olarak amonyağın kullanılması, büyüme ve çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) üretimi için zararlı bulunmuştur. PUFA içeriği ve nitrojen açlığı arasındaki bu negatif korelasyon, alg hücreleri nitrojen sınırlama koşuluna maruz kaldığında, hücrelerin polar lipidler (esas olarak PUFA'lar) pahasına TAG sentezi (doymuş yağ asitleri (SFA) ve tekli doymamış yağ asitleri (MUFA)) yolunu yükseltmesiyle ilgilidir (Cohen, 1999).

Fosfor

Fosfor; kültür büyümesi, lipid üretimi, yağ asidi verimi ve enerji transferi, sinyal iletimi ve fotosentez gibi metabolik süreçlerde önemli bir rol oynayan diğer bir temel bileşendir. Aynı zamanda DNA, RNA ve ATP sentezi için gereklidir.

Algal ortamda temel bir besin maddesi olan fosfor, mikroalgal büyümede önemli bir rol oynar ve ayrıca hücrelerde enerji transferi, nükleik asit biyosentezi, fosfolipid biyosentezi ve membran gelişimi gibi metabolik süreçlerde yer alır. Fosfor sınırlaması, *P. tricornutum*, *I. galbana*, *Chaetoceros* sp., *Pavlova lutheri* mikroalglerinde TAG birikiminin artmasına neden olurken, *Tetraselmis* sp. mikroalginde lipid içeriğinde düşüş ve *N. atomus* (Reitan vd., 1994) ve *Monodus subterraneus* türünde, fosfor sınırlayıcı stres koşuluna maruz bırakıldığında, kademeli olarak azalan EPA içeriği ile TGA yüzdesinde yaklaşık 6 kat artış gözlemlenmiştir (Khozin vd., 2006). Aksine, *C. kessleri* türünde fosfordan yoksun hücrelerinde yüksek düzeyde doymamış yağ asitleri gözlenmiştir. (El-Sheek vd., 1995). Fosfolipid fraksiyonunda PUFA'ların bolluğu göz önüne alındığında, büyüme ortamındaki fosfor konsantrasyonu, PUFA'ların toplam verimine doğrudan dahil olabilmektedir (Guschina vd., 2009). Yüksek fosforla takviye edilmiş bir büyüme ortamında

büyütüldüğünde, *P. tricornutum* türünde artan EPA üretimi gözlemlendiği raporlanmıştır (Yongmanitchai vd., 1991).

2.4.2. Işık Şiddeti

Işık, biyokütle birikimini ve ürün biyosentezini artırmak için kritik faktördür. Mikroalg yetiştirmede, ışık yoğunluğunu arttırmak, biyokütleyi arttırmanın yoludur. Işığın mevcudiyeti fotosentetik mikroorganizmaların büyümesi ve üretkenliğinde en önemli faktördür. Işık, fotosentetik mikroorganizmalar için ana enerji girdisi olduğundan, daha iyi çıktı için optimize edilmelidir. Bununla birlikte, özellikle optimal olmayan sıcaklık veya yüksek oksijen seviyesi ile birlikte aşırı ışık, hücreye zarar verebilir (Tredici, 2000). Bu nedenle, mikroalg kültürlerinde uygun tasarım ile yetiştirme sistemine optimize edilmelidir (Fernandes vd., 2001; Tredici vd., 2015). Kültür ortamındaki hücreler tarafından alınan ışık miktarı, kültürlerin büyüme hızını etkileyen karbon ile doğrudan ilişkilidir (Fontoura vd., 2017). Mikroalglerin büyümesi, hücrelerin kültür içinde maruz kaldığı ışımanın doğrudan bir fonksiyonu olan fotosentez hızı ile belirlenir. Işık şiddeti ile fotosentetik hızında değişim göstermektedir. Işık şiddeti arttıkça mikroalglerdeki fotosentez de doyma noktasında maksimum hıza ulaşana kadar artmaktadır (Rai vd., 2017; Chowdury vd., 2020). Örneğin *Tetradismus obliquus* türünde 10 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ aydınlatması altında lipit sentezi hiç gerçekleşmez ve artan aydınlatma ile üretilmeye başlar ve 200 $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ $\mu\text{mol fotonlarda}$, sayıları kuru biyokütlenin %45,31'i maksimum değerlere ulaşmıştır. Bununla birlikte, ışık yoğunluğundaki (1000 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 'e kadar) daha fazla bir artış, lipit içeriğinde kuru biyokütlenin %38,2'sine kadar bir azalmaya yol açtığı gözlemlenmiştir (Bardone vd., 2014). 2016 yılında yapılan bir çalışmada, *Acutodesmus* sp. türü üzerine ışık faktörüne bağlı büyüme incelenmiştir. Güneş ışığı yoğunluğunun yaklaşık üçte biri (700 $\mu\text{mol fotonlar m}^{-2}\text{s}^{-1}$) yoğunluğundaki ışık kaynağı kullanıldığında maksimum büyüme gözlemlenmiştir (Varshney vd., 2016).

2.4.3. Sıcaklık

Sıcaklık, alg büyüme hızını, hücre boyutunu, biyokimyasal bileşimi ve besin gereksinimlerini etkileyen en önemli çevresel faktörlerden biri olarak kabul edilir. Mikroalg kültürleri, kullanılan ışık kaynağından radyasyon yoluyla ısıyı emer ve bu da kültürde sıcaklığın artmasına neden olur. Bu nedenle, büyük ölçekli bir dış mekân kültürü için güneş ışığının ışıması ve ilgili sıcaklığın da dikkate alınması gerekir (Deb vd., 2017). Bazı mezofilik türler 40°C'ye kadar dayanabilse de mikroalg büyümesi için en uygun sıcaklık

20°C ile 35°C arasında değişmektedir. Optimum sıcaklığın altında suşun verimi azalır, ancak kültürlerin aşırı ısınması, hücrelere zarar verebileceğinden kritik olarak tanımlanmıştır (Bernard vd., 2012). Bu nedenle, gündüz/gece döngüsü boyunca sıcaklık değişimlerine yol açan mevsimsel değişimler mikroalg yetiştiriciliğindeki önemli stres parametrelerindendir (Chowdury vd., 2020). *N. oculata* türünde 4 farklı sıcaklık değerleri altında karotenoid ve klorofil içerikleri incelenmiştir. Sonuçlar sıcaklığı düşük değerden yüksek değere doğru klorofil ve karotenoid miktarlarında artış gözlemlenmiştir (Aussant vd., 2018).

Camejo vd. (2019), değişken ortam sıcaklığının *Chlorella* sp. türünün hâkim olduğu yerli bir mikroalg-nitrifikasyon bakteri kültürü üzerindeki etkisini değerlendirmişlerdir. 15–30 °C aralığındaki sıcaklıklarda benzer performans elde edilmiştir. 30-35 °C mikroalgler canlılığı azalmıştır. Sıcaklık 15-30 °C aralığında mikroalg kültürü bakteri kültürünün büyümesinde olumlu bir etki gözlenmiştir.

2.4.4. pH

pH mikroalg kültürlerinde büyük öneme sahiptir, çünkü mikroalglerin kendilerini etkilemenin yanı sıra, ortamdaki minerallerin ve CO₂'nin çözünürlüğünü de belirlenmektedir (Qui vd., 2017). Bileşim ve tamponlama kapasitesi, çözünmüş CO₂ miktarı, hücrelerin sıcaklığı ve metabolik aktivitesi gibi çeşitli faktörler kültür ortamının pH'ını etkileyebilmektedir (Singh vd., 2011).

Kültür ortamının pH'ına tolerans seviyeleri türden türe değiştiğinden, bu da büyüme hızını etkileyebilir. Ancak mikroalg kültürü için en yaygın pH değerleri 6 - 8 arasında değişir (Kim vd., 2014; Zhu, 2015). Çoğu mikroalg genellikle geniş pH aralıklarını tolere eder, ancak bu aralığın ötesinde verim büyük ölçüde azalır. Mikroalgler için optimum pH değerleri, nötrden hafif alkaliye (7,0- 10,0) kadar değişmektedir (Lu vd., 2014; John vd., 2012).

Kumar vd. (2018), *Nannochloropsis salina* türü üzerinde yaptığı bir çalışmada *N. salina* türünün büyümesi ve biyokimyasal bileşimi üzerindeki tuzluluk ve pH'ın etkisini araştırmışlardır. 40 ppt tuzluluktaki kültürlerde maksimum büyüme hızı, klorofil, karotenoidler ve protein üretimi kaydedilmiştir. Bununla birlikte pH 6'daki kültürlerde karotenoid üretimi daha fazla olduğu gözlemlenmiş, öte yandan protein ve karbonhidrat üretimi pH 10'dan, lipid üretiminin pH 7'den yüksek olduğu tespit edilmiştir.

2.4.5. Tuzluluk

Tuzluluk, mikroalg yetiştiriciliği sırasında dikkat edilmesi gereken bir diğer faktördür, çünkü açık kültürde yoğun buharlaşma nedeniyle artma eğilimi gösterir ve ortamdaki konsantrasyonu artırır. Bazı mikroalg türleri, özellikle tatlı su ortamlarında bulunanlar, tuzluluk tarafından çok sınırlandırılır. Genel olarak, tuzluluğa toleranslarına bağlı olarak mikroalgler üç kategoriye ayrılabilir: Oligohalin, sadece düşük tuzlu suda gelişebildiklerinde (maksimum tuzluluk 0,5 ile 5 g·kg⁻¹); Mesohalin, tuzluluk oranı 5 ila 18 g·kg⁻¹ geliştiklerinde ve yüksek tuzlu suda gelişebildiklerinde Polihalin, tuzluluk oranı 18 ila 30 g·kg⁻¹ (Mohan vd., 2014) olarak sınıflandırılabilir (Chowdury vd., 2020).

Mikroalglerin kültür büyümesi ve biyokimyasal kompozisyonu üzerine etkileri uzun yıllardır araştırma konusu olmuştur. Bu çalışmalar yakın tarihten itibaren incelenip, güncel durum belirtilecek olursa, aşağıdaki gibi bir özetleme yapmak mümkündür.

Zarrinmehr vd. (2020), farklı azot konsantrasyonlarının (0, 36, 72, 144 ve 288 mg/L) *I. galbana* türünde büyüme hızı ve biyokimyasal kompozisyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. *I. galbana* türünün hücre büyümesi, pigment konsantrasyonu biyokütle üretimi ve protein miktarında azot konsantrasyonu ile paralel bir değişim gözlemlenmiştir. Toplam azot eksikliğinde karbonhidrat miktarı %47 ile en yüksek değeri göstermiştir. Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar), azot eksikliğine kıyasla yeterli azot konsantrasyonları (72 mg/L) altında beş kat artış göstermiştir.

Yang vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada *C. reinhardtii* türünde azot ve fosfor eksikliğinin büyümeye etkisini ve yağ asidi verimliliğini incelenmiştir. Azot ve fosfor eksikliği biyokütle üretkenliğini düşürürken, hücrelerdeki lipit içeriği ve yağ asidi verimliliğini önemli ölçüde arttırmıştır. Sodyum asetat ilavesi, azot ve fosfor eksikliğinden kaynaklanan biyokütledeki azalmayı önemli ölçüde gidermiştir. Ayrıca, 4 g/L sodyum asetat takviyesi azot/fosfor eksikliğinde, toplam yağ asidi verimini besinleri tükenmiş ve normal kültür koşullarına kıyasla, sırasıyla %93 ve %150, 1 arttırdığı gözlemlenmiştir.

Wang vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada, *C. reinhardtii* türün fosfor ve azot streslerine karşı verdiği tepkileri incelenmiştir. Yüksek azot ve düşük fosfor koşulları *C. reinhardtii* türünün büyümesi üzerinde olumsuz etkilere neden olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte bu koşullarda organellerin çoğunun deforme olduğu, kloroplast membranının küçüldüğü ve mitokondrinin şiştiği, hatta kısmen parçalandığı görülmüştür. *C. reinhardtii* türünün fosfor stresine, azot stresine oranla daha duyarlı olduğu da gözlemlenmiştir.

Zhang vd. (2019) *S. acuminatus* türü ile yaptıkları çalışmada azot açlığı veya azot fazlalığı durumunda pigmentlerdeki değişimi incelemişlerdir. *S. acuminatus* pigmentleri başlıca klorofil a, klorofil b, neoxanthin, lutein, zeaksantin ve violaxanthin içermektedir. Azot açlığı ile, klorofil a ve klorofil b içerikleri, 0. günde sırasıyla 0,85 ve 0,32 mg g⁻¹'iken, 9. günde sırasıyla 0,08 ve 0,03 mg g⁻¹'e düştüğü gözlemlenmiştir. 2 günlük azot eklenmesinden sonra, Klorofil a ve Klorofil b içerikleri hızla artarak, sırasıyla 1,17 ve 0,97 mg g⁻¹'e ulaşarak, 0. günde başlangıçta ölçülenlerden daha yüksek seviyelerde gözlemlenmiştir. Azot eklenmesi hücre içi karotenoid ve pigment içeriği üzerindeki etkilere göre değişiklik göstermiştir. Neoksantin ve lutein içerikleri azota duyarlı olmakla birlikte, azot açlığı durumunda önemli ölçüde azalmış ve azot eklenmesiyle artış gözlemlenmiştir. Bunun tersine, zeaksantin ve kemanantin içerikleri, azot varlığına duyarsızdı ve kültür dönemi boyunca nispeten stabil kalmıştır.

Song vd. (2016), *Dunaliella tertiolecta* türü ile yapılan çalışmada; çeşitli azot-fosfor oranlarının hücre büyümesi, klorofil içeriği ve lipid birikimi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. *D. tertiolecta* inorganik azot (nitrat-azotu) veya organik azot (üre-azotu) ile modifiye mikroalgal ortamlarda deneyler yapılmıştır. 1:1 ila 32:1 arasında değişen başlangıç N:P oranlarında tek azot kaynağı olarak nitrat-N veya üre-N ortamında 16:1'lik N: P oranında elverişli, maksimum hücre yoğunluğunu ve spesifik büyüme oranını vermiştir. Hem nitrat-N hem de üre-N kültürlerinde 4: 1'lik N: P'de klorofil içeriğinde azalma gözlemlenmiştir. Hem nitrat hem de üre besleyici ortamda maksimum lipid konsantrasyonunun 4:1'lik N:P'de elde edildiği de gözlemlenmiştir. 4:1'lik N:P'de üre-N ortamındaki kültürlerin lipid üretkenliği ve lipid içeriği, diğer N:P oranlarına sahip kültürlerden elde edilenlerden belirgin şekilde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, daha yüksek azot-fosfor oranları, hücre büyümesi üzerinde artırıcı etkiye sahip olma olasılığı gözlemlenmiştir. Daha yüksek lipid birikimi için, daha düşük azot/fosfor oranı uygunken aynı koşullar altında klorofil içeriğinde bir düşüş gözlemlenmiştir

Goiris vd. (2015), *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis suecica*, *C. vulgaris* türlerini fosfor ve azot ile sınırlı koşullar altında incelemişlerdir. Besin (özellikle N) sınırlaması, düşük antioksidan içeriğiyle sonuçlanmıştır. Nutrient sınırlı kültürlerde hem fenolik hem de karotenoid içeriklerinde önemli ölçüde azalma görülmüştür. Bunun aksine tokoferoller ve askorbik asit seviyeleri, özellikle P sınırlaması altında, besinle sınırlı kültürlerde daha yüksek gözlemlenmiştir. Sonuçlar, tokoferoller veya askorbik asit gibi bazı vitamin antioksidanların üretimini arttırmak için faydalı olabilmesine rağmen, besin

stresinin mikroalglerdeki genel antioksidan içeriğini artırmak için etkili bir strateji olmadığı gözlemlenmiştir.

Neha vd. (2016) *Chlorella minotissima* türünde yaptığı çalışmada bu mikroalgi maksimum lipit üretkenliğini test etmek için azot ve fosfor konsantrasyonları altında incelemiştir. Azot ve fosforla sınırlı hücrelerde (NLPL) maksimum lipit üretkenliğinin ($49,1 \pm 0,41 \text{ mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$) 1, 47 kat daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Sinerjistik N/P açlıkları, bireysel yoksunluklara göre fotosentetik pigmentler üzerinde daha belirgin bir etki göstermiştir. Azot açlığı ile birlikte fosfor eksikliği, karbonhidrat miktarında %17,12 düşüş gösterirken, azot yeterli hücrelerde hiçbir değişiklik kaydedilmemiştir. Optimum N P konsantrasyonu, ara hücre boyutu, pigmentler, karbonhidrat ve proteinleri koruyarak biyokütle ve lipit arasındaki dengeyi göstermiştir. Sonuç olarak sinerjistik N/P sınırlaması azaltılmış besin tüketimi ile lipit üretkenliğini arttırmada etkili bir faktör olarak gözlemlenmiştir.

Singh vd. (2015), *Ankistrodesmus falcatus* KJ671624 mikroalg türünün azot, fosfor ve demir stresleri altında lipit üretkenliğini incelenmiştir. En yüksek lipit içeriği %59,6 ve lipit verimliliği bazal ortama ek olarak $74,07 \text{ mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$ ile azot $750 \text{ mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$, fosfor $0 \text{ mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$ ve demir $9 \text{ mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$ ile besin stresi altında elde edilmiştir. Fotosentetik davranış, birleşik besin stresi koşulu altında yüksek lipit üretkenliğini doğrulamıştır. Doymuş yağ asidi bileşiminin, BG-11 ortamına kıyasla seçilen besin stresi koşulu altında %38,49 arttığı gözlemlenmiştir. Fosforun, bu çalışmada kullanılan suşun lipit üretkenliği üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir.

Chandra vd. (2016) *Scenedesmus obtusus* türü üzerinde yaptığı çalışmada bu mikroalg türünün çeşitli koşullar altında büyümesini ve biyokimyasal özelliklerinin değişimini incelemişlerdir. *S. obtusus*, %20'ye kadar test edilen tüm karbondioksit konsantrasyonlarına tolerans göstermiştir. Farklı azot kaynakları arasında ürenin, azot kaynağının sodyum nitrat olduğu kontrol grubuna kıyasla iki kata kadar daha fazla biyokütle üretkenliği gösterdiği gözlemlenmiştir. *S. obtusus* $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ve $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ sürekli ışığa maruz bırakıldığında maksimum büyüme hızı gözlemlenmiştir. Işık yoğunluğundaki artışla birlikte biyokütle üretkenliğinde de artış gözlemlenmiştir.

Kim vd. (2016), *Tetraselmis* sp. türünde farklı azot konsantrasyonları altında büyüme hızı ve lipit içeriği incelenmiştir. *Tetraselmis* sp. türünün büyüme hızının ve lipit içeriğinin nitrat koşulları altında arttığı gözlemlenirken, azalan nitrat koşulları altında büyüme hızının ve lipit içeriğinin değişmediği gözlemlenmiştir. *Tetraselmis* sp. türünün lipit üretkenliğini arttırmak için, nitrat koşulları altında iki aşamalı bir kültür işlemi uygulanmıştır. Hücreler

ilk aşamada beş gün boyunca F2 ortamında yetiştirildiğinde, elde edilen lipid içeriği ve verimlilik sırasıyla %22,4 ve 26,7 mgL⁻¹d⁻¹ olarak gözlemlenmiştir. 8,82 µM NaNO₃ ile nitrat koşulları altında 36 saat kültivasyonun ikinci aşamasından sonra, 47,3 mgL⁻¹d⁻¹'lik bir artırılmış lipid üretkenliği ile 1,32 gL⁻¹ biyokütle konsantrasyonu ve %30,5 lipid içeriği elde edildiği gözlemlenmiştir.

Gim vd. (2016), *I. galbana* LB987, *N. oculata* CCAP849 / 1 ve *D. salina* türleri üzerinde hücrelerin büyümesini ve toplam lipid üretimini arttırmaya yönelik çalışma yapmışlardır. Fotoototrofik koşullar altında düşük azot konsantrasyonlarında, toplam lipid üretiminin uyarıldığı, ancak artan azot konsantrasyonu ile lipid içeriği azalırken biyokütle artışı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak azotun, fotoototrofik yetiştirme altında üç mikroalg türlerinin biyokütle ve toplam lipid üretimi üzerindeki etkisini incelemek için (ışık yoğunluğu, *I. galbana* LB987 ve *N. oculata* CCAP849/1 için 80 µmol m⁻²s⁻¹'de ve 100 µmol *D. salina* için m⁻²s⁻¹), modifiye edilmiş kültür ortamına farklı konsantrasyonlarda azot ilave edilmiştir. Düşük azot konsantrasyonu hücre büyümesini desteklemediği, ancak hücrelerde toplam lipid birikimini uyardığı gözlemlenmiştir. Azot konsantrasyonu arttıkça, biyokütle üretiminde de gözle görülür şekilde artış gözlemlenmiştir.

Andeden vd. (2021), *Auxenochlorella protothecoides* türünde triasilgliserol birikimini indüklemek için karbonat-bikarbonat tamponu ve azot açlığı koşullarında incelemişlerdir. Sonuç olarak azot açlığı ve alkali pH kombinasyonunun, triasilgliserol ve nişasta içeriklerinde önemli artışlara ve kontrol gruplarına kıyasla klorofil ve protein içeriklerinde ciddi düşüslere yol açtığını gözlemlenmiştir. Triasilgliserol seviyeleri, triasilgliserol/toplam lipid oranı ve lipid üretkenlikleri, tek başına azot açlığının etkileri ile karşılaştırıldığında kombine stres altında 7 günlük kültivasyondan sonra önemli ölçüde arttığı sonucuna varılmıştır.

Liang vd. (2017), *Dunaliella tertiolecta* türünde yaptığı çalışmada farklı tuzluluk oranları, N ve P açlığı ile indüklenen nötr lipidleri, ince tabaka kromatografisi (TLC), akış sitometrisi (FCM) ve konfokal lazer tarama mikroskobu (CLSM) ile analiz edilmiştir. Sonuç olarak *D. tertiolecta* türünde yüksek tuzluluk oranı, N ve P açlığında hücre büyümesinde ve klorofil içeriğinde bir azalış gözlemlenmiştir. Nötr lipid içerikleri, 3-7 günlük azot açlığından ve düşük NaCl konsantrasyonlarından sonra (0.5-2.0 M) belirgin şekilde artış gözlemlenmiş ve azot açlığı fosfor açlığına göre *D. tertiolecta* türünde nötr lipid içerikleri açısından daha önemli bir etkiye sahip olduğu saptanmıştır.

Gao vd. (2017), *Eustigmatos cf. Polyphem* türünde bu mikroalg türünün farklı azot kaynakları, (NaNO₃, NH₄ HCO₃ ve CO(NH₂)₂) seviyeleri (3, 6 ve 6, 0 mM azot

konsantrasyonu) ve ışık yoğunlukları altında (100 ve 300 μmol foton) kolon camlı bir fotobiyoreaktörde büyümesi, yağ asidi ve lipid üretimi incelenmiştir. *Eustigmatos cf. Polifem* türünde maksimum biyokütle üretiminin tüm azot muamelelerinde arttığı saptanmıştır. Aynı zamanda düşük ışık yoğunluğundan yüksek ışık yoğunluğuna gidildikçe biyokütlenin arttığı belirlenmiştir. Azot konsantrasyonu azaldıkça lipid içeriğinde azalma gözlemlenmiştir. Yüksek ve düşük ışık şiddeti altında 3,6 mM azot konsantrasyonu (NaNO_3 ile yetiştirilen kültürlerde en yüksek lipid içeriği, (NaNO_3 , $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, NH_4HCO_3)) elde edildiği görülmüştür.

Moussa vd. (2017), *Tetraselmis marina* türünde azot ve fosfor ortamındaki lipid ve karotenoid üretimini artırılması amaçlanmıştır. Hücreler ilk aşamada yedi gün boyunca F/2- ortamda büyütüldüğünde, karotenoid ve lipid içerikleri ve verimlilikleri sırasıyla 44 g/kg (DW), %27 ve %31 $\text{mg}^{-1}\text{L}^{-1}\text{d}^{-1}$ olarak gözlemlenmiştir. *T. marina* türü azotlu koşullarda (4.41 mM NaNO_3) 3 gün daha yetiştirilmesinin ikinci aşamasından sonra, biyokütle konsantrasyonun 1900 mg/L ve lipid içeriğinin %50 ve lipid üretkenliğinin 86,36 $\text{mg}^{-1}\text{L}^{-1}\text{d}^{-1}$ arttığı gözlemlenmiştir. SFA ve MUFA fraksiyonları sırasıyla %70,76 ve %13,14 olarak verilmiştir. Bununla birlikte, fosfor koşulları altında (2,08 mM NaH_2PO_4), karotenoid içeriği 89.23g/kg'a ve PUFA'sı, toplam lipidlerin %65'ine yükseldiği gözlemlenmiştir.

Chia vd. (2017), *C. vulgaris* türünde yaptığı çalışmada; değişen fosfor konsantrasyonları altında kadmiyuma maruz kalan *C. vulgaris* türündeki büyüme ve biyokimyasal bileşimindeki değişiklikleri incelemiştir. Mikroalglerin azalan P konsantrasyonları ve artan kadmiyum (Cd) konsantrasyonlarında büyümede azalma biyokimyasal bileşiminde ise önemli bir şekilde değişiklik gözlemlenmişlerdir. Aynı zamanda klorofil a, toplam karbonhidrat, toplam lipid ve toplam protein içeriği, P sınırlaması altında uyarıldığını ve Cd'nin varlığı her parametrenin miktarını arttırdığını tespit etmişlerdir.

Chu vd. (2019), *Chlorella* PY-ZU1 türünde fosfor fazlalığı ve sürekli iki aşamalı yetiştirme işleminde %15 CO_2 altında azot açlığı ile lipid üretiminin artırılması amaçlanmıştır. Sonuçlar, uygulanan stratejinin mikroalg biyokütle konsantrasyonuna ve fosfor takviyesi olmayanlara göre azdan çoğa sırasıyla 1,3 ve 2,2 kat daha yüksek lipid üretkenliğine izin verdiğini göstermiştir.

Yu vd. (2018), farklı fosfor konsantrasyonlarının, azot yeterliliği veya yoksunluk koşulu altında *Isochrysis zhangjiangensis* türünden biyodizel üretimine etkilerini incelemiştir. Hem N hem de P'nin bulunduğu koşulları altında, P ve N alımı kontrol grubuna göre 40 katı ve 4,7 katıydı, bu da *I. zhangjiangensis* türünün yüksek

konsantrasyonlu N ve P koşulları altında tuzlu atık sularından P ve N'yi uzaklaştırma kapasitesinin yüksek olduğu gözlemlenmiştir

Fu vd. (2019), *Chlorella regularis* türünde fosforun hücre canlılığı üzerine etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada, fosforun mikroalgler üzerinde hormonal etki yarattığı tespit edilmiştir. Azot kısıtlaması altında fazla fosfor kullanımı ($\leq 45 \text{ mgL}^{-1}$), *C. regularis* hücrelerinin büyümesini uyarmış ve %10,2'lik bir biyokütle üretimi artışı sağladığı gözlemlenmiştir. Aynı zamanda kontrol ile karşılaştırıldığında lipit üretkenliğini de %39,3 arttırdığı gözlemlenmiştir.

Huang vd. (2021), su ortamlarında mikroalglerin büyüme modelini daha iyi anlamak için, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklere dikkat ederek, miksotrofik ortamda *C. vulgaris* büyüme süreci üzerindeki N/P birleştirme etkisini incelemişlerdir. N/P seviyesinin değişimi özgül büyüme oranını biraz etkiledi ancak yetiştirilen *C. vulgaris* türünün besin alımını, biyokütle kuru ağırlığını ve klorofil içeriğini önemli ölçüde arttırdığı gözlemlenmiştir.

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Mikroalgin Temini ve Kùltürü

Acutodesmus deserticola E. Hegewald, C. Bock & Krienitz mikroalgi Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Algal Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda bulunan Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Mikroalag Kùltür Koleksiyonu'ndan (MAKUMACC-43; NCBI Accesion number/Kabul numarası: KT778051.1) elde edilmiştir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/1027590278>).

Domain: Ökaryot

Alem: Plantae

Şube: Chlorophyta

Sınıf: Chlorophyceae

Takım: Sphaeropleales

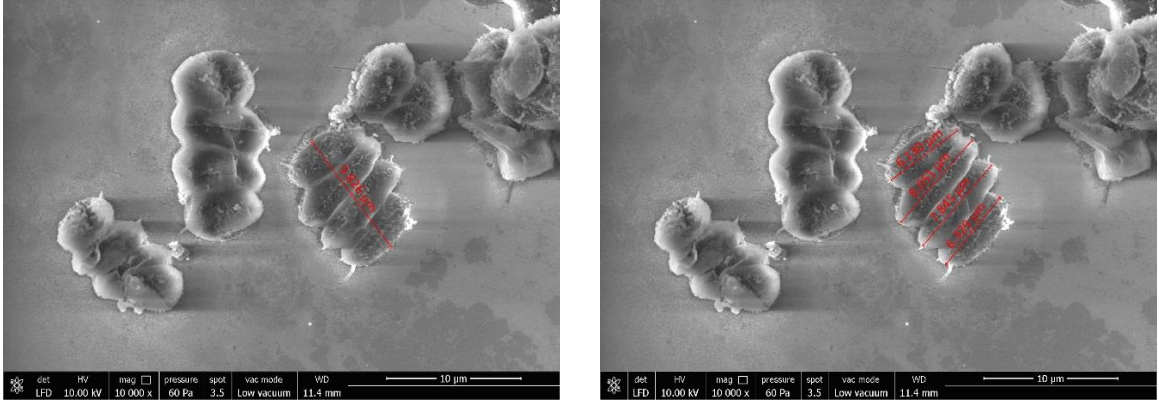
Familiya: Scenedesmaceae

Cins: *Acutodesmus*

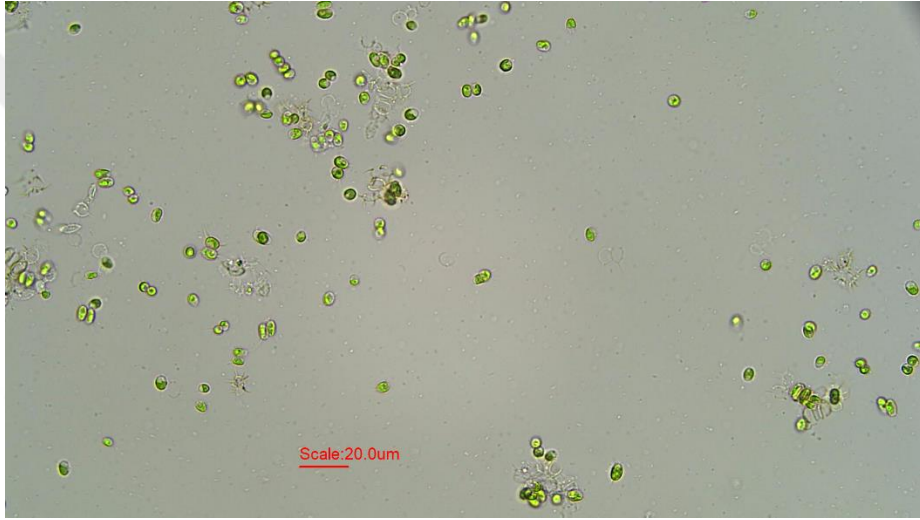
Tür: *Acutodesmus deserticola*

Acutodesmus deserticola türünün sinonimi *Tetradasmus deserticola* L.A.Lewis & Flechtner, basini is *Scenedesmus deserticola* L.A.Lewis & Flechtner' dır.

A. deserticola türünün materyal olarak seçilme sebebi kùltür optimizasyonunun yapılmış olması ve bu tez çalışmasında hedeflenen amaçlar için henüz kullanılmamış olmasıdır.



Şekil 3.1. *Acutodesmus deserticola* türünün taramalı elektron mikrografları (Özgün fotoğraf, MAKUMACC) ölçek çubuğu: 10 µm;



Şekil 3.2. *Acutodesmus deserticola* türünün ışık mikroskobu görüntüleri (Özgün fotoğraf, MAKUMACC) ölçek çubuğu: 10 µm

Mikroalg kontrol grubunda, daha önce bu tür ile yapılan kültür çalışmalarında kullanılan (Akgül vd., 2017) ve iyi ürettiği tespit edilmiş kültür ortamı olarak Bold Basal Medium (BBM) (**Tablo 3.1.**) (Cox ve Bold, 1966) kullanılmıştır.

Steril olan kültür ortamlarının her birinden 5 L hacimlerde erlenlere aktarılıp, stok kültürden eşit hücre sayısında aşılama yapılmıştır. 5 litrelik aşılama sıvı kültürler, iklimlendirme dolabında $24 \pm 4^\circ\text{C}$ 'de sıcaklıkta, $200 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{sn}^{-1}$ (15000 lux) ışık şiddetinde ve 12/12 (aydınlık/karanlık) fotoperiyodunda kültüre alınmıştır. Karışım ve havalandırma işlemi, 500 ml/dk havalandırma kapasitesine sahip hava pompaları ile yapılmıştır.

Kültürlerin gelişmelerini takip etmek için, hücre yoğunlukları, birinci günden itibaren takip edilerek, kültürün ölüm fazına girinceye kadarki süre içinde her iki günde bir, Thoma sayım kamarası ile tespit edilmiştir. Aynı zamanda kuru biyokütle ve Parsons ve Strickland (1963)'e göre, klorofil a miktarları belirlenerek kültürlerin gelişmeleri takip edilmiştir. Kontrol grubu kültüründe BBM kullanılırken, modifiye kültür ortamlarının azot ve fosfor yoğunlukları **Tablo 3.2.**'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Kontrol grubu, Bold Basal besi ortamının içeriği (Bold, 1966)

Besleyici Madde	Litreye Konacak Miktar
KH ₂ PO ₄	175 mg
CaCl ₂ .2H ₂ O	25 mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	75 mg
NaNO ₃	250 mg
K ₂ HPO ₄	75 mg
NaCl	25 mg
H ₃ BO ₃	11,42 mg
Micro Element Stock ^A	1 mL
Solution 1 ^B	1 mL
Solution 2 ^C	1 mL

^A: ZnSO₄.7H₂O, 8,82 g/L; MnCl₂.4H₂O 1,44 g/L; MoO₃ 0,71 g/L; CuSO₄.5H₂O 1,57 g/L; Co(NO₃)₂.6H₂O 0,49 g/L;

^B: Na₂EDTA, 50 g/L; KOH, 3,1 g/L; ^C: FeSO₄ 4,98 g/L H₂SO₄ (Conc.) 1mL/L

Bu çalışmamızda yeşil mikroalg türü olan *Acutodesmus deserticola* farklı azot (0,98 mmol/L 2,94 mmol/L(Kont.) 8,82 mmol/L) ve fosfor (0,573 mmol/L 1,72 mmol/L(Kont.) 5,16 mmol/L) konsantrasyonlarında kültüre alınmıştır. İçerikdeki N⁺ ve P⁺ oranları kontrol grubunun 3 katı N⁻ ve P⁻ grupları kontrol grubunun üçte biri oranındadır.

Tablo 3.2. *Acutodesmus deserticola* türünün kültür koşulları

Mikroalg	Sıcaklık	Fotoperiyot (saat)	Işık Şiddeti PPFD* $\mu\text{mol photons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$
Deney grupları	24°C (bütün gruplar için sabit)	12 a/12k (bütün gruplar için sabit)	200 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (15000 Lux) (bütün gruplar için sabit)

*: Photosynthetic Photon Flux Density

Tablo.3.3. *Acutodesmus deserticola* türünün kültürdeki nutrient değerleri ve oranları

Kültür ortamları	N Konsantrasyon mmol/L	P Konsantrasyon mmol/L	N:P
Kontrol	2,94	1,72	1,7
N⁺	8,82	1,72	5,12
N⁻	0,98	1,72	0,57
P⁺	2,94	5,16	0,57
P⁻	2,94	0,573	5.13

3.2. Hücre Sayısının Belirlenmesi

Kültürün büyümesini izlemek için hücre sayısı 3 günde bir kültürlerden örnekler alınıp ve Thoma sayım slaydı üzerinde sayılmıştır. Elde edilen veriler Spesifik büyüme oranı ve ikiye katlanma süresinin hesaplanması için kullanılmıştır. Her kültürden sayımın yapıldığı her gün, 3 tekrarlı numune alınıp sayımı yapılmış, ortalama değerler hesaplanmıştır.

3.3. Optik Yoğunluğun Belirlenmesi (OD)

Hücre yoğunluğunun belirlenmesi için optik yoğunluk (Optical Density=OD) tayini, hücre sayımının yapıldığı günlerde homojen numune alınmasına dikkat edilerek 1 mL kültür alınıp 680 nm’de spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. Hücre sayısı ile optik yoğunluk arasında korelasyon kurulmuştur (Ballardo vd., 2015).

3.4. Kuru Biyokütle Ağırlık Tespiti

Kültürün büyüme sürecinde kültür durumu hakkında bilgi veren parametrelerden biri de kültürdeki biyokütle ağırlığıdır. Bunun için; hücre sayısı ve optik yoğunluğunun belirlendiği aynı günlerde kültürlerden 10 mL numune alınıp, filtre kâğıdı (MN 640 d Ø 125 mm) ile süzülerek, 40°C’de etüvde kurutulmuş ve aşağıdaki denklemle belirlenmiştir. (Vonshak, 1986):

$$Kuru\ ağırlık = filtre\ son\ ağırlığı - filtre\ başlangıç\ ağırlığı\ (g / L) \quad (1)$$

3.5. Spesifik Büyüme Oranı ve İkiye Katlanma Süresi

Spesifik büyüme oranı (Specific growth rate = μ); ikiye katlanma süresi (Doubling time=Dt); ve Biyokütle üretkenliği (Biomass productivity = BP), oluşturulan her tür için ayrı

ayrı hesaplanmıştır. Bu değerlerin hesaplamaları aşağıdaki gibi yapılmıştır. Spesifik büyüme oranı (μ) aşağıdaki gibi hesaplanmıştır (Chia vd., 2013).

$$\mu = \ln \left((N_t - N_0) / (D_t - D_0) \right) \quad (2)$$

N_t log aşamasının sonundaki hücre sayısı, N_0 log aşamasının başlangıcındaki hücre sayısı, D_t log aşamasının son günü ve D_0 log aşamasının başlangıç günüdür. (Chia vd., 2013). Biyokütle üretkenliği aşağıdaki eşitlik ile bulunabilir (Godoy-Hernández vd., 2006).

$$BPg/L/gün = (X_2 - X_1)(t_2 - t_1) \quad (3)$$

X_2 en yüksek kuru ağırlık değeri, X_1 en düşük kuru ağırlık değeri t_2 kültürün son günü t_1 kültürün ilk günü temsil etmektedir.

3.6. Klorofil-a Miktarının Tespiti

Kültür büyümesini gözlemlemek için hücre sayısı, OD ve kuru biyokütle ağırlığının tespit edildiği aynı günlerde klorofil-a miktarı tayini için aşağıdaki adımlar uygulanmıştır (Lichtenthaller, 1987).

- 1 mL kültür örneği alınıp 2 mL ependorf tüpüne konmuş ve 13000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilip ve ardından, süpernatant pelletten ayrılmıştır.

- Pellet üzerine 2 mL metanol (%99) eklenmiştir. 60 °C’de sıcak su banyosunda 30 dakika inkübe edilip ardından 10 dakika buz üzerinde bekletilmiş ve 13000 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

- Kör (Kalibrasyon çözeltisi) olarak %99 metanol kullanılmış ve spektrofotometrede 665,2 ve 652,4 nm’de ölçülmüştür.

Hesaplama aşağıdaki formül kullanılarak yapılmıştır.

$$Klorofil\ a\ (Kl - a) = 16.72 (A_{665.2}) - 9.16 (A_{652.4}) \quad (4)$$

3.7. Toplam Protein Tayini

Kromatografik analizler için GCMS kullanılmıştır. Taşıyıcı gaz (ultra saf helyumdan geçen) akış hızı 1.54 mL dk⁻¹ kullanılmıştır. Enjeksiyon sıcaklığı, bölünmesiz modda 1 dakika bölünmesiz süre ile 300 °C’ye ayarlanmıştır. Her analiz için 1 µL enjeksiyon hacmi kullanılmış ve şırınga her enjeksiyon arasında heksan ile yıkanmıştır. Ayırma, Agilent’ten Select PAHs® tarafından yapılmıştır.

Fırın sıcaklığı parametreleri: başlangıç sıcaklığı 70°C 0,4 dakika tutulmuş dakikada 70°C arttırılarak 180°C çıkarılmış, dakikada 7°C arttırılarak 230°C çıkarılmış, 7 dakika

tutulmuş, dakikada 50°C arttırılarak 280°C çıkarılmış, 7 dakika tutulmuş ve dakikada 30°C arttırılarak 350°C ulaşılmış ve bu sıcaklıkta 4 dakika bekletilmiştir.

MS parametreleri: 70 eV enerjili elektron darbeleri iyonizasyon ve iyon kaynağı ve arayüz sıcaklığı sırasıyla 300 °C ve 275 °C'ye ayarlanmıştır. MS sistemi rutin olarak 2 dakikalık bir solvent gecikmesiyle seçici iyon izleme (SIM) moduna ayarlanmıştır (Akdoğan vd., 2020).

3. 8.Amino Asit Analizi

Numune hazırlık için 5 g *Acutodesmus deserticola* örneği alınarak üzerine 20 mL 6N HCl eklenmiştir. Hidrolizasyon için 110 °C'de 24 saat bekletilmiştir. Daha sonra hacim 25 mL'ye deiyonize su ile tamamlanmıştır. Hidrolizattan alınmış, HCl'in etkisinin giderilmesi için evapore edilmiştir. Örnek üzerine 100 µL 2 N NaOH, 150 µL doymuş sodyum bikarbonat ve 1 mL dansil klorür konulmuştur. Karışım 40°C'de 45 dakika inkübe edilmiştir. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra üzerine 50 µL %25 NH₃ eklenmiştir. 30 dakika daha oda sıcaklığında bekletilerek üzerine 5 mL amonyum asetat: asetonitril eklenmiştir. 0.45 µm'lik filtreden geçirilip HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Örnekler 254 nm' de ölçülmüştür (Bremner, 2016).

3.9. Ham Yağ Analizi (Soxhlet)

10 g *Acutodesmus deserticola* kuru biyokütle tartılmış ve ardından, tartılan ekstraksiyon beherine yerleştirilmiştir. Deney esnasında 150 mL petrol eteri ilave edilmiştir. Aşamaları; ekstraksiyon adımı süresi (5 dakika); durulama adım süresi (30 dakika); kurutma adım süresi (5 dakika). Yağ bir azot akımı ile kurutulmuş ve analize kadar -20°C'de saklanmıştır (Canbay, 2019).

3.10.Yağ Asitleri Analizi

Numune Hazırlık için kuru mikroalg örneği alınmış üzerine 20 mL (2:1 Kloroform: metanol) eklenmiş, ekstraksiyon edilmiş sonra da organik faz alınarak evapore edilmiştir (Bligh vd., 1959). Elde edilen mikroalg örneklerine ait yağlar türevlendirilerek GC-MS'de analiz edilmiştir. Türevlendirme, 1,5 M metanolik HCl kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yağ asitleri analizi için, HP-88 (100* 0.250 * 0.20 µm) kolonu kullanılmıştır. Tüm örneklerin yağ asidi kompozisyonu GC-MS sistemi (AGILENT 5975 C AGILENT 7890A GC)) ile gerçekleştirilmiştir. Kolon başlangıç sıcaklığı 60°C olarak ayarlanmış, 1 dakika sonra dakikada 13°C'lik artışla 175°C'ye oradan da 4°C'lik artışlarla 215°C'ye çıkarılmıştır ve bu

sıcaklıkta 35 dakika beklenmiştir. Enjektör ve dedektör sıcaklığı 250°C olarak ayarlanmıştır (Bardakçı ve Seçilmiş, 2006).

3.11. Toplam Fenolik Madde Analizi

A. deserticola türünün fenolik bileşikleri, Cortesi, Ponziani ve Fedeli (1981) tarafından açıklanan yöntemle göre ekstrakte edilmiş ve saflaştırılmıştır. Gallik asit (mg/kg) olarak ifade edilen toplam fenoller, Favati, Caporale ve Bertuccioli (1994) tarafından tarif edildiği gibi Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak 765 nm’de kolorimetrik olarak belirlenmiştir. Fenolik bileşiklerin kalitatif ve kantitatif değerlendirmeleri, dahili standart olarak gallik asit kullanılarak fenolik ekstraktların HPLC ile analiz edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. HPLC sistemi, 250x4.6 mm C18 Ultrasphere-ODS kolonu ile donatılmış bir Beckman kromatografından oluşmakta olup; elüatlar 278 nm’de tespit edilmiştir. Kullanılan mobil faz, (A) su içinde (B) metanole karşı %2 asetik asittir. Örnekler metanol içinde çözündürülüp ve bu çözeltiden 10 µl kolona enjekte edilmiştir (Caponio., 1999).

3.12. Antioksidan Aktivite Tayini

Antioksidan aktivitesini incelenmek için Askorbik asit belirlenmiştir. Antioksidan aktivite tayini için Askorbik asidin seçilmesinin en büyük nedeni ise çok yüksek antioksidan aktiviteye sahip olmasıdır DPPH testi, basit olması, düşük maliyetli olması ve basit bir spektrofotometre kullanması nedeniyle sıklıkla kullanılan iyi bilinen bir yöntemdir (Njus vd., 2020).

- Ekstrasyon işlemi için 3 g *Acutodesmus deserticola* örneği tartılıp ardından örnek üzerine 45 mL metanol ilave edilip örnek 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- 24 saat sonunda 6000 rpm de 15 dakika santrifüj işlemine tabi tutulup ardından bu adım birkaç kez tekrar edilip, süpernatantlar boş bir balon joje içerisinde biriktirilmiştir.
- Daha sonra evaporatör cihazında (Heidolph Laborata 4000 efficient) 45 °C’ de metanol uzaklaştırılıp ham özüt elde edilmiştir.
- Analiz sırasında kullanılan konsantrasyonlar 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12,5 µg/mL olarak belirlenmiştir. Konsantrasyonların hazırlanışı 2 mL eppendorf tüpler içerisinde 7 konsantrasyonu hazırlamak için her bir tüpün içerisine 1 mL metanol eklenmiş ve ilk konsantrasyon olan 800 µg/mL den 1mL alınıp ve ikinci tüpe aktarılmıştır. Bu şekilde seri dilüsyonlar yapılarak tüm konsantrasyonlar hazırlanmıştır.

- Askorbik asit çözeltisini hazırlamak için 1 mg Askorbik asit (AA) 50 mL metanol içerisinde çözdürülmüştür. Analiz sırasında kullanılan konsantrasyonlar 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,6 µg/mL olarak belirlenmiştir.

- Konsantrasyonların hazırlanışı 2 mL eppendorf tüpler içerisinde 6 konsantrasyon için her bir tüpün içerisine 1 mL Askorbik asit eklenmiş ve ilk konsantrasyon olan 20 µg/mL den 1mL alınıp ve ikinci tüpe aktarılmıştır. Bu şekilde seri dilüsyonlar yapılarak tüm konsantrasyonlar hazırlanmıştır.

- 0,1mM DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) çözeltisini hazırlamak için 0,6 mg DPPH tartılıp ve 15 mL metanol içerisinde hazırlanıp ardından 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. (Blois ,1958). IC50 değeri başlangıçtaki DPPH derişiminin %50'sinin azalması için gerekli olan derişim olarak bilinmektedir (Yıldız vd., 2020)

Tüm örnek ve Askorbik asitlerden 800 µl alınmış spektrofotometre küveti içerisine eklenmiştir Spektrofotometre küvetleri üzerine 200 µl hazırlanan DPPH dan eklenip oda sıcaklığında 30 dakika karanlıkta bekletilmiş ve ardından örnekler 517 nm’de ölçülmüştür. Aşağıdaki formül kullanılarak hesaplama yapılmıştır.

$$\text{Antioksidan Aktivite} = [(A_0 - A_{\text{sample}})/A_0 * 100] \quad (5)$$

A₀= DPPH +metanol absorbansı

A_{sample}= Örnek + metanol + DPPH

3.13. Antimikrobiyal Aktivite Tayini (MIC Analizi)

-80°C derecede donmuş *Escherichia coli* kültürünün aktifleştirilmesi için, 1 adet cam tüp içerisine 6 mL sıvı besiyeri (Müller Broth) eklenmiştir. Stok *E. coli* içerisinden öze yardımıyla bir miktar alınmış ve tüpün içerisine konulmuştur. 24 saat aktifleşme için inokülasyona bırakılmıştır. İnokülasyon sonunda cam tüp içerisinden bir miktar öze yardımıyla kültürden alınıp ve Müller agarlı petri içerisine transfer yapılmıştır. Transfer aşaması sonunda 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bakteri kültürleri 0,5 McFarland’ lık bir bulanıklığa ayarlanmıştır. Bakteri kültüründen 2 mL alınıp 18 mL MB besiyeri içerisinde eklenerek seyreltme işlemi yapılmıştır.

4000 µg/mL konsantrasyonunda stok mikroalg örneği hazırlanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda (1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625 µg/mL) mikroalg örnekleri 600 µl MB + bakteri karışımı içerisinde hazırlanmıştır. 96’lık mikropłakanın her bir kuyucuğuna 200 µL MB, bakteri ve mikroalg örnek karışımından konulmuştur. Mikropłaka

suşların büyümesi için 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. UV-Vis spektrofotometrede 400 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür. Pozitif kontrol olarak bakteri +Müller, negatif kontrol olarak Müller+ mikroalg kullanılmıştır.

0,5 McFarland analiz sonucunda elde edilen bakteri konsantrasyonunun doğruluğu, agar petride sayım yapılarak kontrol edilmiştir. Ependorf tüpün içerisine 900 µl fizyolojik su ve 100 µl örnek konularak birinci seyreltme yapılmıştır. 10^{-7} 'ye kadar seri seyreltme yapılmıştır. Önceden petriyeri içerisine katı besiyeri hazırlanmıştır. Katı besiyeri dört bölüme ayrılmıştır. Her bir bölüme seri seyreltmeler içerisinden 4 tanesi (örneğin 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4}) alınıp damla yöntemiyle ekim yapılmıştır. Her seyrelme için 3 damla 20 µL damlatılmıştır. 37°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Aşağıdaki formüle göre bakteri konsantrasyonu hesaplanmıştır (Nainangu vd., 2020).

$$(TKS/3) \times DF \times 50 = BK(CFU/mL)$$

Toplam koloni sayısı= TKS

Dilüsyon Faktörü= DF

Bakteri Konsantrasyonu= BK

(6)

3.14. İstatiksel Analiz

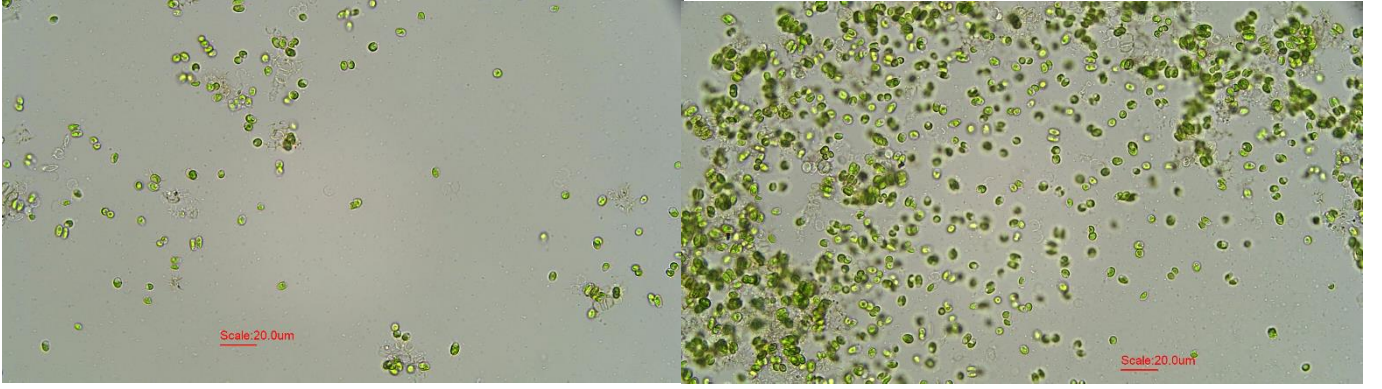
Tüm deney grupları 3 kez tekrarlanmıştır. Bildirilen değerler, üç değerın ortalama $\pm$ standart sapmasıdır. Veriler, Minitab Statistical Software (2016) (Microsoft, ABD) ile tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak analiz edilmiştir. Önem düzeyi $p < 0,05$ farklılık anlamlı kabul edilmiştir

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

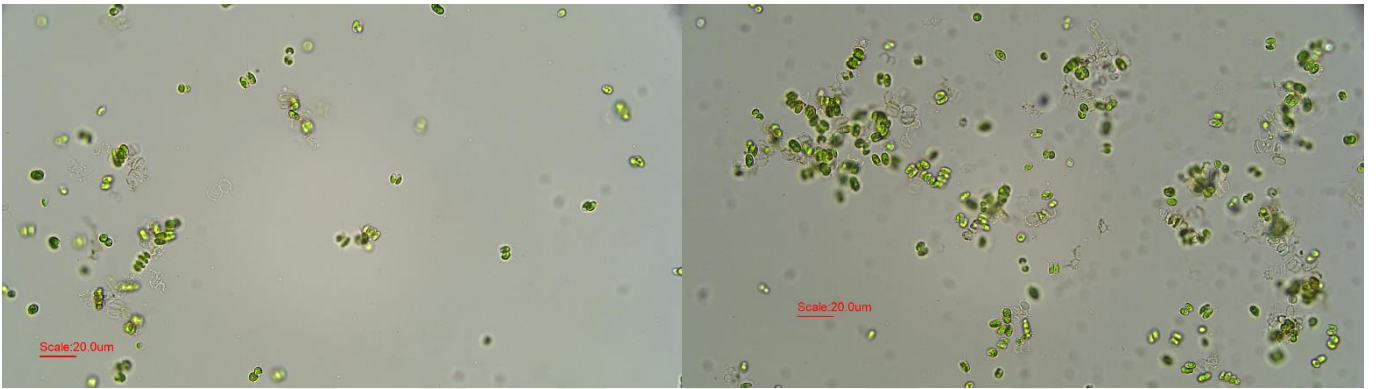
4.1. Mikroskopik Gözlem Sonuçları

Tablo 4.1. *Acutodesmus deserticola* mikroalg hücre ve kolonilerinin beş farklı kültür ortamındaki morfolojik özellikleri

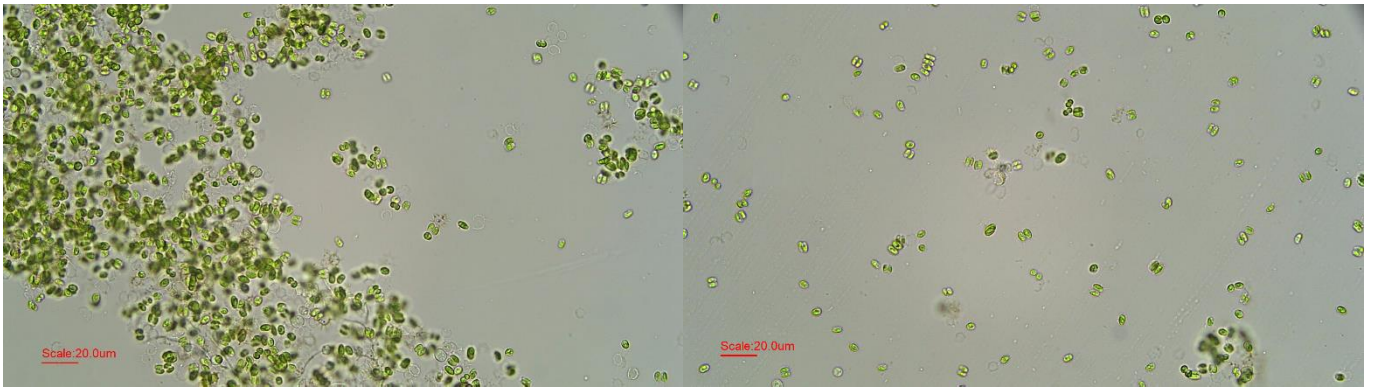
<i>Acutodesmus deserticola</i>	Kolonideki hücre Sayısı	Kloroplast şekli ve yapısı	Spine (diken ya da boynuz) varlığı	Hücrelerin Boyutları
K	1,2 ve 4	Kloroplast parçalı ve hücre içini doldurmamış durumda.	Nadiren ortaya çıkmış, çoğu zaman yok.	Hücreler ortalama büyüklükte
N⁺	2 ve 4	Kloroplast tüm hücreyi doldurmuş şekilde ve parçalı değil.	Hemen hemen tüm kolonilerde var.	Hücreler ortalama büyüklükte
N⁻	1 ve 2	Kloroplast tüm hücreyi doldurmuş şekilde, parçalı değil.	Tüm kolonilerde var ve belirgin.	Hücreler daha küçük
P⁺	1 ve 2	Kloroplast parçalı ve hücre içini doldurmamış durumda.	Hemen hemen tüm kolonilerde var.	Hücreler ortalama büyüklükte
P⁻	1 ve 2	Kloroplast tüm hücreyi doldurmuş şekilde, parçalı değil.	Hemen hemen tüm kolonilerde var.	Hücreler çok daha büyük



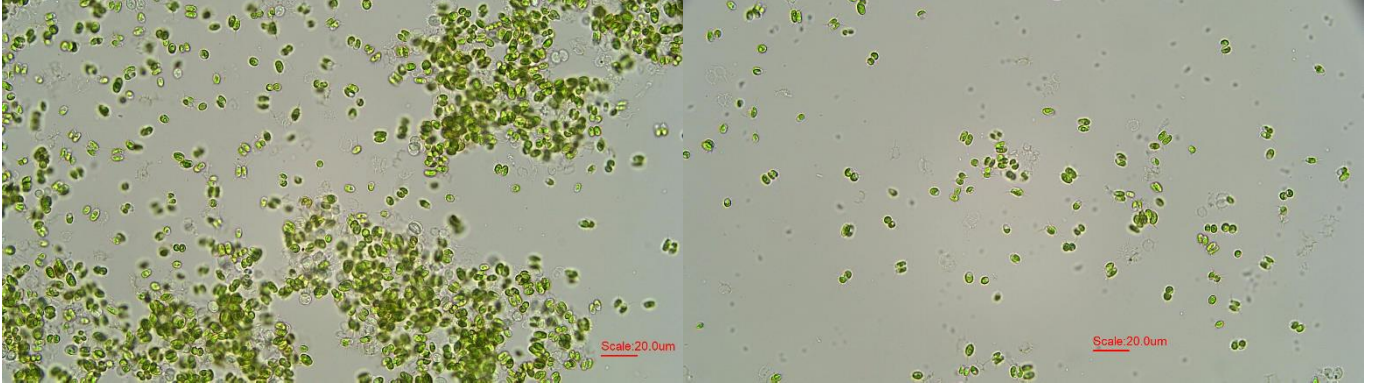
Şekil 4.1. *Acutodesmus deserticola* türünün K grubu ışık mikroskobu görüntüsü
(Özgün fotoğraf, MAKUMACC) ölçek çubuğu: 20 µm



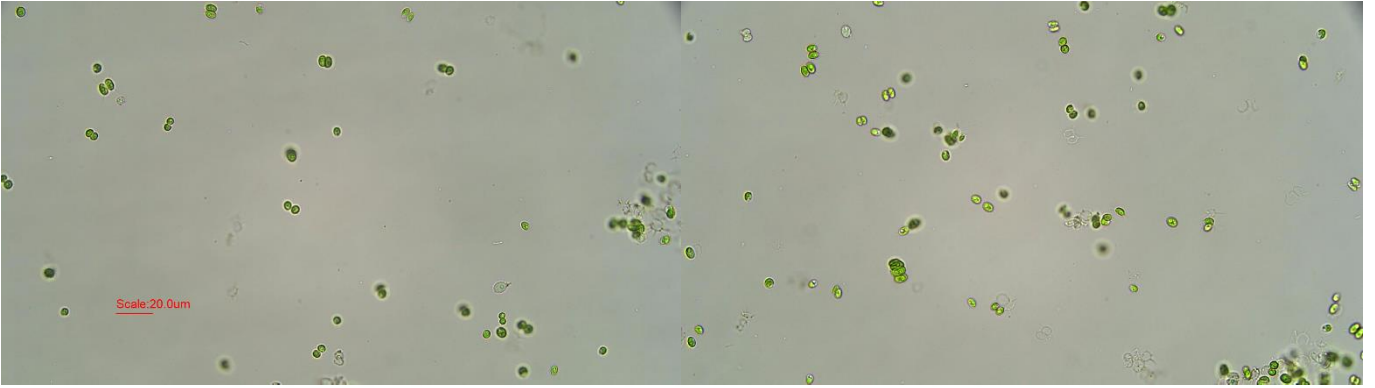
Şekil 4.2. *Acutodesmus deserticola* türünün N⁺ grubu ışık mikroskobu görüntüsü
(Özgün fotoğraf, MAKUMACC) ölçek çubuğu: 20 µm



Şekil 4.3. *Acutodesmus deserticola* türünün N⁻ grubu ışık mikroskobu görüntüsü
(Özgün fotoğraf, MAKUMACC) ölçek çubuğu: 20 µm



Şekil 4.4. *Acutodesmus deserticola* türünün P⁺ grubu ışık mikroskobu görüntüsü
(Özgün fotoğraf, MAKUMACC) ölçek çubuğu: 20 µm



Şekil 4.5. *Acutodesmus deserticola* türünün P⁻ grubu ışık mikroskobu görüntüsü
(Özgün fotoğraf, MAKUMACC) ölçek çubuğu: 20 µm

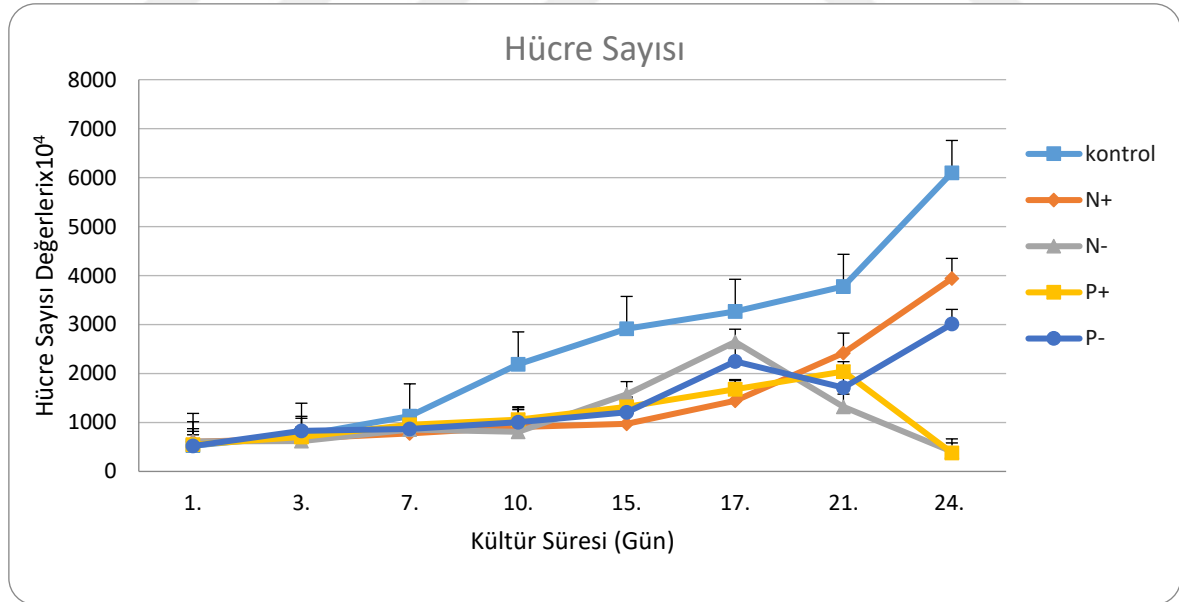
Pancha vd. (2014) *Scenedesmus* sp. türünde yaptığı çalışmada, azot sınırlamasının yanı sıra ardışık azot gideriminin *Scenedesmus* sp. türünde morfolojik değişiklikleri nasıl tetiklediğini incelemişlerdir. Azot bakımından limitasyona uğramış hücrenin morfolojisi tek hücreden; 2 ve 4 hücreli sönobiya (yalancı koloni) değiştiği gözlemlenmiştir.

Hücre başına dikenlerin uzunluğunun ve sayısının nitrat sınırlamasındaki artışla veya ortamdan sıralı azot çıkarılmasıyla arttığını gözlemlemişlerdir. Hernandez- Garcia vd. (2019) *Desmodesmus* spp. ve *Scenedesmus obliquus* türlerinde azotun bulunması durumunda morfolojik değişimleri incelemişlerdir. Her iki mikroalg de parçalanma ve 2 ve/veya4 hücreli sönobiya (veya koloni) oluşumu gözlemlenmiştir. Besiyerinde bulunan azot miktarındaki artışından dolayı, *Desmodesmus* spp. türünde dikenlerin kaybolması gözlenmiş olup, ortamdaki nitrat konsantrasyonunun *Scenedesmus* sp. sönobiyaların dağılmasına neden olabileceğini bildirmiştir. Yapılan bu çalışmada azot bakımından zengin

olan ortamdaki kolonideki hücre sayısı Hernandez- Garcia vd. (2019) gözlemlediği gibi 2 ve 4 hücreli koloni görülmüştür. Spinler kontrol grubunda nadiren ortaya çıkmasına rağmen stres uyguladığımız gruplarda genelde tüm kolonilerde belirgin bir şekilde gözlemlenmiştir. Hücrelerin boyutları incelendiğinde azot bakımından yoksun olan grupta oldukça küçük olduğu gözlemlenmiş olup fosfor bakımından yoksun olan grupta diğer gruplara göre oldukça büyük olduğu saptanmıştır. Fosforun ortamda eksik olması, hücrelerin boyutunun artmasına neden olduğu görülmektedir.

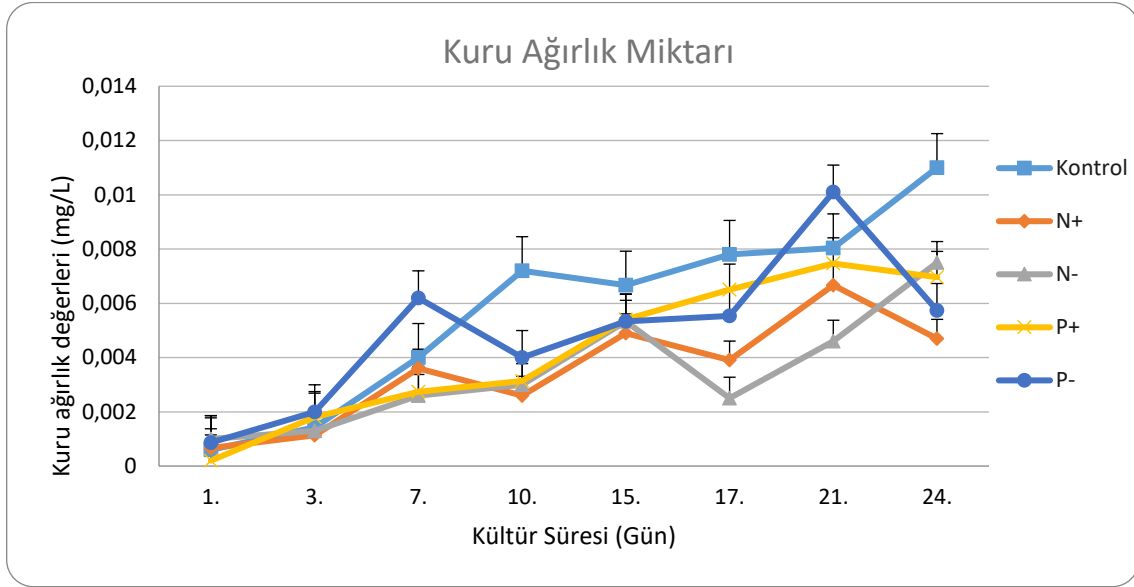
4.2. Kültür Büyüme Parametreleri

Hücre sayısı tespiti, 24 günlük kültüvasyon süresince 3 günde bir, her kültürden 2 mL örnek alınarak yapılmıştır. Kontrol grubu için en düşük ve en yüksek hücre sayısı değerleri 1. gün 526×10^4 hücre/mL ve 24. gün 6100×10^4 hücre/mL, N^+ grubu için 1.gün $604,5 \times 10^4$ hücre/mL ve 24.gün 3940×10^4 hücre/mL, N^- grubu için 24. gün 405×10^4 hücre/mL ve 17. gün 2645×10^4 hücre/mL, P^+ grubu için 21.gün 2040×10^4 hücre/mL 24.gün 380×10^4 hücre/mL, P^- grubu için en yüksek ve en düşük hücre sayısı değerleri 24.gün 3010×10^4 hücre/mL ve 1.gün $519,5 \times 10^4$ hücre/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.6).



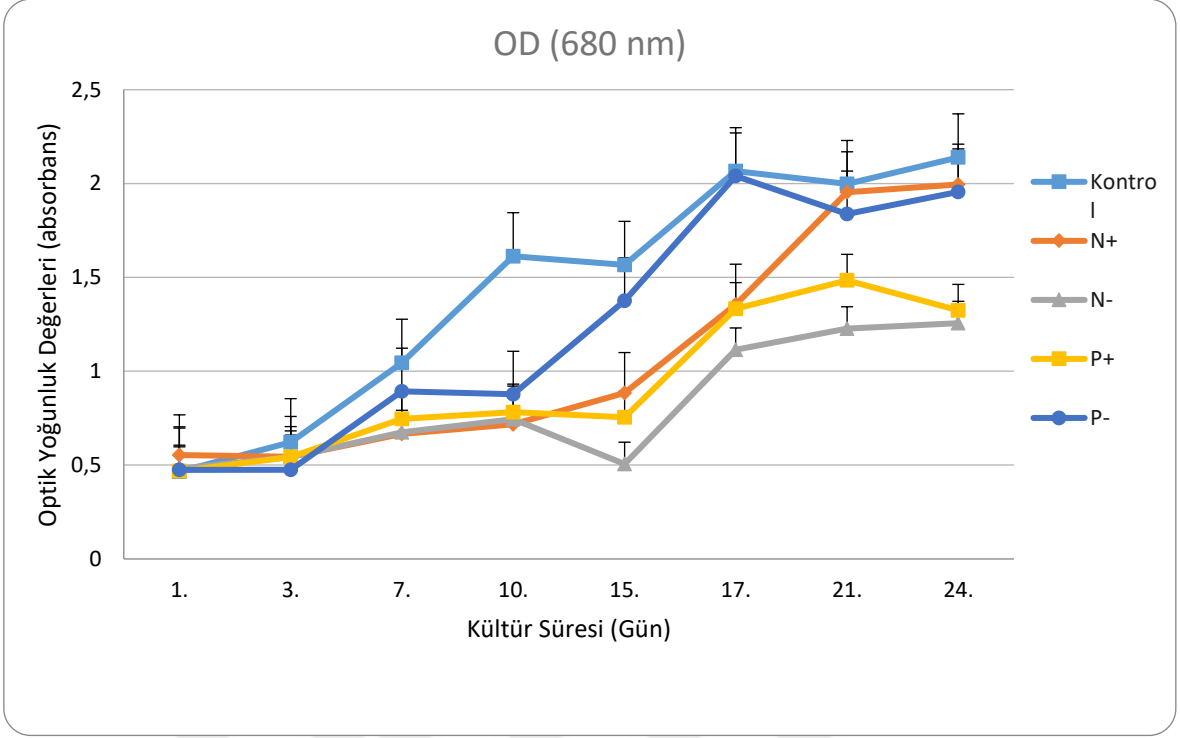
Şekil 4.6. Beş farklı kültür ortamında yetiştirilen *Acutodesmus deserticola* türünün hücre sayısı değerleri. Hata çubukları, 3 tekrar arasındaki standart sapmayı temsil eder (n=3).

Hücre sayısı tespitinin yapıldığı günlerde her kültürden 10 mL örnek alınarak kuru ağırlık ölçümleri yapılmıştır. Kontrol grubu için en yüksek kuru ağırlık değeri 24. günde 0,011 mg/L olarak hesaplanmıştır (**Şekil 4.7**). En yüksek kuru ağırlık değerleri; kontrol grubu için 24.gün 0,011; N⁺ grubu için 21. günde 0,007 mg/L, N⁻ grubu için 24. günde 0,006 mg/L, P⁺ grubu için 21. günde 0,007 mg/L. P⁻ grubu için 21. günde 0,0101 mg/L olarak hesaplanmıştır.



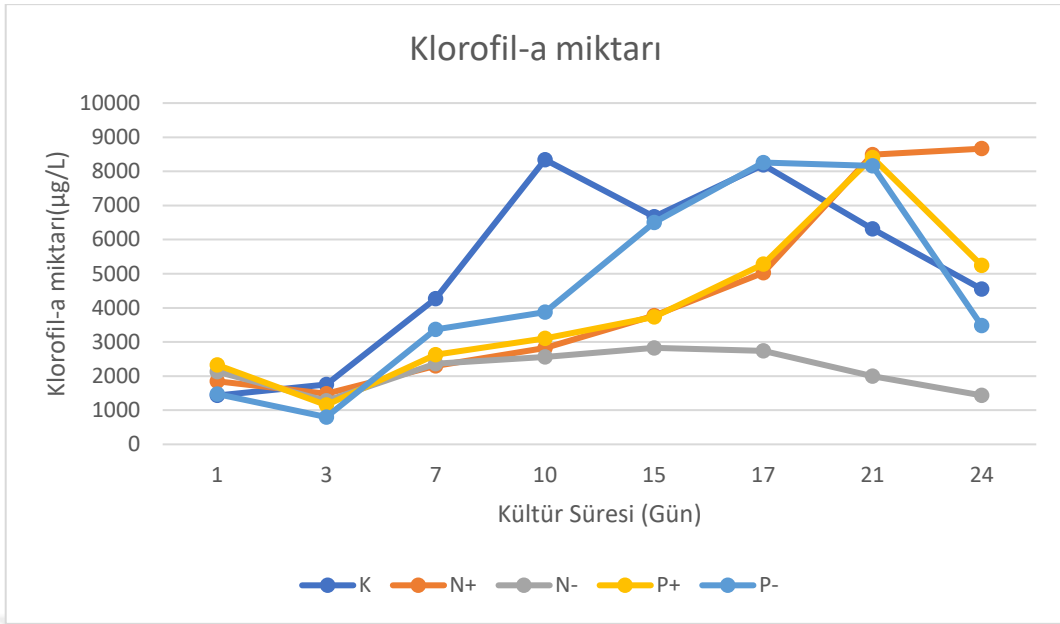
Şekil 4.7. Beş farklı kültür ortamında yetiştirilen *Acutodesmus deserticola* türünün kuru ağırlık değerleri. Hata çubukları, 3 tekrar arasındaki standart sapmayı temsil eder (n=3).

Hücre sayısı ve kuru ağırlık değerlerinin tespit edildiği günlerde, her kültürden 1 mL örnek alınıp 680 nm’de spektrofotometrik absorbans ölçümleri yapılarak OD değerleri belirlenmiştir. Kültür başlangıç absorbansı 0,5 abs olarak belirlenmiş ve 24. günde kültür sonlandırılmıştır. En yüksek OD değerleri; kontrol grubunda 24.günde (2,13 abs), N⁺ grubunda 21. günde (1,95 abs), N⁻ grubunda 24. günde (1,25 abs), P⁺ grubunda 21.günde (1,48 abs) ve P⁻ grubunda 17. günde (2,04 abs) gözlemlenmiştir (**Şekil 4.8**).



Şekil 4.8. Beş farklı kültür ortamında yetiştirilen *Acutodesmus* türünün 680 nm'deki OD değerleri. Hata çubukları (SD, n=3), 3 tekrar arasındaki standart sapmayı temsil eder (n=3).

Diğer kültür büyüme parametrelerinin tespit edildiği günlerde her bir kültürden örnekleme yapılarak klorofil a (Kl-a) değerleri hesaplanmıştır. En yüksek Kl-a değerleri; kontrol grubu için 10. günde 8343 $\mu\text{g/L}$, N⁺ grubu için 24. günde 8663 $\mu\text{g/L}$, N⁻ grubu için 15. günde 2828 $\mu\text{g/L}$, P⁺ grubu için en değeri 21. günde 8404 $\mu\text{g/L}$, P⁻ grubu için 17. günde 8258 $\mu\text{g/L}$ olarak saptanmıştır (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. Beş farklı kültür ortamında yetiştirilen *Acutodesmus deserticola* türünün klorofil-a değerleri. Hata çubukları, 3 tekrar arasındaki standart sapmayı temsil eder (n=3).

Chu vd. (2020) *Chlorella vulgaris* türünün 3 farklı ortamda kültüre alıp incelemişlerdir. Maksimum hücre sayısını N^+P^+ koşullarına ait ortamda $2,82 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ olarak hesaplamışlardır.

Mirshekari vd. (2019) azot yoksunluğunda *Dunaliella salina* türünde salisilik asit etkisinin neden olduğu metabolik değişiklikleri incelemişlerdir. Yapmış oldukları çalışmada 4 farklı grup mevcut olup bu gruplar normal konsantrasyondaki besi yeri (NC), azot bakımından yoksun (ND), salisilik asit (SA) ve ND+SA gruplarıdır. Aynı zamanda incelenen bu gruplarda hücre sayısına da bakmışlardır. ND grubunda 48 saat sonra NC'ye göre hücre sayısı değerleri önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir. En yüksek hücre sayısına sahip grubun SA grubu olduğu tespit edilmiştir.

Fae Neto vd. (2018), düşük maliyetli farklı kültür ortamlarında *Nannochloropsis oculata* türündeki karotenoid üretimini incelemişlerdir. Bu çalışmada 5 farklı kültür ortamı kurulmuş ve bunlar F2(F/2), üre ve amonyum içeren gübre ortamı (MF), üre içeren gübre ortamı (MFU), amonyumlu gübre ortamı (MFA) ve biyoflok (BF) atık sularıdır. *N. oculata* türü bu 5 ortamda kültüre alınmış ve hücre sayıları incelenmiştir. Kültürün başlangıcından 16. günün sonuna kadar en yüksek hücre sayısına sahip grup F/2 ortamı olarak belirlenmiştir. Durmaz vd. (2018), *Chlorella vulgaris* türünü 2 farklı besi ortamında kültüre almışlar ve mikroalg türündeki kültür büyüme parametrelerini incelemişlerdir. *C. vulgaris* kültürlerinde, F/2 ve Jaworski (JM) olmak üzere iki farklı besin ortamı kullanılmıştır. Yapılan bu

araştırmada hücre sayısı değerleri 6. güne kadar eşit gitmiş ve ardından JM ortamı içeren kültürde gözle görülür bir artış gözlemlenmiştir. Maisarah vd. (2020), farklı fosfor içeren ortamlarda *Scenedesmus* sp. türündeki değişimleri gözlemlenmiştir. *Scenedesmus* sp. bu fosfat ortamlarında adenoazin 5'- monofosfat (AMP), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) ve sodyum tripolifosfat (STPP) kültüre alınmış olup farklı konsantrasyonlarda incelenmiştir. (0,2 ppm/0,4 ppm /0,6 ppm/1 ppm). KH_2PO_4 grubunda en yüksek hücre sayısına sahip olan grup 1 ppm, STPP grubunda en yüksek hücre sayısına sahip olan grup 0,6 ppm ve 1 ppm AMP grubunda en yüksek hücre sayısına sahip olan grup 0,6 ppm olan grup olarak gözlemlenmiştir.

Acutodesmus deserticola türünde en yüksek kuru ağırlık seviyesi (**Şekil 5.2.**) 24. günde (0,011 mg/L) gözlemlenmiştir. Mathimani vd., (2021) *Chlorella* sp. ve *Scenedesmus* sp. türleri üzerinde kuru ağırlık tahmini üzerinde çalışmışlardır. Bold bazal medium (BBM) ortamında bu türler 24 gün boyunca kültüre alınıp değerler ölçülmüştür. Test edilen mikroalg suşları *Chlorella* sp. ve *Scenedesmus* sp. türleri 24. günün sonunda sırasıyla yaklaşık 1,3 ve 1,2 g/L'de maksimum kuru ağırlık ürettiği bulunmuştur. *Scenedesmus* sp. için 18. günde daha yüksek biyokütle verimi gözlemlenirken, *Chlorella* sp. 20. günde daha fazla biyokütle sağlamıştır. Bu farkın temel nedenlerinden biri çalışmada kullanılan türün farklı olmasıdır. Lin vd. (2020), *Scenedesmus abundans* türü üzerinde biyohidrojen üretiminin atık suundaki (Uçucu yağ asidi (Volatile fatty acids)) VFA'ları biyokütle ve lipitlere dönüştürmek üzerine çalışılmıştır. Bu çalışmada dört farklı deney grubu kullanılmıştır. Bu deney grupları; kontrol grubu BG-11, azot yoksunluğu bulunan BG-11, düşük konsantrasyonlu (0,3x) atık madde ilaveli ortam ve yüksek konsantrasyonlu (0,5x) atık madde ilaveli ortam kullanılmıştır. *Scenedesmus abundans* türünün dört farklı deney grubundaki kuru ağırlık miktarında ilk 8 günde artış gözlemlenirken azot tüketimi eşit oranlara sahip olduğu tespit edilmiştir. 9. günden itibaren azalan azot tüketimine rağmen kuru ağırlık miktarında 2 g/L'den daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Kuru ağırlığın yanı sıra OD değerlerine (682 nm) de bakılmıştır. En yüksek OD değeri kontrol grubunda, en düşük değeri ise 0,5x atık madde ilaveli ortamda olduğu gözlemlenmiştir. Mutlu vd., (2011), azot ve fosfor (%50 N, %100 N, %50 N⁺ %50 P ve %50 P⁻ eksikliğini ve nitrit ilavesi) konsantrasyonları altında *Chlorella vulgaris* türünde lipid içeriğine bakmışlardır. Analizlerinde aynı zamanda kuru ağırlığa da bakılmış olup en yüksek kuru ağırlık oranı %50 N⁺ %50 P⁺ içeren grupta gözlemlenmiştir.

Riyazat vd. (2022), *Dunaliella salina* türünde farklı nutrient manipülasyonlarıyla lipid içeriği ve kuru ağırlıktaki değişimleri gözlemlenmiştir. Örneklerin kuru ağırlık değerleri iki günde bir olacak şekilde 12 gün boyunca ölçülmüştür. En yüksek kuru ağırlık

değerleri ise 12. günde kontrol grubunda gözlemlenmiştir. Sabit ışık koşulları altında azot ve fosfor bakımından yoksun olan gruplarla kontrol grubu karşılaştırıldığında kontrol grubunun daha yüksek kuru ağırlığa sahip olduğu gözlemlenmiştir. Kendi aralarında ise N⁻ grubunun P⁻ grubuna göre daha düşük bir kuru ağırlığa sahip olduğu söylenebilir. Sonuç olarak azotun yoksunluğu, fosforun yoksunluğuna nazaran kuru ağırlığı daha fazla etkilediği söylenilebilmektedir. Ran vd. (2022), *Isochrysis zhangjiangensis* türünde yüksek ışık (HL) ve düşük ışııkta (LL) azot, fosfor ve kükürt nutrientlerinin eksikliğinin etkileri incelenmiştir. Test edilen tüm besin yoksunluğu koşulları altında biyokütle birikebilir, ancak biyokütle üretimleri, özellikle -N ve -S için hem LL hem de HL altında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında düşüş gözlemlenmiştir. -P, -N ve -S'ye göre biyokütle üretiminde daha az düşüşe neden olmaktadır ve 4. günde sırasıyla 2.07 g/L ve 2.60 g/L'lik nihai biyokütle konsantrasyonları, LL ve HL altında olanlardan %64-128 daha yüksek olduğu raporlanmıştır.

Yapılan bu tez çalışmasında 680 nm'deki değerlerine bakılmış ve 24. gün sonunda kültür sonlandırılmıştır. Çalışmada azot kaynağı olarak NaNO₃ kullanılmıştır. 18. günde 680nm'deki OD değeri 1,561 abs (**Şekil 4.3.**) olarak gözlemlenmiştir. *Acutodesmus deserticola* türünde 0,5 abs değerine 680 nm'de 3. günde ulaşmış ve kültür devam etmiştir. Sonlandırma OD değeri ise 2,142 abs olarak gözlemlenmiştir. Önceki yıllarda Gour vd. (2017), *Scenedesmus quadricauda*, *S. dimorphus* ve *Chlorella* sp. olmak üzere 3 farklı mikroalg türü incelenmiştir. Söz konusu çalışmada, OD değerlerine 730 nm'de ölçülmüş ve 18. günün sonunda kültür sonlandırılmıştır. Kullandıkları azot kaynakları KNO₃, Üre Ca(NO₂)₃, NH₄Cl ve NaNO₃'tür. Değerler karşılaştırıldığında Gour vd.'nin çalışmasında kültür sonunda 730 nm'deki OD değeri *Scenedesmus quadricauda* 0,6 abs *S. dimorphus* ve *Chlorella* sp. türlerinde ise 0,8 abs olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada bulunan sonuçlar ile Gour vd. (2017) sonuçlarından farklılıklar gözlenmektedir. Çalışmalarda kullanılan besi ortamlarının farklı olması, besi ortamı içerisindeki azot miktarının aynı olmaması ve farklı OD değerlerinde ölçülmesi söz konusu bu farkın ortaya çıkmasındaki temel sebeplerdendir. El-Sheekh vd. (2018), *Scenedesmus opoliensis*, *S. subspicatus*, *S. quadricauda*, *S. microspina*, *S. acutiformis*, *S. obliquus*, *S. intermedius* ve *S. abundance* türlerinde biyodizel üretimi üzerinde bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada tüm mikroalg türleri Bold bazal kültür ortamında (bold basal medium (BBM)) kültüre alınmıştır ve 680 nm'deki absorbans değerleri ölçülmüştür. Örnekler 24 gün boyunca kültüre alınmıştır. 24. gün sonundaki OD değerleri *Scenedesmus abundance* türünde 2,1 abs olarak gözlemlenmiştir. Yapılan bu iki çalışmada sonuçların birbirine benzer çıktığı gözlemlenmiştir. Farklı fosfor koşulları altında

en yüksek OD değerine sahip olan grubumuz P^- grubunda 2,04 abs olarak saptanmıştır. Hamuoda vd., (2018) yapmış olduğu çalışmada *Scenedesmus obliquus* türünde farklı fosfor konsantrasyonları altında (0,0035 g/L 0,07 g/L 0,01 g/L 0,014 g/L) biyokimyasal kompozisyonunu incelemişlerdir. Yapılan bu çalışmada optik yoğunluk değerleri 680 nm’de 18 gün boyunca ölçülmüştür. En yüksek OD değeri ise 0,07 g/L fosfor içeren gruba ait olduğu tespit edilmiştir (0,06 abs). Bu iki çalışmada aynı nanometredeki absorbans değerleri incelenmiştir. Fakat bu iki çalışmanın arasındaki en büyük farklardan birisi türlerin farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Bir diğer nedeni ise, başlangıç OD değerlerinin eşit başlatılamamış olmasından kaynaklanabilir. Arumungam vd. (2013), *Scenedesmus bijugatus* türünde farklı azot kaynakları altında kültür büyüme parametrelerini incelemişlerdir. Bu suş, uygun azot kaynakları bazal soil ekstraksiyon ortamında kültüre alınmıştır (Li vd., 2008). Azot kaynağı olarak $NaNO_3$ ilaveli kültür ortamındaki sonlandırma OD (540 nm) değerlerine bakıldığında 0,5 abs olarak gözlemlenmiştir.

Yapılan bu tez çalışmasında *Acutodesmus deserticola* türünde farklı konsantrasyonları içeren gruplarda kontrol grubuna göre azot bakımından zengin olan grupta Kl-a değerinde bir azalma gözlemlenmiştir. N^+ ortamında bulunan 24. günde en yüksek Kl-a değerine ulaşmıştır. Kontrol grubuna göre N^- grupta Kl-a değerlerinde düşüş gözlemlenmiştir. 17. günden sonra P^- grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek Kl-a değeri gözlemlenmiştir. Tüm gruplar için 3. güne kadar Kl-a değerleri birbirine yakın seviyede ilerlemiştir. Daha sonrasında en yüksek değer 24. günde N^+ grubunda gözlemlenmiştir. Uslu vd. (2022), yapmış olduğu çalışmada *Scenedesmus obliquus* türünde farklı azot ve fosfor koşulları altında büyüme ve lipit birikimi incelenmiştir. Ortamdaki azot miktarının azalması ile karoten miktarında artış, klorofil a ve b miktarında ise azalma tespit edilmiştir. Zhang vd. (2019), *Scenedesmus acuminatus* türünde azot açlığı ve ardından azot takviyesiyle beraber bu türdeki kültür büyüme parametrelerini incelemişlerdir. Yapılan çalışmada 9 gün boyunca azot açlığı stresi uygulanmış ve ardından ortama azot ilave edilmiştir. Bu iki evre karşılaştırıldığında azottan yoksun evredeki klorofil a değerleri de gün geçtikçe azalma görülmüş ve ardından azot eklenmesiyle bu değerlerde gözle görülür bir artış gözlemlenmiştir. Song vd. (2016), farklı azot ve fosfor oranlarının (1:1, 2:1, 4:1, 8:1, 16:1, 32:1) *Dunaliella tertiolecta* türünde klorofil içeriği ve kuru ağırlık üzerine etkisini incelemişlerdir. Azot kaynağı olarak nitrat ve üre kullanmışlardır. Her iki azot kaynağında da klorofil içeriği ve kuru ağırlık üzerine etkisinin maksimum değeri, kültürün 15. gününde 16:1 N:P oranında gözlemlenmiştir. Lv vd. (2016), nutrient (N, P ve S) yoksunluğu sırasında *Dunaliella salina* türünde kültürlerin ve hücrelerin rengindeki değişiklikleri dikkate alarak,

fotosentetik pigmentler olan klorofil a ve b içeriklerini araştırmışlardır. Sonuçlar, klorofil a içeriğinin besin yoksunluğu üzerine değiştiğini gözlemlemişlerdir. Klorofil içerikleri 3. Güne kadar azalmış ve birkaç gün sonra hücrelerin klorofil içeriğinde artış gözlemlenmiştir. Klorofil a'nın içeriği, besin yoksunluğu sırasında toplam klorofil miktarına benzer bir eğilim sergilediği ve bununla birlikte, birleşik besin yoksunluğu sırasında Klorofil b içeriğinde artış gözlemlemişlerdir bu nedenle, birleşik besin yoksunluğu sırasında Klorofil a/b oranları azalmıştır. Kontrol grubunda kültürlen *D. salina* hücreleri için Klorofil a/b oranı beşinci günden önce arttığını ve sonrasında azaldığını gözlemlemişlerdir. Nagi vd. (2020), tabakhane atık suyunda (TWW) *Scenedesmus* sp., *Chlorella variabilis* ve *Chlorella sorokiniana* kültür büyüme parametrelerini incelemişlerdir. Toplam klorofil miktarlarını incelemek için türler 3 farklı konsantrasyonlarda kültüre alınmıştır (TWW konsantrasyonları Kontrol, %25, %40, ve %60). Toplam klorofil miktarı *Scenedesmus* sp. türünde yaklaşık 5. güne kadar kontrol grubu hariç diğer gruplar aynı seviyede ilerlemiştir. 5. günün ardından %60 konsantrasyona sahip grupta total klorofil miktarında azalma görülürken diğer 3 grupta artış gözlemlenmiştir. En yüksek değer 16. günde %40 konsantrasyona sahip grupta gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada ve daha önceki yıllarda yapılmış olan üç farklı çalışmada ((Durmaz vd. (2018); Mirshekari vd. (2019) ve Fae Neto vd. (2018)) hücre sayısı değerlerine bakılmıştır. Bu dört çalışmada da azot bakımından yoksun olan gruptaki hücre sayısı kontrol grubuna kıyasla daha düşük gözlemlenmiştir. Bu çalışmalardan farklı olarak da Chu vd. (2020) hücre sayısı azot bakımından zengin olan grupta hücre sayısını daha yüksek bulmuştur. Mutlu vd. (2011); Riyazat vd. (2022); Ran vd. (2022) ve bu çalışmada kuru ağırlık değerleri azot bakımından zengin gruplarda daha yüksek sonuçlar vermiştir. Lin vd. (2020) *Scenedesmus abundans* türü üzerinde azot bakımından eksik olan grupta en yüksek kuru ağırlık değeri gözlemlenmiştir. Bu çalışmada ve El-Sheekh vd. (2018) ve Lin vd. (2020)'deki OD değerlerine bakıldığında benzer sonuçlar ortaya konulmuştur. Bu sonuçlara göre en yüksek OD değerleri kontrol grubunda gözlenmiştir. Bu çalışmada bulunan sonuçlar ile Gour vd. (2017) sonuçlarında farklılıklar gözlenmektedir. Çalışmalarda kullanılan besi ortamlarının farklı olması, besi ortamı içerisindeki azot miktarının aynı olmaması ve farklı OD değerlerinde ölçülmesi söz konusu bu farkın ortaya çıkmasındaki temel sebeplerdendir. Hamuoda vd. (2018) yapmış olduğu çalışmada en yüksek OD değeri 0,07 g/L fosfor içeren grupta tespit edilmiştir (0,06 abs). Hamuoda vd. (2018) ve bu çalışmada aynı nanometredeki absorbans değerleri incelenmiştir. Bu iki çalışmanın arasındaki en büyük farklardan birisi türlerin farklı olması diğer ise, başlangıç OD değerlerinin eşit olmamasıdır. Bu çalışmada

ve diğer üç farklı çalışmada azot azaldıkça klorofil a değerinde azalma tespit edildiği gözlemlenmiştir fakat Song vd. (2016) ve Nagi vd. (2020) çalışmalarında ise bu sonuçların tam tersi sonuçlar ortaya konulmuştur.

Sonuç olarak, azot ve fosforun kültür büyüme parametreleri üzerine etkileri değerlendirilmiş olup; N⁻ grubundada neredeyse tüm parametrelerde en düşük değer olarak gözlemlenmiştir. Kl-a değeri hariç tüm parametrelerde en yüksek değer kontrol grubunda gözlemlenirken, Kl-a değeri ise N⁺ grubunda gözlemlenmiştir.

Kültür süresi boyunca kültür büyüme parametrelerinin bakıldığı günlerde pH değerleri de ölçülmüştür (**Tablo.4.2.**). P⁻ ortamda fosfor eksik olduğu için OH⁻ iyonları metale iz metallerine bağlanamadı. Metallerle bağlanamadığı için OH⁻ iyonu serbest kaldı. Serbest kalan OH⁻ iyonlarının sayısı arttı ve bu durumda ortamın pH seviyesini yükseltti. (Cerozi ve fitsimmons, 2016; Johan vd., 2021). Bu durumda kontrol grubuna göre tüm kültür büyüme parametrelerinde düşüşe sebep olmuştur.

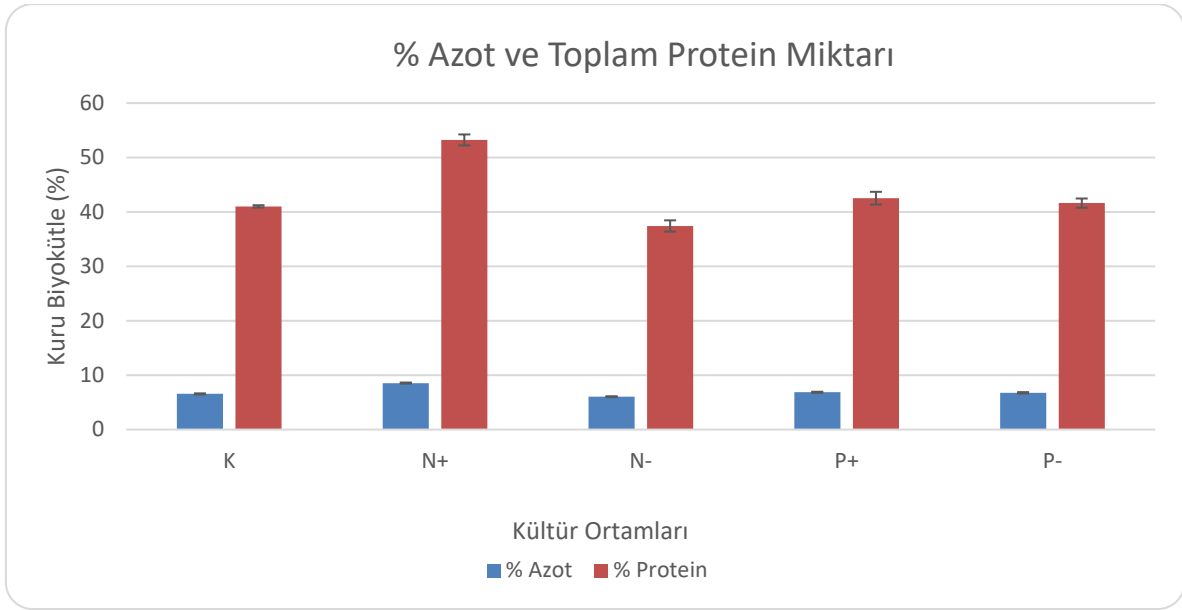
Tablo.4.2. Çalışmada kullanılan 5 farklı kültür ortamının kültür süresi boyunca ölçülen pH değerleri

Kültür süresi (Gün)	K	N ⁺	N ⁻	P ⁺	P ⁻
1	8,5	8,1	8,36	8,22	10,98
3	8,7	8,3	8,65	8,4	11,05
7	8,65	8,92	9,03	8,86	11,4
10	9,05	9,08	9,05	8,9	11,4
15	9,1	9,35	8,92	9,05	11,55
17	9,13	9,38	8,94	9,04	11,51
21	9,15	9,4	8,96	9,01	11,4
24	9,92	9,75	9,1	9,11	11,6

4.3. Biyokimyasal Analiz Sonuçları

4.3.1. Protein ve Amino Asit Analizi sonuçları

Acutodesmus deserticola türünün örneklerine ait protein içeriği belirlenmiştir. En yüksek azot konsantrasyonu 8,517 (%N) olarak N⁺ grubunda gözlemlenmiş ve en düşük azot konsantrasyonu 6,038 olarak N⁻ grubunda gözlemlenmiştir.



Şekil 4.10. Beş farklı kültür ortamından hasat edilen *Acutodesmus deserticola* türünün % N ve Toplam Protein miktarları (% kuru biyokütle). (Hata çubukları, 3 tekrar arasındaki standart sapmayı temsil eder (n=3), p<0,05)

Tablo 4.3. Beş farklı kültür ortamından hasat edilen *Acutodesmus deserticola* mikroalginde bulunan bazı aminoasitlerin miktarları (mg/kg kuru ağırlık). (Hata çubukları, 3 tekrar arasındaki standart sapmayı temsil eder (n=3), p<0,05)

	K	N ⁺	N ⁻	P ⁺	P ⁻
Arg	4608,359±3,96	1464,895±0,05	82,639±0,19	777,073±0,07	88,282±2,00
Ala	14,301±1,85	4,640±0,16	3,430±0,21	21,342±0,22	5,750±0,12
Val	61,435±1,04	65,741±0,12	63,353±0,21	86,986±0,028	64,827±0,17
Phe	0,956±0,08	0,850±0,10	0,549±0,23	4,083±0,019	2,638±0,09
Try	0,436±0,11	0,639±0,20	0,460±0,21	0,878±0,033	0,422±0,11
Asp	1,458±0,10	4,826±0,19	5,885±0,09	13,334±0,204	4,764±0,13
Glu	147,067±1,60	139,615±1,20	238,573±2,184	640,367±0,181	146,145±0,103
Lys	0,012±0,001	0,025±0,002	0,019±0,004	0,018±0,006	0,016±0,001

Yapılan tez çalışmasında Arg amino asidi kontrol grubunda en yüksek 4608,359 mg/kg; Ala, Val, Phe, Try, Asp ve Glu amino asitleri en yüksek P⁺ gruplarında sırasıyla 21,342 mg/kg, 86,986 mg/kg, 4,083 mg/kg, 0,878 mg/kg, 13,334 mg/kg, 640,367 mg/kg olarak gözlenmiş olup en yüksek Lys amino asidine sahip olan grup N⁺ 0,025 mg/kg olarak gözlemlenmiştir.

Pancha vd. (2014), *Scenedesmus* sp. türünde azot sınırlaması altında protein içeriğini incelemişlerdir. Azotun ardışık olarak ortamdan uzaklaşması protein miktarını önemli ölçüde azaltmıştır. Mevcut sonuçlar, büyüme ortamındaki nitrat konsantrasyonunun 247 mg/L'den 0 mg/L'ye düşürülmesinin, protein içeriğinde %47,75'ten %16,87'ye bir düşüşle sonuçlandığını ve bu değer nitrojen bakımından zengin kültürden yaklaşık %60 daha az olduğu saptanmıştır. Zarrinmehr vd. (2020), farklı azot konsantrasyonlarının (0, 36, 72, 144 ve 288 mg/L) *Isochrysis galbana* üzerindeki protein içeriğine etkisini araştırmışlardır. Farklı azot konsantrasyonlarında biriken protein yüzdesi %17,1 ila %36,3 arasında değişmiştir. Walne ortamının 144 ve 72 mg/L azot içerdiği gruplarda protein yüzdesinin, 0 ve 288 mg/L azot içerenlere kıyasla önemli ölçüde ($P < 0,05$) daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Xie vd., (2017) *C. vulgaris* türünde farklı azot (NaNO_3) konsantrasyonlarında (0,25/0,75-1/1,25/1,5/2 g L^{-1}) kademeli olarak protein içeriğini arttırmayı amaçlamışlardır. Yapılan çalışmada 1,25 g/L konsantrasyona kadar protein içeriğinde artış gözlemlenmiştir. Kendirlioglu ve Çetin (2019) 4 farklı azot içeren ortamda (jaworski, amonyum nitrat, amonyum sülfat, sodyum nitrat) *C. vulgaris* mikroalgini kültüre almışlardır. Kontrol grubunda aşılama günü 55,00 $\mu\text{g/mL}$ olan protein miktarı altıncı güne kadar düzenli olarak 316,43 $\mu\text{g/mL}$ 'ye kadar yükselmiş ve daha sonra onuncu güne kadar 260,08 $\mu\text{g/mL}$ 'ye düşmüştür. En yüksek protein miktarı sodyum nitrat grubunda gözlemlenmiştir.

Yapmış olduğumuz tez çalışması Kendirlioglu ve Çetin, Pancha vd. (2014) ve Xie vd. (2017) Zarrinmehr vd. (2020), yapmış oldukları çalışma ile tutarlı bir sonuca varılmıştır. Sonuç olarak azotun varlığı protein miktarının artmasınaneden olmaktadır.

Su vd. (2021) *Chlorella vulgaris* mikroalginde amino asit içeriğine bakmışlardır. Arg 6,400 mg/kg, Ala 7,900 mg/kg, Val 5,500 mg/kg, Phe 5,500 mg/kg Try 3,400 mg/kg, Asp 9,000 mg/kg, Glu 11,600 mg/kg ve Lys 8,400 mg/kg olarak bulunmuştur. Try ve Glu amino asitleri dışında diğer aminoasitler benzer oranlarda gözlemlenmiştir. Michelon vd. (2022) *Scenedesmus* sp. türünde amino asit miktarlarını incelemişlerdir. Arg 11 mg/kg, Val 14 mg/kg, Phe 12, Try 3 mg/kg, Asp 24 mg/kg Glu 36 mg/kg Lys 12 mg/kg olarak saptamışlardır. Glu ve Lys amino asitleri dışında diğer tüm amino asitler yapılan tezdeki gibi birbirine yakın sonuçlar gözlemlenmiştir. Akgül vd. (2020), *Desmodesmus communis* (E. Hegewald) türünde farklı fosfor konsantrasyonları altında (%50 P^+ , %50 P^- , %75 P^+ ve %75 P^-) amino asit içeriklerini incelemişlerdir. En yüksek Arg amino asit değeri %75 P^- grubunda 480,07 mg/kg, Ala %75 P^+ grubunda 30,126 mg/kg, Val 23,71 mg/kg, Phe %75 P^- grubunda 6,04 mg/kg, Asp kontrol grubunda 7,48 mg/kg Glu %50 P^+ grubunda 29,66 mg/kg ve Lys %50 P^+ grubunda 56,99 mg/kg olarak gözlemlenmiştir. Kavasbaşıoğlu vd. (2020) *Chlorella*

vulgaris türü üzerinde yaptığı çalışmada farklı azot içeriklerine sahip ortamlarda (TAP (Tris-Acetate-Phosphate) Nitrat eklemeli TAP besiyeri N-TAP), Kırıkkale Üniversitesi kampüs gölü (GÖL), Makina ve Kimya Endüstrisi Kurumu (MKEK)) amino asit içeriğini incelemişlerdir. İncelemeler sonucunda Arg amino asidi tüm ortamlarda en yüksek değer olarak belirlenmiştir. Ahii Chia vd. (2015) *C. vulgaris* türünde farklı kombine stres koşulları (Azot, Kadmiyum, Azot/Kadmiyum) altında amino asit içeriğini incelemişlerdir. Deney sonucunda prolin amino asidi diğer aminoasitlere oranla daha yüksek saptanmıştır. Arg ürettiği nitrik oksit, hücrelerin potasyum kanallarının açılmasını sağlar ve damarların genişlemesine yardımcı olur ve bu sayede daha iyi beslenen saçlar hızlı uzar. Glu yaş ilerledikçe üretim oranı azalan bir amino asittir. Glutamin, glutamik asitten meydana gelir ve glutamik asit de saçlara sülfür taşıyarak uzamalarına yardımcı olur. Bu iki aminoasit saç gelişiminde önemli rol oynayan besinlerdendir. *A. deserticola* türünde Arg ve Glu aminoasitlerinin konsantrasyon kontrol ve P⁺ gruplarında yüksek olduğu için kozmetik sektöründe aminoasit kaynağı olarak kullanılabilir. İzobütan, standart (karışık amino asit) ortamda üretilen başlıca biyogazdı, ancak valin takviyesi esas olarak propan üretimine önemli ölçüde katkısı bulunmaktadır. Biyogaz üretiminde diğer amino asitlere ve yüksel Val amino asidinin bulunması avantajı ile biyogaz üretiminde kullanılabilir kaynak olabilmektedir. Aspartik asit, bağışıklık fonksiyonunu desteklemek ve depresyona karşı doğal bir savaşçı olarak kullanılmaktadır. Enerji üretimine, yorgunluk direncine, RNA ve DNA sentezine ve karaciğer detoksifikasyonuna yardımcı olma yeteneği, ona geniş klinik kullanım sağlamaktadır. Ek olarak, farmasötik ve organik kimyasalların üretiminde ara substrat olarak kullanılır ve aktif farmasötik bileşenler için yapı taşı molekülü olarak hizmet eder. Aspartik asidin uygulanabilirliğinin aralığı ve derinliği, özellikle L-konfigürasyonu, onu Enerji Bakanlığı'nın Biyokütle listesindeki En Yüksek Katma Değerli Kimyasallar listesine yerleştirmiştir. Bu uygulama alanları için Asp kaynağı olarak kullanılabilmesi olasıdır (Appleton ve Rosentrater 2021).

4.3.2. Yağ ve Yağ Asidi Analizi Sonuçları

Acutodesmus deserticola türünün örneklerine ait toplam yağ analizi sonuçları incelendiğinde en yüksek değer N⁺ grubunda %7,1 en düşük değer ise P⁻ grubunda %3,51 olarak gözlemlenmiştir.

Tablo 4.4. Beş farklı kültür ortamından hasat edilen *Acutodesmus deserticola* türünün toplam yağ analizi sonuçları (Kuru biyokütledeki %yağ) (Hata çubukları, 3 tekrar arasındaki standart sapmayı temsil eder (n=3), p<0,05)

	K	N ⁺	N ⁻	P ⁺	P ⁻
Yüzde Yağ	6,6±0,1	7,1±0,15	5,71±0,03	5,2±0,05	3,51±0,03

4.3.3. Yağ Asidi Analiz Sonuçları

Tablo 4.5. Beş farklı kültür ortamından hasat edilen *Acutodesmus deserticola* türünün yağ asidi analizi sonuçları (% toplam yağ asidi)

Doymuş yağ asitleri	K	N ⁺	N ⁻	P ⁺	P ⁻
Lauric acid methyl ester 12:0	2,633±0,008	2,573±0,010	2,299±0,011	2,298±0,050	1,250±0,120
Pentadecanoic acid, 14-methyl-methyl ester 14:0	12,636±0,093	15,736±0,090	11,834±0,093	18,153±0,144	17,506±0,169
Palmitic acid methyl ester 16:0	3,345±0,106	5,640±0,171	2,743±0,090	5,660±0,216	11,026±0,025
Stearic acid methyl ester 18:0	2,234±0,012	1,893±0,018	1,938±0,03	1,834±0,160	0,933±0,012
Doymamış yağ asitleri					
Oleic acid methyl ester omega 9 18:1	10,206±0,103	8,471±0,194	10,487±0,040	4,216±0,111	16,198±0,004
Linoleic acid methyl ester omega 6 18:2	6,814±0,188	11,982±0,017	35,605±1,421	27,771±,0212	6,925±0,363
Linolenic acid methyl ester omega 3 18:3	33,645±0,370	39,707±0,268	24,647±1,947	31,166±1,003	40,393±1,910
5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid methyl ester 20:4	9,355±0,904	6,340±0,210	4,515±0,967	4,524±0,271	3,304±0,216
Cyclopentane tridecanoic acid methyl ester	20,601±1,241	9,297±0,901	7,192±0,219	5,441±1,021	3,050±0,995

Acutodesmus deserticola türünün örneklerine ait yağ asidi sonuçlarına bakıldığında genel olarak tüm stres parametrelerinde en yüksek değere sahip olan yağ asidi linolenik asit (omega 3) olarak gözlemlenmiştir. Linoleik asit incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla N⁻ ve P⁺ koşullarında değerler çok yüksek gözlemlenmiştir. Doymamış yağ asitleri doymuş yağ asitlerine oranla daha yüksek gözlemlenmiştir.

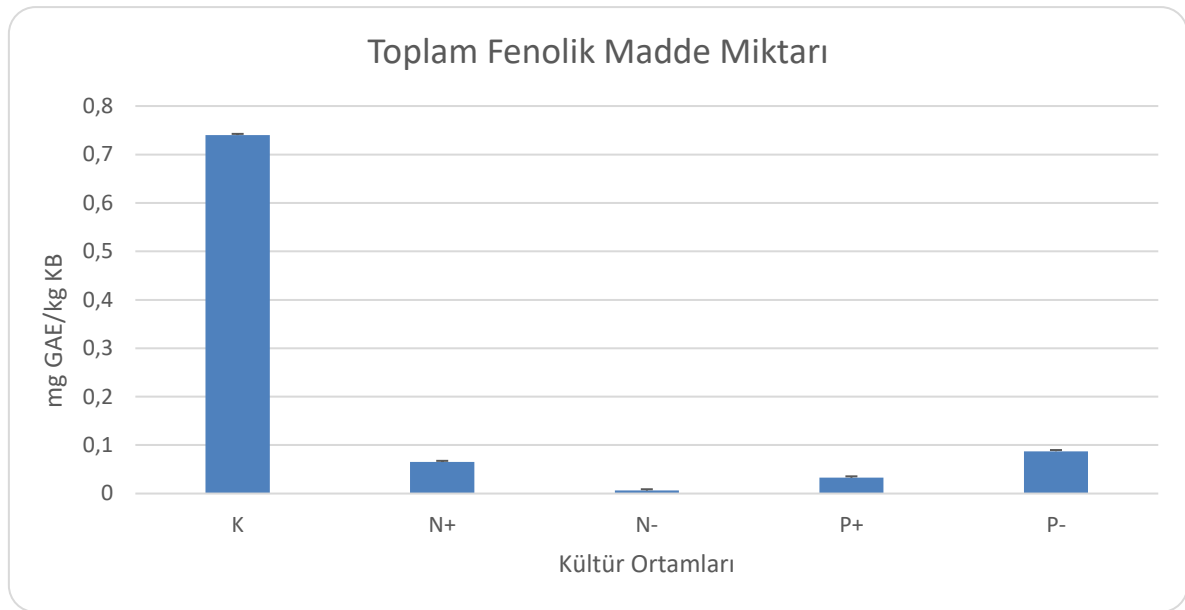
Lairab vd. (2021), *Chlorrella vulgaris* türünde farklı azot kısıtlamaları altında toplam yağ içeriğini ve yağ asitleri kompozisyonlarını incelemişlerdir. Düşük azot seviyelerinde toplam yağ içeriği normal şartlara göre daha yüksek bulmuşlardır. Tespit edilen ana yağ asitleri C16:0 ile C18:0 arasındaydı, yani palmitik asit (C16:0), palmitoleik asit (C16:1), stearik asit (C18:0), oleik asit (C18:1n9), linoleik asit (C18:2n6) ve linolenik asit (C18:3) olarak raporlamışlardır. Fawzy ve Alharti (2021) *Dunaliella parva* mikroalginde azot ve fosfor yokluğunda toplam yağ kompozisyonlarını incelemişlerdir. Kontrol grubuna kıyasla toplam yağ içeriği; (%25,62) azot içermeyen (%36,59) ve fosfor içermeyen (%28,84) gruba göre daha yüksek gözlemlenmiştir. Farooq vd. (2022) *Chlorella vulgaris* türünde farklı azot konsantrasyonlarında yağ asitlerinin analizini incelemişlerdir. Ele alınan araştırmada en baskın yağ asidi olan oleik asit, ardından benzer miktarda palmitik asit ve alfa linolenik asit gözlemlenmiştir. Giderek azaltılan azot miktarı, palmitik asit ve oleik asit miktarını arttırırken, palmitoleik asit, linoleik asit ve alfa linolenik asidin miktarında azalma gözlemlenmiştir. Argulles ve Martinez- Goss (2020) *Chlorolobion* sp. BIOTECH 4031, *Chlorella* sp. BIOTECH 4026 türlerinde azot sınırlayıcı koşullar altında yağ asidi içeriğini incelemişlerdir. En yüksek değerler sırasıyla palmitik asit ve oleik asit olarak belirlenmiştir. Chu vd. (2019), *Chlorella* PY-ZU1 türünde farklı fosfor koşullarında yağ asidi kompozisyonlarını incelemişlerdir. Tüm fosfor koşulları altında en yüksek yağ asitleri sırasıyla linoleik asit ve palmitik asit olarak belirlenmiştir. Rocha vd. (2018), *Selenastrum gracile* türünde farklı fosfor koşullarında yağ asidi kompozisyonları incelenmiştir. Tüm fosfor koşullarında en yüksek yağ asidi linolenik asit olarak gözlemlenmiştir. Yağ asitleri sonuçları analiz edildiğinde, linoleik asit kontrol grubuna (%6,814) göre azot bakımından limitasyona uğramış (N⁻) grupta (%35,605) oldukça yüksek gözlemlenmiştir. Linoleik asit bağışıklık sisteminde ve kan şekeri düzenlemesinde önemli bir role sahiptir. Dolayısıyla insan gıdası olarak linolenik asit; kalp sağlığı, inflamasyonla mücadele, demans (bunama) ve karaciğer yağlanmasıyla karşıt önemli bir rol almaktadır.

Yapılan bu tez çalışmasında Lairab vd. (2021), Chu vd. (2019), Rocha vd. (2018) ve Argulles ve Martinez- Goss (2020) sonuçlarının diğer çalışmalara nazaran daha uyumlu olduğu görülmektedir. Bunun yanı sıra Fawzy ve Alharti (2021) ve Farooq vd. (2022)

yapmış oldukları çalışmalar tez çalışmasıyla tutarlı olmadığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak biyoteknolojik açıdan ele alınacak olursa, yağ asitleri, linolenik asit ve linoleik asit insan gıdası uygulamalarında yaygın olarak kullanılabilinmektedir. Uygun parametreler kullanılarak elde edilen yağ asitlerinin insan gıdası üretimi ve gelişimi açısından umut verici olduğu düşünülmektedir.

4.3.4. Toplam Fenolik Madde Analizi Sonuçları

En yüksek fenolik bileşen konsantrasyonu kontrol grubunda gözlemlenmiş ve en düşük konsantrasyon N⁻ grubunda gözlemlenmiştir.



Şekil 4.11. Beş farklı kültür ortamından hasat edilen *Acutodesmus deserticola* türünün toplam fenolik madde miktarları (mg GAE/kg kuru biyokütle) (n=3, p<0,05)

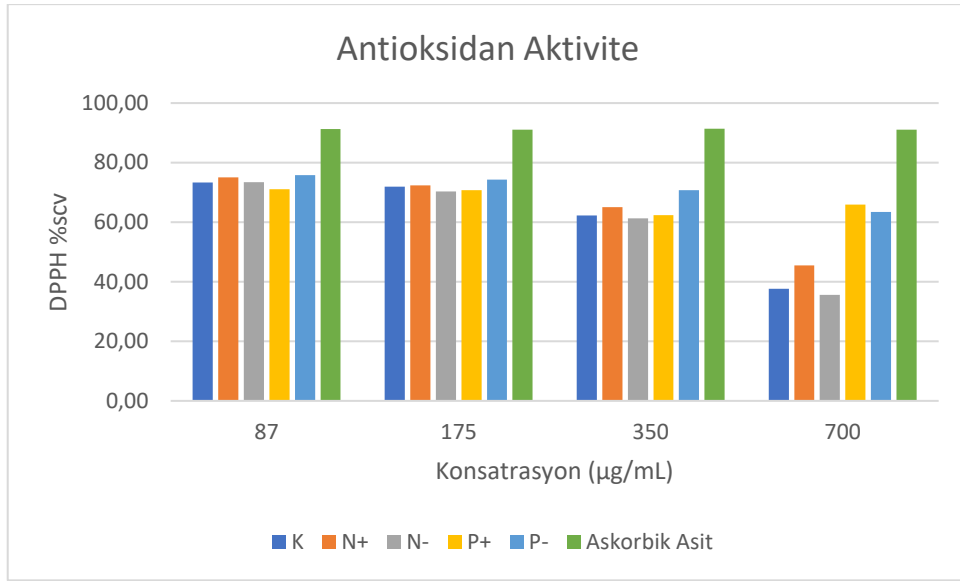
Safar vd. (2015), *Phaeodactylum* sp. dahil olmak üzere farklı sınıflardan altı mikroalg. (*Bacillariophyceae*), *Nannokloropsis* sp. (*Eustigmatophyceae*), *Chlorella* sp., *Dunaliella* sp. ve *Desmodesmus* sp. (*Chlorophyta*), farklı in vitro analizler kullanılarak fenolik madde içeriğini incelemişlerdir. Fenolik bileşiklerin en yüksek ve en düşük konsantrasyonları *Desmodesmus* sp. ve *Phaeodactylum tricornuotom* ($7,72 \pm 0,08$ - $3,16 \pm 0,04$ mg/g) mikroalg türlerinde gözlemlenmiştir. Goiris vd. (2015) *Chlorella vulgaris*, *Phaeodactylum tricornuotom* ve *Tetraselmis suecica* türlerinde azot ve fosfor limitasyonları altında fenolik madde içeriğini incelemişlerdir. Tüm türlerde en yüksek fenolik içerik kontrol grubunda gözlemlenmiş olup N_{lim} ve P_{lim} arasında en düşük fenolik bileşen içeriği P_{lim} grubundan gözlemlenmiştir. S. Corrêa vd. (2022), yapmış oldukları çalışmada, fenolik

ekstraksiyon ve antioksidan özellikler için üç ekstrakt (sulu, etanolik ve metanolik) analiz etmişlerdir. En yüksek fenolik konsantrasyonu ($34,5 \pm 1,2$ mg GAE·g⁻¹), azot sınırlaması altında yetiştirilen *C. zofingiensis* biyokütlesinden elde edilen etanolik ekstraktan elde edilmiştir.

Yapılan bu tez çalışmasında; Safafar vd. (2015) ile Goiris vd. (2015)'nin çalışmalarına benzer olarak en yüksek fenolik madde içeriği kontrol grubunda gözlemiştir. Buna karşın Corrêa vd. (2022), çalışmasında en yüksek fenolik madde içeriği, azot sınırlaması altında gözlemlenmiştir. Sonuç olarak azot ve fosfor kültür içeriği türden türe fenolik madde miktarında değişiklik göstermektedir. Stres parametreleri fenolik bileşen içeriği için belirleyici bir özelliktir ya da değildir diyebilmek için çok sayıda türle çalışma yapmak gereklidir. Bu tez çalışmasında N kısıtlı ortamda toplam fenolik maddenin en düşük değerde çıkması, hücrelerde N kısıtının yarattığı stresin yüksek olduğu ve antioksidan özelliği olan fenolik maddenin kontrol grubuna göre hızlıca tükenmiş olabileceğini akla getirmiştir.

4.3.5. Antioksidan Analiz Sonuçları

Acutodesmus deserticola türünün örneklerine ait antioksidan aktivitesi 2800/1400/700/350/175/87 µg/mL konsantrasyonlarda incelenmiştir. Bu analiz sırasında uygulanan tüm stres parametrelerinde DPPH süpürme aktivitesi 87-700 µg/mL konsantrasyon aralığında 37,61- 75,83% scv süpürme aktivitesi gözlemlenmiştir. DPPH radikali, birkaç kararlı organik azot radikalinden bir tanesidir. Koyu menekşe renktedir. Bu metot DPPH radikalinin antioksidanlar tarafından bir redoks reaksiyonuna bağlı olarak süpürülmesi temeline dayanır (Büyüktuncel, 2013).



Şekil 4.12. Beş farklı kültür ortamından hasat edilen *Acutodesmus deserticola* türünün DPPH süpürülme aktivitesi sonuçları

Acutodesmus deserticola türünün örneklerine ait en yüksek IC 50 değeri P⁻ ve en düşük IC50 değeri N⁻ grubunda gözlemlenmiştir.

Tablo 4.6. Beş farklı kültür ortamından hasat edilen *Acutodesmus deserticola* türünün IC50 değerleri sonuçları

	K	N ⁺	N ⁻	P ⁺	P ⁻
R²	0,9817	0,9986	0,9991	0,9681	0,9912
IC50 (µg/mL)	508,4529	599,4659	470,0719	574,9848	964,2515

Banskota vd. (2019) yaptıkları çalışmada 50, 100 ve 200 µg mL⁻¹ konsantrasyonlarda DPPH radikal süpürme aktivitesini test etmişlerdir. Bu çalışmaların sonucunda ise *Tetraselmis chui* mikroalgi 200 µg/mL⁻¹ en yüksek DPPH radikali süpürme aktivitesi göstermiştir. González-Vega vd. (2021) *Navicula incerta* türünde DPPH süpürme aktivitesini incelemişlerdir. 780µg·mL⁻¹ konsantrasyonda %35,2±0,2 scv DPPH süpürme aktivitesi gözlemlenmiştir. Shanab vd. (2012), *Oscillatoria* sp. ve *Nostoc muscorum* türlerinde farklı azot konsantrasyonlarında DPPH testi yapmışlardır. En yüksek aktivite 9g/L NaNO₃ içeren konsantrasyonda %68 scv olarak gözlemlenmiştir. (175 ve 87 µg/mL’de yüksek aktivite gözlemlenmiş S.Corrêa vd. (2022), *Chromochloris zofingiensis* türünde antioksidan aktivite testi yapmışlardır. En yüksek DPPH Radikal Süpürme Aktivitesi, değerler arasında önemli bir fark olmaksızın, azot sınırlaması altındaki iç ve dış mekân

ekimlerinde bulmuşlardır. İç mekânda NO_3^- ile sınırlı ekimin metanolik özütü $\%42,2 \pm 1,3$ radikal süpürme aktivitesi (RSA) gösterirken, açık havada yetiştirmenin metanolik özütü $\%44,2 \pm 1,2$ RSA ile sonuçlanmıştır. Maadane vd. (2015), 9 farklı mikroalg türünde antioksidan kapasite testi yapmışlardır. En yüksek radikal yakalama aktivitesi, en düşük IC50 değerini ($247 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$) sergileyen *Tetraselmis* sp. türünde etanol özleri ile elde edilmiştir. *Dunaliella salina* ve *Navicula* sp. sırasıyla $283 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$ ve $347 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$ IC50 değerleri ile benzer bir antioksidan aktivite göstermiştir.

Banskota vd. (2019) González-Vega vd. (2021) S. Corrêa vd. (2022), ve Shanab vd. (2012), yapmış oldukları çalışmalarda bu tez çalışmasına yakın sonuçlar vermiştir. Bu örneklerden farklı olarak Maadane vd. (2015), yapmış olduğu çalışmada bizim tez çalışmamızdaki sonuçlardan daha yüksek bir değer bulmuşlardır. Sonuç olarak stres parametreleri antioksidan aktiviteyi etkilediği söylenebilmekte olup yaptığımız çalışmada, düşük konsantrasyonda dahi yüksek antioksidan aktivite gözlenmiştir.

4.3.6. Antimikrobiyal Analiz Sonuçları

Antimikrobiyal analizi yapmamızın temel amacı konsantrasyon arttıkça bakteri ve mantar türleri üzerinde inhibe edici bir özelliğinin olup olmayacağını belirlemektir.

Acutodesmus deserticola türünün örneklerine ait antimikrobiyal analizleri (MIC) için *E. coli*, *S. aureus* ve *C. albicans* türleri kullanılmıştır. Bu analiz sırasında kullanılan konsantrasyonlar 1000/500/250/125/62/31 $\mu\text{g/mL}$ 'dir. Bu konsantrasyonlardaki *A. deserticola* ekstraktlarının hiçbirisi, antimikrobiyal aktivite gösterecek etki yaratamamıştır.

Tablo 4.7. Beş farklı kültür ortamından hasat edilen *Acutodesmus deserticola* türünün 600 nm'de *E. coli* antimikrobiyal analizi sonuçları (abs)

Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$) / Ortamlar	K	N ⁺	N ⁻	P ⁺	P ⁻
1000	-0,082	0,576	0,557	0,753	0,467
500	0,069	0,808	0,816	0,747	0,380
250	0,131	0,722	0,792	0,771	0,371
125	0,048	0,597	0,853	0,828	0,556
62	0,012	0,714	0,810	0,598	-0,198
31	0,025	0,551	0,482	0,964	-0,197

Tablo 4.8. Beş farklı kültür ortamından hasat edilen *Acutodesmus deserticola* türünün 600nm’de *S.aureus* antimikrobiyal analizi sonuçları (abs)

Konsantrasyon (µg/mL) / Ortamlar	K	N ⁺	N ⁻	P ⁺	P ⁻
1000	0,465	0,422	0,455	0,541	0,541
500	0,449	0,351	0,375	0,575	0,575
250	0,456	0,404	0,400	0,455	0,455
125	0,476	0,379	0,410	0,417	0,417
62	0,461	0,398	0,383	0,417	0,417
31	0,464	0,406	0,434	0,511	0,511

Tablo 4.9. Beş farklı kültür ortamından hasat edilen *Acutodesmus deserticola* türünün 600 nm’de *C. albicans* antimikrobiyal analizi sonuçları (abs)

Konsantrasyon (µg/mL) / Ortamlar	K	N ⁺	N ⁻	P ⁺	P ⁻
1000	1,304	0,985	1,140	0,808	0,711
500	1,257	0,932	1,209	1,061	0,699
250	1,141	1,188	0,976	1,067	0,620
125	1,051	1,011	0,866	0,998	0,654
62	1,064	1,117	1,070	1,062	0,784
31	0,922	1,009	0,942	1,209	0,062

Pratita vd. (2018) *Spirulina platensis* türünde antimikrobiyal analizini yapmışlardır. Minimum inhibitör konsantrasyonunu (MİK) *C. albicans* türünde 62.5 ppm’de, *E. Coli* türünde 125 ppm’de ve *S. aureus* türünde 500 ppm’de MİK göstermiştir. Shaima vd. (2022), *Chlorella* sp. (UKM8) türünde antimikrobiyal analizi belirlemek için MİK testi yapmışlardır. Bu tür 0,312 ve 6,25mg/mL aralığında MİK göstermiştir. Jafari vd. (2018) *Dunaliella salina* türünde MİK testi yapmışlardır ve *Streptococcus* mutant kullanmışlar ve 6,250 mikrogram/mL de MİK gözlemlenmiştir. Navarro vd. (2017), *Coccomyxa onubensis* türünde yaptıkları çalışmada antimikrobiyal aktiviteyi incelemişlerdir. *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* suşlarında 106-305 µg/mL MİK gözlemlenmiştir.

Yapılan bu tez çalışmasında *Acutodesmus deserticola* ekstraktları ile yapılan antimikrobiyal analizlerinin sonucunda anlamlı bir sonuç elde edilememiştir.



5. SONUÇ

Bu çalışmada *A. deserticola* türü kültür büyüme parametrelerini ve biyokimyasal kompozisyonlarını incelemek üzere farklı kültür ortamlarında 24 gün boyunca kültüre alınmıştır. 24. Gündeki kültür büyüme parametrelerine göre Kl-a değeri dışındaki tüm parametreler en yüksek değerlerini kontrol grubunda göstermektedir. Kl-a değeri ise en yüksek N⁺ grubunda tespit edilmiştir. *A. deserticola* türünün farklı kültür ortamlarındaki biyokimyasal analiz sonuçları değerlendirildiğinde, (Ala, Phe, Asp, Glu, Try ve Val oranı) aminoasitlerinin en yüksek değerleri P⁺ grubunda gözlemlenmiştir.

A. deserticola türünün yağ asidi içeriklerine bakıldığında en yüksek linolenik asit ve en yüksek palmitik asit P⁻ grubunda gözlemlenirken, en yüksek linoleik asit ise N⁻ grubunda gözlemlenmiştir. Genel olarak yağ asidi içeriklerine bakıldığında bu veriler diğer ortamlardan çok daha yüksek sonuçlar verdiği için oldukça göze çarpmaktadır. *A. deserticola* türünün protein içeriğine bakıldığında en yüksek değer (8,517 %kuru biyokütle) N⁺ grubunda tespit edilmiştir. Toplam yağ analizi sonuçları incelendiğinde, en yüksek değer azotça zengin grupta (N⁺) olduğu görülmektedir. Toplam protein analizlerinde ise en yüksek değer N⁺ grubunda gözlemlenmiştir. Fenolik madde analizlerine bakıldığında en yüksek değer kontrol grubunda olduğu gözlemlenmiştir. Antioksidan analiz sonuçlarında; DPPH süpürme aktivitesi uygulanan tüm stres parametrelerinde, 87-700 µg/mL konsantrasyon aralığında 37,61- 75,83% scv süpürme aktivitesi göstermiştir. Antimikrobiyal analizlerde anlamlı bir sonuç gözlemlenmemiştir.

Tüm bu verilerden yola çıkılarak, *A. deserticola* türünün kültür büyüme parametrelerine bakıldığında azot varlığının Kl-a değerine pozitif yönde bir etkisi olduğu belirlenmiştir. Aminoasit sonuçları değerlendirildiğinde fosfor varlığının aminoasitler üzerinde pozitif bir etkisi olduğu göze çarpmaktadır. Yağ asitleri sonuçlarına bakıldığında ise en dikkat çeken değerlerin N⁻ ve P⁻ gruplarında gözlemlenmesi, azot ve fosfor azlığının yağ asidi sonuçlarında istatistiksel bir artış gözlemlenmiştir. Son olarak, azotun fazla olduğu ortamlarda toplam yağ ve protein miktarı sonuçları pozitif yönde etkilenmiştir. Kozmesötiklerin formülasyonunda yer alan peptit ve proteinler, kozmetik pazarındaki en popüler bileşenlerdir. Bu bileşenler, cildin yaşlanma belirtilerinin azaltılmasında kullanılan kolajen ve saç bakımı formülasyonlarında yer alan keratin gibi daha yüksek ağırlıklı protein

yapılarından, aminoasitlerin daha küçük oligomer zincirlerine dönüştürülerek onarım fonksiyonu göstermektedirler (İstanbuluoğlu vd.,2020). Hedef kolajen üretimi veya keratin üretimi ise N^+ grubuna ait olan besi ortamı *A. deserticola* türü için kullanılabilir. Hayvan yemlerinde protein ve ham yağ içeriği oldukça önemlidir (Duong vd., 2015). Eğer üretme amacı biyoteknolojik olarak hayvan yemi üretmek ve bunu kullanmak ise yüksek protein ve yağ içeriğine sahip N^+ besi ortamında yetiştirilen *A. deserticola* türü kullanılabilir. İhtiyaç aminoasit üretmek ve bunu kullanmak ise, ek gıda takviyesi olarak amino asitlerin üretimi için en uygun grubumuz ise P^+ grubu ait olan besi ortamı *A. deserticola* türü için kullanılabilir (Ratha vd., 2021). Doymamış yağ asitlerine bakacak olursak sonuç olarak biyoteknolojik açıdan incelendiğinde, yağ asitleri, linolenik asit ve linoleik asit insan gıdası uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Eğer ihtiyacımız insan gıdası üretimi ise N^- grubuna ait olan besi ortamı *A. deserticola* türü için kullanılabilir (Kusmayadi vd., 2021). *A. deserticola* türünü kullanma amacımız biyodizel, biyogaz vs. ise; doymuş yağ asitlerinin en yüksek olduğu grup olan P^- grubuna ait olan besi ortamı kullanılabilir (Kowthaman vd., 2021).

Bu tez, azot ve fosfor eksikliğinin veya fazlalığının *Acutodesmus deserticola* türünün büyümesini ve biyokimyasal içeriğini nasıl etkilediğini anlamak açısından oldukça önemli bir çalışmadır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar *Acutodesmus deserticola* türünün biyoteknolojik alanlarda kullanımı için kültür koşullarını optimize etmede bir yol gösterici niteliğinde olacaktır. N ve P stresinin mikroalg fizyolojisinde yarattığı etkiler ve bu etkilerin metabolik yollarda yarattığı değişikliklerin transkriptomik analizler ile gen seviyesinde aydınlatılması noktasında gelecekte yapılacak çalışmalara veri sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Abu-Ghosh, S., Dubinsky, Z., Verdelho, V., Iluz, D. 2021. Unconventional high-value products from microalgae: A review. *Bioresource Technology*, 329, 124895. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.124895>
- Acién Fernández, F. G., Fernández Sevilla, J. M., Sánchez Pérez, J. A., Molina Grima, E., Chisti, Y. 2001. Airlift-driven external-loop tubular photobioreactors for outdoor production of microalgae: assessment of design and performance. *Chemical Engineering Science*, 56,8, 2721–2732. [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(00\)00521-2](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(00)00521-2)
- Adebayo-Tayo, B., Ishola, R., Oyewunmi, T. 2018. Characterization, antioxidant and immunomodulatory potential on exopolysaccharide produced by wild type and mutant *Weissella confusa* strains. *Biotechnology Reports*, 19, e00271. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00271>
- Adeniyi, O. M., Azimov, U., Burluka, A. 2018. Algae biofuel: Current status and future applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90, 316–335. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2018.03.067>
- Akdoğan, A., Gürsoy, O. 2020. Determination of four priority polycyclic aromatic hydrocarbons (4PAHs) by GC-MS in traditional Turkish yoghurts. Food Additives and Contaminants- Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment, 37,3, 391–400. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1707293>
- Akgül, F., Kizilkaya, İ.T., Akgül, R., Erduğan, H. 2017. Morphological and molecular characterization of *Scenedesmus*-like species from Ergene River basin (Thrace, Turkey). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 17, 609–619. <https://doi.org/10.4194/1303-2712-v1>
- Alaca F., Arslan N. 2012. Sekonder metabolitlerin bitkiler açısından önemi. *Ziraat Mühendisliği*, 358, 48–55. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/zm/issue/52108/680912>
- Altermann, W., Kazmierczak, J., Oren, A., Wright, D. T. 2006. "Cyanobacterial calcification and its rock-building potential during 3.5 billion years of Earth history". *Geobiology*, 4,3, 147–166.
- Andeden, E. E., Ozturk, S., Aslim, B. 2021. Effect of alkaline pH and nitrogen starvation on the triacylglycerol (TAG) content, growth, biochemical composition, and fatty acid profile of *Auxenochlorella protothecoides* KP7. *Journal of Applied Phycology*, 33,1, 211–225. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02311-0>
- Appleton, H., & Rosentrater, K. A. 2021. Sweet Dreams (Are Made of This): A Review and Perspectives on Aspartic Acid Production. *Fermentation* 7,2, 49. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION7020049>
- Arguelles, E. D., Martinez-Goss, M. R. 2020. Lipid accumulation and profiling in microalgae *Chlorolobion* sp. (BIOTECH 4031) and *Chlorella* sp. (BIOTECH 4026)

- during nitrogen starvation for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology* 33,1, 1–11. <https://doi.org/10.1007/S10811-020-02126-Z>
- Arora, N., Patel, A., Pruthi, P. A., Pruthi, V. 2016. Synergistic dynamics of nitrogen and phosphorous influences lipid productivity in *Chlorella minutissima* for *biodiesel production*. *Bioresource Technology*, 213, 79–87. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.02.112>
- Aussant, J., Guihéneuf, F., Stengel, D. B. 2018. Impact of temperature on fatty acid composition and nutritional value in eight species of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102,12, 5279–5297. <https://doi.org/10.1007/S00253-018-9001-X/TABLES/5>
- Banskota, A. H., Sperker, S., Stefanova, R., McGinn, P. J., O’Leary, S. J. B. 2018. Antioxidant properties and lipid composition of selected microalgae. *Journal of Applied Phycology* 31,1, 309–318. <https://doi.org/10.1007/S10811-018-1523-1>
- Bardakçı, B., 2006, Isparta bölgesindeki gül yağının kimyasal içeriğinin GC-MS ve FTIR spektroskopisi tekniği ile incelenmesi. Dergipark.Org.Tr. Retrieved June 9, 2022,
- Bardone, E., Bravi, M., Keshavarz, T., Sforza, E., Gris, B., De Farias Silva, C. E., Morosinotto, T., Bertuccio, A. 2014. Effects of light on cultivation of *Scenedesmus obliquus* in batch and continuous flat plate photobioreactor. *Chemical Engineering Transactions*, 38. <https://doi.org/10.3303/CET1438036>
- Barsanti, L., Coltelli, P., Evangelista, V., Frassanito, A. M., Passarelli, V., Vesentini, N., Gualtieri, P. 2008. Oddities and curiosities in the algal world. NATO Security through Science Series C: Environmental Security, 353–392. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8480-5_17/COVER
- Beijerinck, M.W. 1890. Kulturversuche mit Zooklorofiloren, Lichenengonidien und anderen niederen Algen, *Bot Z*, 48, 725–785.
- Berman-Frank, I., Lundgren, P., Falkowski, P., 2003. Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria, *Research in Microbiology*, 154, 157–164.
- Bernard, O., Rémond, B. 2012. Validation of a simple model accounting for light and temperature effect on microalgal growth. *Bioresource Technology*, 123, 520–527. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.07.022>
- Berthon, J. Y., Nachat-Kappes, R., Bey, M., Cadoret, J. P., Renimel, I., Filaire, E. 2017. Marine algae as attractive source to skin care. *Free Radical Research*, 51,6, 555–567. <https://doi.org/10.1080/10715762.2017.1355550>
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181(4617), 1199–1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- Büyüktuncel, E. 2013. Main spectrophotometric methods for the determination of total phenolic content and antioxidant capacity. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 17,2, 93–103. <https://doi.org/10.12991/201317377>

- Bremner, J. M. 2016. Total Nitrogen. *Methods of Soil Analysis, Part 2: Chemical and Microbiological Properties*, 1149–1178. <https://doi.org/10.2134/AGRONMONOGR9.2.C32>
- Cai, T., Park, S. Y., Li, Y. 2013. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 19, 360–369. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2012.11.030>
- Canbay, H. S. 2019. Oil Ratio and Fatty Acid Composition of Cherry Seed Oil. *Turkish Journal of Health Science and Life*, 2,1, 21–24.
- Cannell, R. J. P. 2006. Algae as a source of biologically active products. *Pesticide Science*, 39, 147–153.
- Caponio, F., Alloggio, V., Gomes, T. 1999. Phenolic compounds of virgin olive oil: influence of paste preparation techniques. *Food Chemistry*, 64,2, 203–209. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00146-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00146-0)
- Cerozi, B. da S., & Fitzsimmons, K. 2016. The effect of pH on phosphorus availability and speciation in an aquaponics nutrient solution. *Bioresource Technology*, 219, 778–781. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.08.079>
- Chacón-Lee, T. L., González-Mariño, G. E. 2010. Microalgae for “Healthy” Foods—Possibilities and Challenges. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9,6, 655–675. <https://doi.org/10.1111/J.1541-4337.2010.00132.X>
- Chandini, Kumar, R., Kumar, R., Prakash, O. 2019. The Impact of Chemical Fertilizers on our Environment and Ecosystem 69–86.
- Chapman, R. L., Buchheim, M. A. 1992. Green algae and the evolution of land plants: inferences from nuclear-encoded rRNA gene sequences. *Biosystems*, 28,1–3, 127–137. [https://doi.org/10.1016/0303-2647\(92\)90015-Q](https://doi.org/10.1016/0303-2647(92)90015-Q)
- Chia, M. A., Lombardi, A. T., Melão, M. da G. G. 2013. Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 85,4, 1427–1438. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201393312>
- Chia, M. A., Lombardi, A. T., Melão, M. da G. G., Parrish, C. C. 2017. Phosphorus levels determine changes in growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* during cadmium stress. *Journal of Applied Phycology*, 29,4, 1883–1891. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1111-9>
- Chia, S. R., Nomanbhay, S., Ong, M. Y., Chew, K. W., Show, P. L. 2022. Renewable diesel as fossil fuel substitution in Malaysia: A review. *Fuel*, 314, 123137.
- Choi, J. S., Bae, H. J., Kim, S. J., Choi, I. S. 2018. In vitro antibacterial and anti-inflammatory properties of seaweed extracts against acne inducing bacteria, *Propionibacterium acnes*. *Journal of Environmental Biology*, 32, 313–318.

- Chowdury, K. H., Nahar, N., Deb, U. K., Chowdury, K. H., Nahar, N., Deb, U. K. (2020). The growth factors Involved in microalgae cultivation for biofuel production: A review. *Computational Water, Energy, and Environmental Engineering*, 9,4, 185–215. <https://doi.org/10.4236/CWEEE.2020.94012>
- Christaki, E., Florou-Paneri, P., Bonos, E. 2011. Microalgae: A novel ingredient in nutrition. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62,8, 794–799. <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.582460>
- Chu, F., Cheng, J., Li, K., Wang, Y., Li, X., Yang, W. 2020. Enhanced Lipid Accumulation through a Regulated Metabolic Pathway of Phosphorus Luxury Uptake in the Microalga *Chlorella vulgaris* under Nitrogen Starvation and Phosphorus Repletion. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 8,22, 8137–8147. https://doi.org/10.1021/ACSSUSCHEMENG.9B07447/ASSET/IMAGES/MEDIUM/SC9B07447_0009.GIF
- Chu, F., Cheng, J., Li, K., Wang, Y., Li, X., Yang, W. 2020. Enhanced Lipid Accumulation through a Regulated Metabolic Pathway of Phosphorus Luxury Uptake in the Microalga *Chlorella vulgaris* under Nitrogen Starvation and Phosphorus Repletion. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 8,22, 8137–8147. https://doi.org/10.1021/ACSSUSCHEMENG.9B07447/ASSET/IMAGES/MEDIUM/SC9B07447_0009.GIF
- Chu, F., Cheng, J., Zhang, X., Ye, Q., Zhou, J. 201). Enhancing lipid production in microalgae *Chlorella* PY-ZU1 with phosphorus excess and nitrogen starvation under 15% CO₂ in a continuous two-step cultivation process. *Chemical Engineering Journal*, 375, 121912. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2019.121912>
- Cilgin, E., 2015. 3. nesil biyoyakıt teknolojisi alglerin bir dizel motorunda performans ve egzoz emisyonlarına etkisinin araştırılması. *Fen Bilimleri Enstitü Dergisi*, 5,5, 33–41.
- Cohn F. 1850. Zur naturgeschichte des *Protococcus pluvialis* kützing, *Nova Acta Academia Leopoldensis Caroliensis*, 22, 509–540.
- Corinaldesi, C., Barone, G., Marcellini, F., Dell’anno, A., Danovaro, R. 2017. Marine drugs marine microbial-derived molecules and their potential use in cosmeceutical and cosmetic products. *Marine Drugs*, 15,4, 118. <https://doi.org/10.3390/md15040118>
- Corrêa, P. S., Wilson, W. G., Caetano, N. S. 2022. Antioxidant potential of extracts of *Chromochloris zofingiensis* cultivated in pilot-scale outdoor tubular photobioreactors under nitrogen limitation. *Algal Research*, 67, 102859. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2022.102859>
- Cortesi, N., Fedeli, E., Ponziani, A. 1981. Characterization of virgin and refined olive oils by HPLC of their polar components. Pt. 1.[Italian]. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*

- Coudert, E., Baéza, E., Berri, C. 2020. Use of algae in poultry production: a review. *World's Poultry Science Journal*, 76,4, 767–786. <https://doi.org/10.1080/00439339.2020.1830012>
- Cox, E. R., Bold, H. (1966). Phycological studies VII. Taxonomic investigations of *Stigeoclonium*.
- Cui, H., Su, Y., Wei, W., Xu, F., Gao, J., Zhang, W. 2022. How Microalgae is Effective in Oxygen Deficiency Aggravated Diseases? A Comprehensive Review of Literature. *International Journal of Nanomedicine*, 17, 3101. <https://doi.org/10.2147/IJN.S368763>
- Da Fontoura, J. T., Rolim, G. S., Farenzena, M., Gutterres, M. 2017. Influence of light intensity and tannery wastewater concentration on biomass production and nutrient removal by microalgae *Scenedesmus* sp. *Process Safety and Environmental Protection*, 111, 355–362. <https://doi.org/10.1016/J.PSEP.2017.07.024>
- Dahmen-Ben Moussa, I., Chtourou, H., Karray, F., Sayadi, S., Dhouib, A. 2017. Nitrogen or phosphorus repletion strategies for enhancing lipid or carotenoid production from *Tetraselmis marina*, *Bioresource Technology*, 238, 325–332. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.04.008>
- Das, A., Kundu, P., Adhikari (Nee Pramanik), S. 2022. Two stage treatability and biokinetic study of dairy wastewater using bacterial consortium and microalgae. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 43, 102387. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2022.102387>
- Deb, U. K., Shahriar, M., Bhowmik, J., Chowdury, M. K. H., Deb, U. K., Shahriar, M., Bhowmik, J., Chowdury, M. K. H. 2017. The effect of irradiance related temperature on microalgae growth in a tubular photo bioreactor for cleaner energy. *American Journal of Computational Mathematics*, 7,3, 371–384. <https://doi.org/10.4236/AJCM.2017.73026>
- Demoulin, C. F., Lara, Y. J., Cornet, L., François, C., Baurain, D., Wilmotte, A., Javaux, E. J. 2019. Cyanobacteria evolution: Insight from the fossil record. *Free Radical Biology and Medicine*, 140, 206–223. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2019.05.007>
- Duong, V. T., Ahmed, F., Thomas-Hall, S. R., Quigley, S., Nowak, E., Schenk, P. M. 2015. High protein- and high lipid-producing microalgae from northern Australia as potential feedstock for animal feed and biodiesel. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3,5, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00053>
- Durmaz, Y., Temli, G. 2018. The effect of different growth medium and different light path length on the culture of *Chlorella vulgaris*. *SU URUNLERI DERGISI*, 35,2, 169–174.
- Elcik, H., Çakmakçı, M. 2017. Mikroalglerden yenilenebilir biyoyakıt üretimi. *Gazi Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 32,3. <https://doi.org/10.17341/gazimmfd.337627>

- Elisabeth, B., Rayen, F., Behnam, T. 2021. Microalgae culture quality indicators: a review., 41,4, 457–473. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1854672>
- El-Sheekh, M. M., Osman, M. E. H., Dyab, M. A., Amer, M. S. 2006. Production and characterization of antimicrobial active substance from the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 21,1, 42–50. <https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2005.06.006>
- Evert R.F., 2016. Raven Bitki Biyolojisi. ISBN: 9786053555186. Yayinevi: Palme. Sayfa: 30.
- Faé Neto, W. A., Borges Mendes, C. R., Abreu, P. C. 2018. Carotenoid production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* in different low-cost culture media. *Aquaculture Research*, 49,7, 2527–2535. <https://doi.org/10.1111/ARE.13715>
- Famintzin A., Die 1871. Anorganischen Salze als ausgezeichnete Hilfsmittel zum Studium der Entwicklung niederer klorofilorophyllhaltiger Organismen, *Bulletin de l'Académie Impériale des Sciences de St.-Petersbourg*, 17, 31–70.
- Fang, L., Leliaert, F., Novis, P. M., Zhang, Z., Zhu, H., Liu, G., Penny, D., Zhong, B. 2018. Improving phylogenetic inference of core *Chlorophyta* using chloroplast sequences with strong phylogenetic signals and heterogeneous models. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 127, 248–255. <https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2018.06.006>
- Farias, C. B. B., Barreiros, R. C. S., da Silva, M. F., Casazza, A. A., Converti, A., Sarubbo, L. A. 2022. "Use of Hydrogen as Fuel: A Trend of the 21st Century". *Energies*, 15,1, 311.
- Farooq, W., Naqvi, S. R., Sajid, M., Shrivastav, A., Kumar, K. 2022. Monitoring lipids profile, CO₂ fixation, and water recyclability for the economic viability of microalgae *Chlorella vulgaris* cultivation at different initial nitrogen. *Journal of Biotechnology*, 345, 30–39. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2021.12.014>
- Favati, F., Caporale, G., Aceites, 1994, Rapid determination of phenol content in extra virgin olive oil. Agri.Fao.Org. Retrieved September 2, 2022, from <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ2012047335>
- Fawzy, M. A., Alharthi, S. 2021. Use of Response Surface Methodology in optimization of biomass, lipid productivity and fatty acid profiles of marine microalga *Dunaliella parva* for biodiesel production. *Environmental Technology Innovation*, 22, 101485. <https://doi.org/10.1016/J.ETI.2021.101485>
- Fradique, M., Batista, A. P., Nunes, M. C., Gouveia, L., Bandarra, N. M., Raymundo, A. (2013). *Isochrysis galbana* and *Diatronema vlkianum* biomass incorporation in pasta products as PUFA's source. *LWT - Food Science and Technology*, 50,1, 312–319. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2012.05.006>
- Freed, R., Mintz, C., Lanza, R., Hockstad, L. 2005. "Analytic framework for analyzing non-energy uses of fossil fuels as petrochemical feedstocks in the USA". *Resources, Conservation and Recycling*, 45,3, 275–294.

- Fu, L., Li, Q., Yan, G., Zhou, D., Crittenden, J. C. 2019. Hormesis effects of phosphorus on the viability of *Chlorella regularis* cells under nitrogen limitation. *Biotechnology for Biofuels*, 12,1, 121. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1458-z>
- Gao, B., Xia, S., Lei, X., Zhang, C. 2018. Combined effects of different nitrogen sources and levels and light intensities on growth and fatty acid and lipid production of oleaginous eustigmatophycean microalga *Eustigmatos cf. polyphem*. *Journal of Applied Phycology*, 30,1, 215–229. <https://doi.org/10.1007/S10811-017-1180-9/TABLES/1>
- Garcia-Gonzalez, J., Sommerfeld, M. 2016. Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*. *Journal of Applied Phycology*, 28,2, 1051–1061. <https://doi.org/10.1007/S10811-015-0625-2/FIGURES/7>
- Gensel, P. G., Glasspool, I., Gastaldo, R. A., Libertin, M., Kvaček, J. 2020. Back to the Beginnings: The Silurian-Devonian as a Time of Major Innovation in Plants and Their Communities. 367–398.
- Gim, G. H., Ryu, J., Kim, M. J., Kim, P. Il, Kim, S. W. 2016. Effects of carbon source and light intensity on the growth and total lipid production of three microalgae under different culture conditions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43,5, 605–616. <https://doi.org/10.1007/S10295-016-1741-Y>
- Gimpel, J. A., Henríquez, V., Mayfield, S. P. 2015. In metabolic engineering of eukaryotic microalgae: Potential and challenges come with great diversity. *Frontiers in Microbiology*, 6,12. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.01376/FULL>
- Godoy-Hernández, G., Vázquez-Flota, F. A. 2012. Growth measurements: Estimation of cell division and cell expansion. In *Methods in Molecular Biology*. 877, pp. 41–48. Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-818-4_4
- Goh, L. P., Jr, Loh, S. P., Fatimah, M. Y., Perumal, K. 2009. Bioaccessibility of Carotenoids and Tocopherols in Marine Microalgae, *Nannochloropsis* sp. and *Chaetoceros* sp. *Malaysian journal of nutrition*, 15,1, 77–86.
- Goiris, K., Muylaert, K., Voorspoels, S., Noten, B., De Paepe, D., E Baart, G. J., De Cooman, L. 2014. Detection of flavonoids in microalgae from different *evolutionary lineages*. *Journal of Phycology*, 50,3, 483–492. <https://doi.org/10.1111/JPY.12180>
- Goiris, K., Van Colen, W., Wilches, I., León-Tamariz, F., De Cooman, L., Muylaert, K. 2015. Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae. *Algal Research*, 7, 51–57. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2014.12.002>
- González-Camejo, J., Aparicio, S., Ruano, M. V., Borrás, L., Barat, R., Ferrer, J. 2019. Effect of ambient temperature variations on an indigenous microalgae-nitrifying bacteria culture dominated by *Chlorella*. sp. *Bioresource Technology*, 290, 121788. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2019.121788>

- González-Vega, R. I., Cárdenas-López, J. L., López-Elías, J. A., Ruiz-Cruz, S., Reyes-Díaz, A., Perez-Perez, L. M., Cinco-Moroyoqui, F. J., Robles-Zepeda, R. E., Borboa-Flores, J., Del-Toro-Sánchez, C. L. 2021. Optimization of growing conditions for pigments production from microalga *Navicula incerta* using response surface methodology and its antioxidant capacity. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28,2, 1401–1416. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2020.11.076>
- Gouda, M. 2021. Recent Innovations of Microalgae Single Cell Phytochemical Studies Emerging Technologies for Detecting the Chemical Composition of Plant and Animal Tissues and Their Bioactivities View project *Food science and technology* View project. <https://doi.org/10.32474/AOICS.2021.05.000203>
- Gökpınar, Ş., Işık, O., Göksan, T., Durmaz, Y., Uslu, L., Ak, B., Önalán, S. K., Akdoğan, P. 2013. Aquaculture Studies, 4. <https://doi.org/10.17693/Yunusae.V2013i21903.235409>
- Griffiths, M. J., Hille, R. P., ve Harrison, S. T. 2011. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions, *Journal of Applied Phycology*, 24, 989–1001. Doi: 10.1007/s10811-011-9723-y
- Guo, S., Wang, P., Wang, X., Zou, M., Liu, C., Hao, J. 2020) Microalgae as biofertilizer in modern agriculture. Microalgae Biotechnology for Food, *Health and High Value Products*, 397–411. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0169-2_12/COVER
- Hashemian, M., Ahmadzadeh, H., Hosseini, M., Lyon, S., Pourianfar, H. R. 2019. Production of Microalgae-Derived High-Protein Biomass to Enhance Food for Animal Feedstock and Human Consumption. Advanced Bioprocessing for Alternative Fuels, Biobased Chemicals, and Bioproducts: *Technologies and Approaches for Scale-Up and Commercialization*, 393–405. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817941-3.00020-6>
- Henriques, B., Lopes, C. B., Figueira, P., Rocha, L. S., Duarte, A. C., Vale, C., Pardal, M. A., Pereira, E. 2017. Bioaccumulation of Hg, Cd and Pb by *Fucus vesiculosus* in single and multi-metal contamination scenarios and its effect on growth rate. *Chemosphere*, 171, 208–222. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2016.12.086>
- Herrera, A., D’Imporzano, G., Acien Fernandez, F. G., Adani, F. 2021. Sustainable production of microalgae in raceways: Nutrients and water management as key factors influencing environmental impacts. *Journal of Cleaner Production*, 287, 125005. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2020.125005>
- Hernández-García, A., Velásquez-Orta, S. B., Novelo, E., Yáñez-Noguez, I., Monje-Ramírez, I., & Orta Ledesma, M. T. 2019. Wastewater-leachate treatment by microalgae: Biomass, carbohydrate and lipid production. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 174, 435–444. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2019.02.052>
- Huang, Y., Lou, C., Luo, L., Wang, X. C. 2021. Insight into nitrogen and phosphorus coupling effects on mixotrophic *Chlorella vulgaris* growth under stably controlled

- nutrient conditions. *Science of The Total Environment*, 752, 141747. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.141747>
- Pancha, I., Chokshi, K., George, B., Ghosh, T., Paliwal, C., Maurya, R., Mishra, S. 2014. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology*, 156, 146–154. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.01.025>
- Ji, M.-K., Abou-Shanab, R. A. I., Hwang, J.-H., Timmes, T. C., Kim, H.-C., Oh, Y.-K., Jeon, B.-H. 2013. Removal of Nitrogen and Phosphorus from Piggery Wastewater Effluent Using the Green Microalga *Scenedesmus obliquus*. *Journal of Environmental Engineering*, 139,9, 1198–1205. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0000726](https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000726)
- Johan, P. D., Ahmed, O. H., Omar, L., Hasbullah, N. A. 2021. Phosphorus Transformation in Soils Following Co-Application of Charcoal and Wood Ash. *Agronomy* 11,10, 2010. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY11102010>
- Kargin, H. (2020). Akuakültürde Kullanılan Mikroalg Üretim Sistemleri Fotobiyoreaktörler Dünyada ve Ülkemizde Kullanımı. *Mediterranean Fisheries and Aquaculture Research*, 3,3, 112–130.
- Kavasbaşıoğlu, M., Aluç, Y., Tüzün, İ. 2020. Farklı besi ortamlarında yetişen *Chlorella vulgaris* türüne ait protein ve aminoasit kompozisyonunun karşılaştırılması. *Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences* <https://doi.org/10.46239/ejbcs.731428>
- Kejžar, J., Jagodic Hudobivnik, M., Nečemer, M., Ogrinc, N., Masten Rutar, J., Poklar Ulrih, N. 2021. Characterization of Algae Dietary Supplements Using Antioxidative Potential, *Elemental Composition, and Stable Isotopes Approach*. *Frontiers in Nutrition*, 7. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2020.618503>
- Kesaano, M., Sims, R. C. 2014. Algal biofilm based technology for wastewater treatment. *Algal Research*, 5,1, 231–240. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2014.02.003>
- Khan, M. I., Shin, J. H., Kim, J. D. 2018. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories* 17,1, 1–21. <https://doi.org/10.1186/S12934-018-0879-X>
- Kim, G., Bae, J., Lee, K. 2016. Nitrate repletion strategy for enhancing lipid production from marine microalga *Tetraselmis* sp. *Bioresource Technology*, 205, 274–279. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.01.045>
- Kim, J., Lee, J. Y., Lu, T. 2014. Effects of dissolved inorganic carbon and mixing on autotrophic growth of *Chlorella vulgaris*. *Biochemical Engineering Journal*, 82, 34–40. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2013.11.007>
- Koksharova, O. A., Safronov, N. A. 2022. The effects of secondary bacterial metabolites on photosynthesis in microalgae cells. *Biophysical Reviews*, 1, 1–14. <https://doi.org/10.1007/S12551-022-00981-3>

- Kothari, R., Pathak, V. V., Kumar, V., Singh, D. P. 2012. Experimental study for growth potential of unicellular alga *Chlorella pyrenoidosa* on dairy waste water: An integrated approach for treatment and biofuel production. *Bioresource Technology*, 116, 466–470. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.03.121>
- Koyande, A. K., Chew, K. W., Rambabu, K., Tao, Y., Chu, D. T., Show, P. L. 2019. Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. *Food Science and Human Wellness*, 8,1, 16–24. <https://doi.org/10.1016/J.FSHW.2019.03.001>
- Kumar Singh, N., Wattal Dhar, D., Singh, N. K., Dhar, D. W. 2011. Microalgae as second generation biofuel. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 31,4, 605–629. <https://doi.org/10.1007/S13593-011-0018-0>
- Kumar, S., S. 2018. Effect of salinity and ph ranges on the growth and biochemical composition of marine microalga- *Nannochloropsis salina*. *International journal of agriculture, environment and biotechnology*, 11,4. <https://doi.org/10.30954/0974-1712.08.2018.6>
- Kusmayadi, A., Leong, Y. K., Yen, H. W., Huang, C. Y., Chang, J. S. 2021. Microalgae as sustainable food and feed sources for animals and humans – Biotechnological and environmental aspects. *Chemosphere*, 271, 129800. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.129800>
- Kowthaman, C. N., Arul Mozhi Selvan, V., Senthil Kumar, P. 2021. Optimization strategies of alkaline thermo-chemical pretreatment for the enhancement of biogas production from de-oiled algae. *Fuel*, 303,7, 121242. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.121242>
- Laraib, N., Manzoor, M., Javid, A., Jabeen, F., Bukhari, S. M., Ali, W., Hussain, A. 2021. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* in sugarcane molasses preceding nitrogen starvation: Biomass productivity, lipid content, and fatty acid analyses. *Environmental Progress and Sustainable Energy*, 40,4. <https://doi.org/10.1002/EP.13625>
- Leandro, A., Pereira, L., Gonçalves, A. M. M. 2019. Diverse Applications of Marine Macroalgae. *Marine Drugs*, 18,1, 17. <https://doi.org/10.3390/MD18010017>
- Lenton, T. M., Watson, A. J. 2000. Redfield revisited: 1. Regulation of nitrate, phosphate, and oxygen in the ocean. *Global Biogeochemical Cycles*, 14,1, 225–248. <https://doi.org/10.1029/1999GB90006>
- Levasseur, W., Perré, P., Pozzobon, V. 2020. A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. *Biotechnology advances*, 41, 107545.
- Li, K., Liu, Q., Fang, F., Luo, R., Lu, Q., Zhou, W., Huo, S., Cheng, P., Liu, J., Addy, M., Chen, P., Chen, D., Ruan, R. 2019. Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: A review. *Bioresource Technology*, 291, 121934. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2019.121934>

- Liang, M. H., Qv, X. Y., Chen, H., Wang, Q., Jiang, J. G. 2017. Effects of salt concentrations and nitrogen and Phosphorus starvations on neutral lipid contents in the green microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65,15, 3190–3197. <https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.7B00552>
- Liang, M. H., Wang, L., Wang, Q., Zhu, J., Jiang, J. G. 2019. High-value bioproducts from microalgae: Strategies and progress. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59,15, 2423–2441. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1455030>
- Lichtenthaler, H. K. 1987. Klorofilorophyll fluorescence signatures of leaves during the autumnal klorofilorophyll breakdown. *Journal of Plant Physiology*, 131,1–2, 101–110. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(87\)80271-7](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(87)80271-7)
- Lin, J., Qian, T. 2022. "Earth's Climate History from 4.5 Billion Years to One Minute". <https://doi.org/10.1080/07055900.2022.2082914>, 60,3–4, 188–232.
- Lin, Y. S., Yuwono, W., Wang, H. Y. 2020. Lipid Induction in *Scenedesmus abundans* GH-D11 by Reusing the Volatile Fatty Acids in the Effluent of Dark Anaerobic Fermentation of Biohydrogen. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 191,1, 258–272. <https://doi.org/10.1007/S12010-020-03294-X/TABLES/5>
- Little, S. M., Senhorinho, G. N. A., Saleh, M., Basiliko, N., Scott, J. A., Little, S. M., Senhorinho, G. N. A., Saleh, M., Basiliko, N., Scott, J. A. 2021. Antibacterial compounds in green microalgae from extreme environments: a review. *Algae*, 36,1, 61–72. <https://doi.org/10.4490/ALGAE.2021.36.3.6>
- López-Pedrouso, M., Lorenzo, J. M., Cantalapiedra, J., Zapata, C., Franco, J. M., Franco, D. 2020. Aquaculture and by-products: Challenges and opportunities in the use of alternative protein sources and bioactive compounds. *Advances in Food and Nutrition Research*, 92, 127–185. <https://doi.org/10.1016/BS.AFNR.2019.11.001>
- Lu, D., Tabil, L. G., Wang, D., Wang, G., Emami, S. 2014. Experimental trials to make wheat straw pellets with wood residue and binders. *Biomass and Bioenergy*, 69, 287–296. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2014.07.029>
- Lv, H., Cui, X., Wahid, F., Xia, F., Zhong, C., Jia, S. 2016. Analysis of the Physiological and Molecular Responses of *Dunaliella salina* to Macronutrient Deprivation. *Plos One*, 11,3, e0152226. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0152226>
- Maadane, A., Merghoub, N., Ainane, T., El Arroussi, H., Benhima, R., Amzazi, S., Bakri, Y., Wahby, I. 2015. Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: Pufa profiles, carotenoids and phenolic content. *Journal of Biotechnology*, 215, 13–19. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2015.06.400>
- Mafinowska, P. 2011. Algae extracts as active cosmetic ingredients. *Zeszyt Naukowy*, 212, 123–129.
- Maisarah, M., Saefumillah, A., Ambarsari, H. 2020. Study of microalgae (*Scenedesmus* Sp.) utilization as phosphate bioremediator (PO_4^{3-}) in domestic wastewater medium. *IOP*

Conference Series: *Materials Science and Engineering*, 763,1, 012055.
<https://doi.org/10.1088/1757-899X/763/1/012055>

- Maity, J. P., Bundschuh, J., Chen, C. Y., Bhattacharya, P. 2014. Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives – A mini review. *Energy*, 78, 104–113.
<https://doi.org/10.1016/J.ENERGY.2014.04.003>
- Markou, G., Georgakakis, D. 2011. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy*, 88,10, 3389–3401. <https://doi.org/10.1016/J.APENERGY.2010.12.042>
- Marques, A., Miranda, J., Batista, A. P., Gouveia, L. 2011. Microalgae biotechnological applications: nutrition, health and environment. *Microalgae: Biotechnology, Microbiology and Energy*, 1-60
- Matos, J., Cardoso, C., Bandarra, N. M., Afonso, C. 2017. Microalgae as healthy ingredients for functional food: A review. *Food and Function*, 8,8, 2672–2685.
- Mazid, M., Khan, T. A. 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. <https://doi.org/10.1039/C7FO00409E>
- McCourt, R. M. 1995. Green algal phylogeny. *Trends in Ecology Evolution*, 10,4, 159–163.
[https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)89027-8](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)89027-8)
- Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J., Adholeya, A. 2016. A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Frontiers in Microbiology*, 7,5, 546.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.00546/BIBTEX>
- Mirshekari, M., Einali, A., Valizadeh, J. 2019. Metabolic changes and activity pattern of antioxidant enzymes induced by salicylic acid treatment in green microalga *Dunaliella salina* under nitrogen deficiency. *Journal of Applied Phycology*, 31,3, 1709–1719.
<https://doi.org/10.1007/S10811-018-1715-8/FIGURES/5>
- Mohsenpour, S. F., Hennige, S., Willoughby, N., Adeloye, A., Gutierrez, T. 2021. Integrating micro-algae into wastewater treatment: A review. *Science of The Total Environment*, 752, 142168. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.142168>
- Molino, A., Iovine, A., Casella, P., Mehariya, S., Chianese, S., Cerbone, A., Rimauro, J., Musmarra, D. (2018). Microalgae characterization for consolidated and new application in human food, animal feed and nutraceuticals. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15,11, 2436.
<https://doi.org/10.3390/IJERPH15112436>
- Morocho-Jácome, A. L., Ruscinc, N., Martinez, R. M., de Carvalho, J. C. M., Santos de Almeida, T., Rosado, C., Costa, J. G., Velasco, M. V. R., Baby, A. R. 2020. (Bio)Technological aspects of microalgae pigments for cosmetics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104,22, 9513–9522.
<https://doi.org/10.1007/S00253-020-10936-X/TABLES/3>

- Mutlu, Y., Isçk, O., Uslu, L., Koç, K. 2011. The effects of nitrogen and phosphorus deficiencies and nitrite addition on the lipid content of *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). *Ajol.Info*, 10,3, 453–456. <https://doi.org/10.5897/AJB10.1390>
- Nagi, M., He, M., Li, D., Gebreluel, T., Cheng, B., Wang, C. 2020. Utilization of tannery wastewater for biofuel production: New insights on microalgae growth and biomass production. *Scientific Reports*, 10,1, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57120-4>
- Nainangu, P., Antonyraj, A. P. M., Subramanian, K., Kaliyaperumal, S., Gopal, S., Sampath Renuka, P., A. W. A. 2020. In vitro screening of antimicrobial, antioxidant, cytotoxic activities, and characterization of bioactive substances from freshwater cyanobacteria *Oscillatoria* sp. SSCM01 and *Phormidium* sp. SSCM02. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29,4, 101772. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101772>
- Navarro, F., Forján, E., Vázquez, M., Toimil, A., Montero, Z., Ruiz-Domínguez, M. del C., Garbayo, I., Castaño, M., Vílchez, C., Vega, J. M. 2017. Antimicrobial activity of the acidophilic eukaryotic microalga *Coccomyxa onubensis*. *Phycological Research*, 65,1, 38–43. <https://doi.org/10.1111/PRE.12158>
- Neveux, N., Bolton, J. J., Bruhn, A., Ras, M. 2018. The Bioremediation Potential of Seaweeds: Recycling Nitrogen, Phosphorus, and Other Waste Products. *Blue Biotechnology: Production and Use of Marine Molecules*, 1 217–239. <https://doi.org/10.1002/9783527801718.ch7>
- Njus, D., Kelley, P. M., Tu, Y. J., Schlegel, H. B. 2020. Ascorbic acid: The chemistry underlying its antioxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 159, 37–43. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2020.07.013>
- Önder, U., Özge, U. 2015. View of Evaluation of Microalgae as Microbial Fertilizer. <http://ojs.ecsdev.org/index.php/ejsd/article/view/238/229>
- Park, Y. H., Han, S. Il, Oh, B., Kim, H. S., Jeon, M. S., Kim, S., Choi, Y. E. 2022. Microalgal secondary metabolite productions as a component of biorefinery: A review. *Bioresource Technology*, 344, 126206. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.126206>
- Parsons', T. R., Strickland, J. D. H. 1963. Marine-plant Pigments, with Revised Equations far Ascertaining Klorofilorophylls and Carotenoids. www.journalofmarineresearch.org
- Peng, L., Fu, D., Chu, H., Wang, Z., Qi, H. 2019. Biofuel production from microalgae: a review. *Environmental Chemistry*, 18,2, 285–297. <https://doi.org/10.1007/S10311-019-00939-0>
- Pereira, L. 2018. Therapeutic and nutritional uses of algae (1st ed., pp. 2–64). Boca Raton, FL: CRC Press. ISBN: 9781498755382.

- Pires, J. C. M., Alvim-Ferraz, M. C. M., Martins, F. G., Simões, M. 2013. Wastewater treatment to enhance the economic viability of microalgae culture. *Environmental Science and Pollution Research*, 20,8, 5096–5105. <https://doi.org/10.1007/S11356-013-1791-X/TABLES/3>
- Popper, Z. A., Michel, G., Hervé, C., Domozych, D. S., Willats, W. G. T., Tuohy, M. G., Kloareg, B., Stengel, D. B. 2011. "Evolution and Diversity of Plant Cell Walls: From Algae to Flowering Plants". <http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev-Arplant-042110-103809>, 62, 567–590
- Prabakaran, G., Moovendhan, M., Dineshkumar, R., Arumugam, A., Matharasi, A., Sampathkumar, P. 2018. Quantitative analysis of phytochemical profile in marine microalgae *Chlorella vulgaris*. *Researchgate.Net*, 8,2, 565. <https://www.researchgate.net/profile/Meivelu-Moovendhan/publication/325745858>
- Prandini, J. M., da Silva, M. L. B., Mezzari, M. P., Pirolli, M., Michelon, W., Soares, H. M. 2016. Enhancement of nutrient removal from swine wastewater digestate coupled to biogas purification by microalgae *Scenedesmus* spp. *Bioresource Technology*, 202, 67–75. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2015.11.082>
- Prata, J. C., da Costa, J. P., Lopes, I., Duarte, A. C., Rocha-Santos, T. 2019. Effects of microplastics on microalgae populations: A critical review. *Science of The Total Environment*, 665, 400–405. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.02.132>
- Pratita, A. T. K., Fathurohman, M., Ruswanto, R., Khusnul, Suhartati, R. 2019. Potential of Autotroph Microalgae (*Spirulina plantentis*) as Antimicrobial agent. *Journal of Physics: Conference Series*, 1179,1, 012173. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1179/1/012173>
- Procházková, G.; Brányiková, I.; Zaklorofiledler, V.; Brányik, T. 2013 Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. *Journal. Application. Phycol.*, 26, 1359–1377
- Qiu, R., Gao, S., Lopez, P. A., Ogden, K. L. 2017. Effects of pH on cell growth, lipid production and CO₂ addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Algal Research*, 28, 192–199. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2017.11.004>
- Quiroz Arita, C. E., Peebles, C., Bradley, T. H. 2015. Scalability of combining microalgae-based biofuels with wastewater facilities: A review. *Algal Research*, 9, 160–169. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2015.03.001>
- Rai, M. P., Gupta, S. 2017. Effect of media composition and light supply on biomass, lipid content and FAME profile for quality biofuel production from *Scenedesmus abundans*. *Energy Conversion and Management*, 141, 85–92. <https://doi.org/10.1016/J.ENCONMAN.2016.05.018>
- Ran, X., Shen, Y., Jiang, D., Wang, C., Li, X., Zhang, H., Pan, Y., Xie, C., Xie, T., Zhang, Y., Yao, C. 2022. Nutrient Deprivation Coupled with High Light Exposure for Bioactive Chrysolaminarin Production in the Marine Microalga *Isochrysis zhangjiangensis*. *Marine Drugs*, 20,6, 351. <https://doi.org/10.3390/MD20060351/S1>

- Razzak, S. A., Hossain, M. M., Lucky, R. A., Bassi, A. S., De Lasa, H. 2013. Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing—A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 622–653. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2013.05.063>
- Ratha, S. K., Renuka, N., Rawat, I., Bux, F. 2021. Prospective options of algae-derived nutraceuticals as supplements to combat COVID-19 and human coronavirus diseases. *Nutrition*, 83, 111089. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2020.111089>
- Renuka, N., Prasanna, R., Sood, A., Ahluwalia, A. S., Bansal, R., Babu, S., Singh, R., Shivay, Y. S., Nain, L. 2016. Exploring the efficacy of wastewater-grown microalgal biomass as a biofertilizer for wheat. *Environmental Science and Pollution Research*, 23,7, 6608–6620. <https://doi.org/10.1007/S11356-015-5884-6/FIGURES/3>
- Riley, R., Chapman, V. 1958. The production and phenotypes of wheat-rye chromosome addition lines. *Heredity*, 12,3, 301-315
- Riyazat Khadim, S., Mohanta, A., Singh, P., Maurya, P., Kumar Singh, A., Kumar Singh, A., Asthana, R. K. 2022. A Study on *Dunaliella salina* Under Selected Nutrient Manipulation with Reference to the Biomass, Lipid Content Along with Expression of ACCase and RuBisCO Genes. *Bioenergy Research*, 1, 1–16. <https://doi.org/10.1007/S12155-022-10460-Y/FIGURES/6>
- Rizwan, M., Mujtaba, G., Memon, S. A., Lee, K., Rashid, N. 2018. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 92, 394–404. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2018.04.034>
- Safar, H., Wagenen, J. Van, Møller, P., Jacobsen, C. 2015. Carotenoids, Phenolic Compounds and Tocopherols Contribute to the Antioxidative Properties of Some Microalgae Species Grown on Industrial Wastewater. *Marine Drugs*, 13,12, 7339–7356. <https://doi.org/10.3390/MD13127069>
- Santos-Ballardo, D. U., Rossi, S., Hernández, V., Gómez, R. V., del Carmen Rendón-Unceta, M., Caro-Corrales, J., Valdez-Ortiz, A. 2015. A simple spectrophotometric method for biomass measurement of important microalgae species in aquaculture. *Aquaculture*, 448, 87–92. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.044>
- Sarat Chandra, T., Deepak, R. S., Maneesh Kumar, M., Mukherji, S., Chauhan, V. S., Sarada, R., Mudliar, S. N. 2016. Evaluation of indigenous fresh water microalga *Scenedesmus obtusus* for feed and fuel applications: Effect of carbon dioxide, light and nutrient sources on growth and biochemical characteristics. *Bioresource Technology*, 207, 430–439. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.01.044>
- Sedra, A.S., Smith, K.C., 2009. Microelectronic Circuits, Sixth Edition. Oxford University Press, New York, sayfa 1456.

- Shaima, A. F., Mohd Yasin, N. H., Ibrahim, N., Takriff, M. S., Gunasekaran, D., Ismaeel, M. Y. Y. 2022. Unveiling antimicrobial activity of microalgae *Chlorella sorokiniana* (UKM2), *Chlorella* sp. (UKM8) and *Scenedesmus* sp. (UKM9). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29,2, 1043–1052. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2021.09.069>
- Shanab, S. M., Mostafa, S. S., Shalaby, E. A., Ghada I Mahmoud. 2012. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. [https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60106-3](https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60106-3)
- Singh, P., Guldhe, A., Kumari, S., Rawat, I., Bux, F. 2015. Investigation of combined effect of nitrogen, phosphorus and iron on lipid productivity of microalgae *Ankistrodesmus falcatus* KJ671624 using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 94, 22–29. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2014.10.019>
- Song, D., Xi, B., Sun, J. 2016. Characterization of the growth, klorofilorophyll content and lipid accumulation in a marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* under different nitrogen to phosphorus ratios. *Journal of Ocean University of China*, 15,1, 124–130. <https://doi.org/10.1007/S11802-016-2797-Z>
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101,2, 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Sruthi, D., Jayabaskaran, C. 2021. Plant Secondary Metabolites The Key Drivers of Plant's Defence Mechanisms: A General Introduction. *Biotechnological Approaches to Enhance Plant Secondary Metabolites*, 1–26. <https://doi.org/10.1201/9781003034957-1>
- Suganya, T., Varman, M., Masjuki, H. H., Renganathan, S. 2016. Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 55, 909–941. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2015.11.026>
- Tokuşoglu, Ö., Ünal, M. K. 2003. Biomass Nutrient Profiles of Three Microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. *Journal of Food Science*, 68,4, 1144–1148. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.2003.TB09615.X>
- Torres-Tiji, Y., Fields, F. J., Mayfield, S. P. 2020. Microalgae as a future food source. *Biotechnology Advances*, 41, 107536. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2020.107536>
- Tredici, M R, Bassi, N., Prussi, M., Biondi, N., Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Sampietro, G. 2015. Energy balance of algal biomass production in a 1-ha “Green Wall Panel” plant: How to produce algal biomass in a closed reactor achieving a high Net Energy Ratio. *Applied Energy*, 154, 1103–1111. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.01.086>
- Tredici, Mario R, Zittelli, G. C. 1998. Efficiency of Sunlight Utilization: Tubular Versus Flat Photobioreactors. *Biotechnol Bioengineering*, 57, 187–197. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980120\)57:2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980120)57:2)

- Troitsky, A. V., Ignatov, M. S., Bobrova, V. K., Milyutina, I. A. 2007. "Contribution of genosystematics to current concepts of phylogeny and classification of bryophytes". *Biochemistry*, 72,12, 1368–1376
- Uslu, L., Işık, O., Koç, K., Göksan, T. 2013. The effects of nitrogen deficiencies on the lipid and protein contents of *Spirulina platensis*. *African Journal of Biotechnology*, 10(3), 386–389. <https://doi.org/10.4314/ajb.v10i3>
- Uslu, L., Oya Işık, •, Barış, Y., Sayın, S. 2022. Effects of Nitrogen and Phosphorus Concentrations on the Growth and Lipid Accumulation of Microalgae *Scenedesmus obliquus*. *Marine Science and Technology Bulletin*, 11,2, 194–201. <https://doi.org/10.33714/MASTEB.1100624>
- Varshney, P., Sohoni, S., Wangikar, P. P., Beardall, J. 2016. Effect of high CO₂ concentrations on the growth and macromolecular composition of a heat- and high-light-tolerant microalga. *Journal of Applied Phycology*, 28,5, 2631–2640. <https://doi.org/10.1007/S10811-016-0797-4/TABLES/2>
- Venkata Mohan, S., Prathima Devi, M. 2014. Salinity stress induced lipid synthesis to harness biodiesel during dual mode cultivation of mixotrophic microalgae. *Bioresource Technology* 165, 288-294. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.103>
- Vidotti, E. C., Rollemberg, M. D. C. E. 2004. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. *Química Nova*, 27,1, 139–145. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000100024>
- Vieira, V., Cadoret, V.; Acien, J.-P.; Benemann, F. G. ;, Vieira, V. V., Cadoret, J.-P., Acien, F. G., Benemann, J. 2022. Clarification of Most Relevant Concepts Related to the Microalgae Production Sector. *Processes*, 175, 10,1, <https://doi.org/10.3390/PR10010175>
- Vizcaíno, A. J., Rodiles, A., López, G., Sáez, M. I., Herrera, M., Hachero, I., Martínez, T. F., Cerón-García, M. C., Alarcón, F. J. 2018. Growth performance, body composition, and digestive functionality of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles fed diets including microalgae freeze-dried biomass. *Fish Physiology and Biochemistry*, 44,2, 661–677. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0462-8>
- Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y., Wang, Y., Ruan, R. 2010. Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162,4, 1174–1186. <https://doi.org/10.1007/S12010-009-8866-7/TABLES/6>
- Wang, Yanwen, Tibbetts, S. M., McGinn, P. J. 2021. Microalgae as sources of high-quality protein for human food and protein supplements. *Foods*, 10,12. <https://doi.org/10.3390/FOODS10123002>
- Wang, Yizheng, Yu, J., Wang, P., Deng, S., Chang, J., Ran, Z. 2018. Response of energy microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* to nitrogen and phosphorus stress.

Environmental Science and Pollution Research, 25,6, 5762–5770.
<https://doi.org/10.1007/S11356-017-0931-0/FIGURES/4>

- Wong, Y., Ho, Y., Ho, K., Leung, H., Yung, K. 2016. Maximization of cell growth and lipid production of freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by enrichment technique for biodiesel production, *Environmental Science and Pollution Research*, 24,10) 9089-9101. Doi: 10.1007/s11356-016-7792-9
- Wood, J. M., Wang, H.-K. 2012. Microbial resistance to heavy metals. *Environmental Science Technology*, 17,12, 582A-590A. <https://doi.org/10.1021/ES00118A717>
- Xu, H., Miao, X., Wu, Q. 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, 126,4, 499–507. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2006.05.002>
- Xu, N.; Zhang, X.; Fan, X.; Han, L.; Zeng, C. 2001 Effects of nitrogen source and concentration on growth rate and fatty acid composition of *Ellipsoidion* sp. (*Eustigmatophyta*). *Journal. Application. Phycol.*, 13, 463–469
- Yaakob, M. A., Mohamed, R. M. S. R., Al-Gheethi, A., Ravishankar, G. A., Ambati, R. R. 2021. Influence of Nitrogen and Phosphorus on Microalgal Growth, Biomass, Lipid, and Fatty Acid Production: An Overview. *Cells*, 10,2, 393. <https://doi.org/10.3390/CELLS10020393>
- Yadav, A. N., Kour, D., Rana, K. L., Yadav, N., Singh, B., Chauhan, V. S., Rastegari, A. A., Hesham, A. E. L., Gupta, V. K. (2019). Metabolic Engineering to Synthetic Biology of Secondary Metabolites Production. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: *Microbial Secondary Metabolites Biochemistry and Applications*, 279–320. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63504-4.00020-7>
- Yang, L., Chen, J., Qin, S., Zeng, M., Jiang, Y., Hu, L., Xiao, P., Hao, W., Hu, Z., Lei, A., Wang, J. 2018. Growth and lipid accumulation by different nutrients in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology for Biofuels*, 11,1, 40. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1041-z>
- Yang, L., Wen, K.-S., Ruan, X., Zhao, Y.-X., Wei, F., Wang, Q. 2018. Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors, *Molecules* 23,4 <https://doi.org/10.3390/molecules23040762>
- Yarnold, J., Karan, H., Oey, M., Hankamer, B. 2019. Microalgal Aquafeeds As Part of a Circular Bioeconomy. *Trends in Plant Science*, 24,10, 959–970. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2019.06.005>
- Yıldız, G., Aktürk, C., Özerkan, M., & Yılmaz, Ö. 2020. *Linum arboreum* L. (Linaceae) Türevinin antioksidan içeriği ve serbest radikal süpürücü aktivitesi. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 2,1, 16–23. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.530120>

- You, X., Yang, L., Zhou, X., Zhang, Y. 2022. Sustainability and carbon neutrality trends for microalgae-based wastewater treatment: A review. *Environmental Research*, 209, 112860. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2022.112860>
- Yu, S. J., Hu, H., Zheng, H., Wang, Y. Q., Pan, S. B., Zeng, R. J. 2019. Effect of different phosphorus concentrations on biodiesel production from *Isochrysis zhangjiangensis* under nitrogen sufficiency or deprivation condition. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103,12, 5051–5059. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09814-y>
- Yu, Z., Robinson, S. M. C., Xia, J., Sun, H., Hu, C. 2016. Growth, bioaccumulation and fodder potentials of the seaweed *Sargassum hemiphyllum* grown in oyster and fish farms of South China. *Aquaculture*, 464, 459–468. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2016.07.031>
- Zarrinmehr, M. J., Farhadian, O., Heyrati, F. P., Keramat, J., Koutra, E., Kornaros, M., Daneshvar, E. 2020. Effect of nitrogen concentration on the growth rate and biochemical composition of the microalga, *Isochrysis galbana*. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 46,2, 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2019.11.003>
- Zhang, Y., Wu, H., Yuan, C., Li, T., Li, A. 2019. Growth, biochemical composition, and photosynthetic performance of *Scenedesmus acuminatus* during nitrogen starvation and resupply. *Journal of Applied Phycology*, 31,5, 2797–2809. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01783-z>
- Zhou, W., Hu, B., Li, Y., Min, M., Mohr, M., Du, Z., Chen, P., Ruan, R. 2012. Mass cultivation of microalgae on animal wastewater: A sequential two-stage cultivation process for energy crop and omega-3-rich animal feed production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168,2, 348–363. <https://doi.org/10.1007/S12010-012-9779-4/FIGURES/4>
- Zhu, L. 2015. Microalgal culture strategies for biofuel production: a review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 9,6, 801–814. <https://doi.org/10.1002/BBB.1576>
- Zhu, L., Li, S., Hu, T., Nugroho, Y. K., Yin, Z., Hu, D., Chu, R., Mo, F., Liu, C., Hiltunen, E. 2019. Effects of nitrogen source heterogeneity on nutrient removal and biodiesel production of mono- and mix-cultured microalgae. *Energy Conversion and Management*, 201, 112144. <https://doi.org/10.1016/J.ENCONMAN.2019.112144>