



Mikroalgal biyodizel üretiminde Bor kullanımı üzerine bir araştırma

Program Kodu: 1002

Proje No: 117Y314

Proje Yürütücüsü:
Öğr.Gr.Doç. Dr. Zeynep ELİBOL ÇAKMAK

Araştırmacı(lar):
Doç.Dr.Turgay Çakmak

Bursiyer(ler):
Wisseem Mhiri

Nisan 2019
İSTANBUL



ÖNSÖZ

Bor (B) bütün bitkisel organizmaların büyüme ve gelişimi için gerekli bir elementtir. Hatta bitki, mantar, maya ve alg kültürlerinde büyüme ortamına ilave edilen ve sürekli bulunması gereken tek yarı-metal B elementidir. Bu projede çeşitli bor bileşiklerinin (Borik asit, Kolemanit, Uleksit) bazı mikroalglerin büyümeleri ve biyodizel hammaddesi olarak kullanılan triaçilgliserol (TAG) üretimleri üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bununla birlikte büyümede en az baskılanma ile nötral lipid içeriğinde en fazla artışın kaydedildiği Bor konsantrasyonlarını belirleyerek Bor elementinin ve borlu bileşiklerin mikroalglerin biyodizel hammaddesi olarak kullanılan TAG içeriklerinin artırılmasında kullanılabilirliğinin tanımlanması hedeflenmiştir. Yapılan çalışmalarda farklı konsantrasyonlarda uygulanan borlu bileşiklerin *Chlamydomonas reinhardtii* ve *Chlorella vulgaris* gibi bazı mikroalglerden biyodizel hammaddesi üretimi amacıyla kullanılabilecek ekonomik ve potansiyel bir yaklaşım olduğu değerlendirilmiştir.

Bu araştırma projesi TÜBİTAK tarafından “1002- Hızlı Destek Programı” kapsamında 01 Mart 2018 - 01 Mart 2019 tarihleri arasında 12 ay süre ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
TABLolar DİZİNİ.....	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1. Alternatif Enerji Kaynağı Olarak Biyodizel	3
2.1.1. Mikroalglerden Biyodizel Üretimi	5
3. GEREÇ VE YÖNTEM	8
3.1. Kültür şartları ve deneysel yaklaşım.....	8
3.2. Toplam nötral lipid tayini	10
3.3. Toplam lipid tayini	10
3.4. Sitoplazmik Lipid Cisimlerinin Floresans Görüntülenmesi.	11
3.5. FT-IR analizi ile Triaçilgliserollerin miktarsal tayini	11
3.6. Mikroalgal lipidlerin transesterifikasyonu ve yağ asidi metil ester (YAME) analizi.....	12
3.7. Toplam nişasta tayini	13
3.8. Toplam protein tayini.....	13
3.9. Toplam Klorofil ve Toplam Karotenoidlerin Spektrofotometrik Tayini	14
3.10. İstatistik hesaplamalar	15
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	16
4.1. Türlerle uygulanacak Borik asit yoğunluğunun belirlenmesi.....	16
4.2. Mikroalglerin büyümesi üzerine borlu bileşiklerin etkileri	18
4.3. Artan konsantrasyonlarda borlu bileşiklere cevapta mikroalglerin Triaçilgliserol (TAG), nötral lipid ve toplam lipid içeriklerinde meydana gelen değişiklikler	24
4.3.1. <i>C.reinhardtii</i> 'nin TAG, nötral lipid ve toplam lipid içeriğindeki değişimler	24
4.3.2. <i>C.vulgaris</i> 'in TAG, nötral lipid ve toplam lipid içeriğindeki değişimler	26
4.3.3. <i>N.oculata</i> 'nın TAG, nötral lipid ve toplam lipid içeriğindeki değişimler	28

4.3.4. <i>P.tricornutum</i> 'un TAG, nötral lipid ve toplam lipid içeriğindeki değişimler	30
4.3.5. <i>Synechocystis</i> sp.'in TAG, nötral lipid ve toplam lipid içeriğindeki değişimler	31
4.4. Sitoplazmik lipid cisimlerinin floresans görüntülenmesi	33
4.5. Mikroalglerin Yağ asidi metil ester (YAME) analizleri.	34
4.6. Mikroalglerin toplam protein ve karbohidrat içeriklerinde meydana gelen değişimler.	37
4.7. Mikroalglerin toplam klorofil ve karotenoid içeriklerinde meydana gelen değişimler.	41
5.SONUÇLAR.....	45
6. KAYNAKLAR	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Petrol yerine biyodizel kullanıldığında; havadaki kirli gazların emisyon değişimi.....	3
Şekil 2. Toplam karbohidrat tayini için kullanılmış olan standart grafik.....	13
Şekil 3. Protein tayini için hazırlanmış standart grafik	14
Şekil 4. Mikroalglerin kültüre alındıkları ortamlardaki Bor elementi yoğunluğuna göre artan H_3BO_3 konsantrasyonlarının mikroalglerin büyümeleri üzerine etkileri.....	17
Şekil 5. <i>C.reinhardtii</i> mikroalginin büyümesi üzerine artan konsantrasyonlarda Borik asit (B), Kolemanit (K) ve Uleksit (U) etkileri.....	20
Şekil 6. <i>C. vulgaris</i> 'in büyümesi üzerine artan konsantrasyonlarda Borik asit (B), Kolemanit (K) ve Uleksit (U) etkileri	21
Şekil 7. <i>N.oculata</i> 'nın büyümesi üzerine artan konsantrasyonlarda Borik asit (B), Kolemanit (K) ve Uleksit (U) etkileri	22
Şekil 8. <i>P.tricornutum</i> 'un büyümesi üzerine artan konsantrasyonlarda Borik asit (B), Kolemanit (K) ve Uleksit (U) etkileri	23
Şekil 9. <i>Synechocystis</i> sp. mikroalginin büyümesi üzerine artan konsantrasyonlarda Borik asit (B), Kolemanit (K) ve Uleksit (U) etkileri	24
Şekil 10. <i>C.reinhardtii</i> 'nin TAG (a), Nötral lipid (b) ve Toplam lipid (c) üretimi üzerine borlu bileşiklerin (B, Borik asit; K, Kolemanit; U, Uleksit) etkileri	25
Şekil 11. <i>C.vulgaris</i> 'in TAG (a), Nötral lipid (b) ve Toplam lipid (c) üretimi üzerine borlu bileşiklerin (B, Borik asit; K, Kolemanit; U, Uleksit) etkileri	27
Şekil 12. <i>N.oculata</i> 'nın TAG (a), Nötral lipid (b) ve Toplam lipid (c) üretimi üzerine borlu bileşiklerin (B, Borik asit; K, Kolemanit; U, Uleksit) etkileri	29
Şekil 13. <i>P.tricornutum</i> 'un TAG (a), Nötral lipid (b) ve Toplam lipid (c) üretimi üzerine borlu bileşiklerin (B, Borik asit; K, Kolemanit; U, Uleksit) etkileri	31
Şekil 14. <i>Synechocystis</i> sp.'nin TAG (a) ve Nötral lipid (b) üretimi üzerine borlu bileşiklerin (B, Borik asit; K, Kolemanit; U, Uleksit) etkileri.....	32
Şekil 15. Logaritmik büyüme evresinde mikroalglerin Yağ asidi metil ester (YAME) analizi.	35
Şekil 16. <i>C.reinhardtii</i> 'nin toplam protein ve karbohidrat üretimi üzerine borlu bileşiklerin etkileri.....	37
Şekil 17. <i>C.vulgaris</i> 'in toplam protein ve karbohidrat üretimi üzerine borlu bileşiklerin etkileri.....	38
Şekil 18. <i>N.oculata</i> 'nın toplam protein ve karbohidrat üretimi üzerine borlu bileşiklerin etkileri... ..	40

Şekil 19. <i>P.tricornutum</i> 'un toplam protein ve karbohidrat üretimi üzerine borlu bileşiklerin etkileri..	41
Şekil 20. <i>C.reinhardtii</i> 'nin toplam klorofil ve karotenoid içeriğine borlu bileşiklerin etkileri	42
Şekil 21. <i>C.vulgaris</i> 'in toplam klorofil ve karotenoid içeriğine borlu bileşiklerin etkileri	43
Şekil 22. <i>N.ocularata</i> 'nın toplam klorofil ve karotenoid içeriğine borlu bileşiklerin etkileri	44
Şekil 23. <i>P.tricornutum</i> 'un toplam klorofil ve karotenoid içeriğine borlu bileşiklerin etkileri	44

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Siyanobakteri ve mikroalglerin kùltùre alındığı ortamlardaki H_3BO_3 konsantrasyonları	9
Tablo 2. İlk büyüme analizi sonrasında çalışmada kullanılan mikroalgler (<i>C.reinhardtii</i> , <i>N.oculata</i> , <i>C.vulgaris</i> ve <i>P.tricornutum</i>) ile <i>Synechocystis</i> sp. siyanobakterisine uygulanan borlu bileşik konsantrasyonları.....	10
Tablo 3. Çalışmada kullanılan türlerin sistematik farklılıkları, büyüme ortamları ve ilk büyüme ölçümleri için büyüme ortamlarında kullanılan H_3BO_3 konsantrasyonları	16
Tablo 4. Yapılan büyüme analizleri dikkate alınarak çalışmanın ilerleyen evresinde mikroalglerin büyüme ortamlarında kullanılan borlu bileşiklerin konsantrasyonları.....	18
Tablo 5 Logaritmik büyüme evresinde mikroalglerin sitoplazmik lipid cisimlerinin floresans görüntüleri.....	33

ÖZET

Bor (B) bütün bitkisel organizmaların büyüme ve gelişimi için gerekli bir elementtir. Hatta bitki, mantar, maya ve alg kültürlerinde büyüme ortamına ilave edilen ve sürekli bulunması gereken tek yarı-metal B elementidir. Bu projede çeşitli borlu bileşiklerin (Borik asit, Kolemanit ve Uleksit) bazı mikroalglerin büyümeleri ve biyodizel hammaddesi olarak kullanılan triaçilgliserol (TAG) üretimleri üzerine etkileri incelenmiştir. Bununla birlikte büyümede en az baskılanma ile nötral lipid içeriğinde en fazla artışın kaydedildiği B konsantrasyonlarını belirleyerek B elementinin ve borlu bileşiklerin mikroalglerin biyodizel hammaddesi olarak kullanılan TAG içeriklerinin artırılmasında kullanılabilirliğinin tanımlanması hedeflenmiştir.

Bu amaçla, proje kapsamında biyoteknolojik açıdan literatürde önemi yer tutan tatlı su mikroalgleri *C. reinhardtii* ve *C.vulgaris* ile denizel mikroalg *N.oculata* ve diyatom *P.tricornutum* türünün yanında bir de siyanobakteri *Synechocystis* sp. türleri çalışmaya tabi tutulmuştur. Yapılan çalışmalar sonucunda artan konsantrasyonlarda Borik asit, Kolemanit ve Uleksit uygulamalarına verilen fizyolojik cevaplar kullanılan borlu bileşiğin çeşidi ve projede kullanılan mikroalg türüne bağlı olarak farklılıklar sergilediği anlaşılmıştır. Öncelikle artan B yoğunluğunun TAG üretim açısından siyanobakteri *Synechocystis* sp.'de önemli bir etkisinin olmadığı değerlendirilmiştir. Öte yandan ortam Borik asit yoğunluğu 4,6mM'a kadar çıkarıldığında çalışmada kullanılan mikroalglerin büyümelerinde kaydadeğer bir değişim belirlenmemiştir. Yine artan konsantrasyonlarda Borlu bileşik uygulamasının genel olarak *P.tricornutum* ve *N.oculata*'nın toplam karbohidrat üretiminde artışa sebep olsa da TAG üretiminde kayda değer bir artışı tetiklemediği anlaşılmıştır.

C.reinhardtii'ye artan konsantrasyonlarda Borik asit ve Kolemanit uygulanması biyodizel hammaddesi olarak kullanılan TAG üretiminde ve yağ asidi metil ester (YAME) içeriğinde olumlu katkılar sağladığı anlaşılmaktadır. Kolemanit uygulamasının sebep olduğu büyümedeki baskılanma dikkate alındığında 4 güne kadar 1,54mM konsantrasyonda Kolemanit uygulaması ya da bu mikroalgin büyüme ortamındaki Borik asit yoğunluğunun 8 gün boyunca 4,6mM'a çıkarılması *C.reinhardtii*'den biyodizel hammaddesi üretimi için bu projeden elde edilen sonuçlara göre en uygun yaklaşımlar olabileceği değerlendirilmiştir.

C.vulgaris'in büyüme ortamına artan konsantrasyonda borlu bileşikler uygulandığında TAG üretimi artmış, YAME içerisindeki çoklu doymamış yağ asidi oranında da azalma kaydedilmiştir. Bununla birlikte bu çalışmada, 0,93mM Uleksit uygulamasının büyümede düşük düzeyde sayılabilecek bir baskılanma ile kısa sürede lipid üretiminde artışı tetiklediği, böylece 8 gün boyunca 0,93mM Uleksit uygulamasının *C.vulgaris*'ten biyodizel hammaddesi üretimi için diğer uygulamalara göre daha üstün olduğu değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak bu proje kapsamında yapılan çalışmalarda farklı konsantrasyonlarda uygulanan borlu bileşiklerin *C. reinhardtii* ve *C. vulgaris* gibi bazı mikroalglerden biyodizel hammaddesi üretimi amacıyla kullanılabilecek ekonomik ve potansiyel bir yaklaşım olduğu değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyodizel, Borik asit, Kolemanit, mikroalg, Uleksit

ABSTRACT

Boron (B) is an element that is necessary for growth and development of all terrestrial plants. In fact, B is the only semimetal that is necessary to be included in growth media of plants, fungi, yeast, and algae. In this project, impact of some boron compounds (Boric acid, Kolemanit, and Uleksit) on growth and triacylglycerol (TAG) production of some microalgae was investigated. Besides, it was aimed to define use of B and Boron compounds for induction of microalgal TAG production by determining the most optimum B concentration that cause the least impact on suppression of growth and maximum production of TAG.

With this aim, freshwater microalgae *C. reinhardtii* and *C.vulgaris*, marine microalga *N.ocuata*, diatom *P.tricornutum* and cyanobacterium *Synechocystis* sp. were employed in the scope of the project. Results showed that application of increased Boric acid, Kolemanit and Uleksit concentrations results with different physiological responses depending on the species. First, increased B concentration was evaluated to be ineffective on TAG production of cyanobacterium *Synechocystis* sp. On the other hand, growth of microalgae did not show drammatical changes when the Boric acid concentration of media increased up to 4,6mM. Besides this, TAG content of *P.tricornutum* and *N.oculata* did not show remarkable changes even if the carbohydrate production increased as a response to increased concentrations of Boron compounds.

Increased concentrations of Boric acid and Kolemanit induced TAG production and improved fatty acid methyl esters (FAME) production of *C.reinhardtii*. Results showed that 1,54mM Kolemanit application for 4 days or 4,6mM Boric acid application for 8 days provide more convenient approach for biodiesel feedstock production from *C.reinhardtii*.

When increasing concentrations of boron compounds applied in *C.vulgaris* growth medium, TAG content increased and polyunsaturated fatty acid ratio decreased in FAME. Besides, 0,93mM Uleksit application caused increased lipid production while causing little impact on growth in a short time period; thus, 0,93mM Uleksit application for 8 days was shown to be an effective way for biodiesel feedstock production from *C.vulgaris*.

As a result, this study showed that application of different concentrations of boron compounds can be considered as an economic and potential approach for production of biodiesel feedstock from microalgae including *C.reinhardtii* and *C.vulgaris*.

Keywords: Biodiesel, Boric acid, Kolemanit, Uleksit, Microalgae

1. GİRİŞ

Bor (B), bütün bitkisel organizmalar için büyüme ortamında bulunması gerekli bir elementtir. Bitkilerin B elementine olan gereksinimlerinin birbirinden farklı düzeylerde olduğu belirlenmiştir. Örneğin latisiferli bitkiler (lateks üreten bitkiler) B gereksinimi en fazla olan bitkiler iken otsu bitkiler büyüme ve gelişmelerinde B elementine en az gereksinim duyan bitkilerdir (Mengel ve Kirkby, 2001). Bor elementinin bitkisel hücreler için asıl rolünün hücre duvarının yapısına katılan pektin sentezi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (O'Neill vd., 2004). Ancak hücre duvarı bulunmayan bazı mayalar (Bennett vd., 1999) ve hayvansal embriyo gelişimi üzerine borun sınırlayıcı etkileri (Lanoue vd., 2000) bu elementin diğer birçok fizyolojik role sahip olduğunu göstermektedir.

Bor, periyodik tabloda gösterilen yarı metaller içerisinde elektronegativitesi en düşük elementtir. Bu özelliği B elementinin kimyasal ve biyokimyasal proseslerdeki davranışı ile ilgili baskın rol oynar (Kot, 2009). Bor elmasa yakın bir sertliğe sahip ışığı kıran bir elementtir. Atom numarası 5'dir ve B sembolü ile gösterilir. Doğada serbest olarak bulunan bir element değildir. Bor elementi uygun koşullar sağlandığında yüksek seviyede yanıcı, patlayıcı özellikler gösterdiği bilinmektedir. Dışarı ısı yayan bu kimyasal reaksiyon sonucu bir gaz emisyonu da olmamaktadır. Bu yüzden bor elementinin alternatif yakıt olarak kullanılması üzerine yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Günümüzde bor elementinin yakıt olarak kullanıldığı teknik olarak yeterli motorlar geliştirilmesine rağmen yüksek maliyetler nedeniyle şu an için günlük kullanıma inmemiş (<http://www.turksan.com>) olan borun bitki büyümesi için gerekliliği ilk olarak 20. yüzyılın başlarında belirlenmiştir ve günümüzde B elementinin bitki büyümesi için ortamda sürekli bulunması gereken esansiyel bir element olduğu kanıtlanmıştır. Bugün B elementinin bitkilerde öncelikli rolünün hücre duvarının yapısı ve fonksiyonu ile ilişkili olduğu bilinmektedir.

Bor elementinin sadece bitkiler için değil, mantarlar, hayvansal hücreler, siyanobakteriler ve algler için de büyüme ve gelişmede sürekli ihtiyaç duyulan bir element olduğu bilinmektedir. Halihazırda bitki, mantar, maya ve alg kültürlerinde büyüme ortamına ilave edilen ve sürekli bulunması gereken tek yarı-metal B elementidir (Mengel ve Kirkby, 2001). Ancak yüksek yapılı bitkilerin B gereksinimleri ile ilgili şimdiye kadar çok sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen, özellikle bitkilerin B elementine olan gereksinimlerinin türden türe farklılık gösterdiği göz önünde bulundurulunca, değişik mikroalglerin büyüme ortamlarında bulunması gereken B konsantrasyonları ile ilgili yeterli bir çalışma henüz rapor edilmemiştir. Değişik mikroalg türlerinin B elementine olan gereksinimleri ile ilgili çalışmalar şimdiye kadar sadece bazı diatomlarda hücre duvarı oluşumu (Smyth ve Dugger, 1981) ve bazı siyanobakterilerde heterosist oluşumu (Bennett vd., 1999) üzerine

elde edilen bulgular ile sınırlıdır ve yetersizdir. Bor içeriğince zengin besiyerinde bulunan *Pinnularia gibba* mikroalginin erken büyüme safhalarında hızla lipid içeriğinin arttığı bildirilmesi (Ju, 2011) ve yapılan ön çalışmamız proje önerisinin önemini ortaya koymaktadır.

Atık suların çoğu bitki için toksik etki gösteren bordan arındırılmasında *Chlorella* türü ile olumlu bulgular elde edilmesi de alglerin bor biriktirme özelliklerini göz önüne sermektedir (Taştan, 2012). *Anabaena PCC 7119* ve *Anacystis nidulans* türlerinin yüksek bor konsantrasyonlarında büyüme, fikobiliprotein, klorofil, fotosentetik oksijen değişimi, nitrat alımı ve nitrat redüktazda azalmaya sahip olduğu ancak fotosentezin etkilenmediği ve karbonhidrat ile lipid içeriğini arttırdığı belirlenmiştir (Mateo, 1987).

Bu araştırma projesi için yaptığımız ön çalışmalarda farklı B konsantrasyonlarının mikroalg çalışmalarında model organizma olarak kullanılan ve tek hücreli bir mikroalg türü olan *Chlamydomonas reinhardtii*'nin büyümesi üzerine farklı etkileri olduğunu gözlemledik. Ön çalışmalarda kullandığımız ve mikroalglerin büyütülmesi için kullanılan Tris-Asetat-Fosfat (TAP besiyeri) büyütme ortamında optimum büyüme hızının, halihazırda kullanılan B konsantrasyonundan 10 kat daha fazla kullanıldığında değişmediğini, bununla birlikte mikroalglerin içerdikleri nötral lipid içeriklerinin kontrole kıyasla önemli oranda artırıldığını belirledik ve yaptığımız proje çalışmalarında da özellikle 4,6mM'a kadar artan konsantrasyonlarda Borik asit uygulamasının mikroalglerin lipid ya da karbohidrat içeriğini artırmakla birlikte büyümesini çok önemli düzeyde etkilemediğini belirledik. Böylece, bu proje kapsamında gerçekleştirdiğimiz çalışmalarda hedeflerimizden birisi ticari önemi yüksek olan farklı mikroalg türlerinin büyüme ortamlarında bulunabilecek en yüksek B konsantrasyonlarının belirlenmesi olmuştur.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Alternatif Enerji Kaynağı Olarak Biyodizel

Dünyadaki enerji ihtiyacının %70' i petrol bazlı kimyasallardan üretilen enerjiyle karşılanmaktadır (Gouveia ve Oliveira, 2009.) Yıllar geçtikçe yeraltındaki tabakalardan çıkartılan petrol miktarı azalmakta, petrol çıkarmanın maliyeti artmakta, bu da petrol fiyatlarında sürekli bir artışa neden olmaktadır. Bu artışlar, petrol konusunda dışa bağımlı olan ülkemiz ekonomisine çok büyük maliyetler getirmektedir. Maliyetin yanında, petrol stratejik bir üründür ve enerjide dışa bağımlılığı olmayan ülkeler politik olarak daha güçlü olabilmektedir.

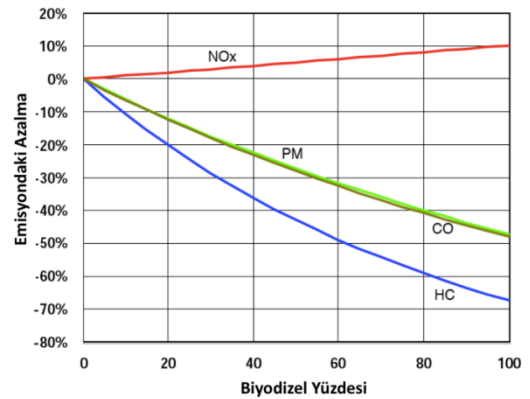
Ayrıca günümüzde bu kadar çok kullanılan petrol türevi yakıtların zararları da oldukça açıktır. Araçlardan çıkan yakıtın yanması sonucu oluşan gazlar; günümüzde hava kirliliğinin en önemli nedenlerinden biridir (Kim, 2004). Hava kirliliği sonucu özellikle büyük şehirlerde yaşayan insanlarda sağlık sorunları baş göstermektedir. Astım benzeri hastalıklar ve oto-immün hastalıklar hava kirliliğinden dolayı hızla artmaktadır (Sheppard, 1999).

Alternatif enerji türleri olarak mısır ve ayçiçeğinden biyodizel, rüzgâr türbinleri, güneş enerjisi üzerine çalışmalar uzun süredir devam etmektedir ve bu çalışmalar belirli bir noktaya gelmiştir. Özellikle mısır vb. bitkilerden ve su yosunlarından biyodizel üretimi önemlidir.

Biyodizel, dizel motorları için, bitkisel ve hayvansal yağlar gibi yenilenebilir kaynaklardan üretilen alternatif bir yakıttır. Avrupa Birliği'nin 2003/30/EC direktifi ile 2005 sonunda piyasaya arz edilen fosil yakıtlarına %2 oranında biyoyakıt eklenmesi zorunluluğu getirilmiştir. Biyodizel toksik olmayan, doğada kolay bozulabilir, çevreci bir yakıttır. Biyodizel üretiminde kullanılan temel yöntem transesterifikasyon reaksiyonudur.

Transesterifikasyon reaksiyonu, serbest yağ asit seviyesi, alkolün kimyasal yapısı, katalizör tipi, reaksiyon sıcaklığı ve reaksiyon süresi gibi parametrelerden etkilenmektedir.

Biyodizel petrolün yol açtığı gibi bir kirliliğe yol açmamaktadır. Suya bırakıldığında biyodizelin 28 günde %95'i, motorinin ise %40'ı bozunabilmektedir. Biyodizelin doğada bozunabilme özelliği dekstroza (şeker)



Şekil 1: Petrol yerine biyodizel kullanıldığında; havadaki kirli gazların emisyon değişimi (EPA, 2002)

benzemektedir. Şekil 1’de normal dizel yerine biyodizel kullanıldığında bazı maddelerde oluşacak emisyon değişikliği görülmektedir. Sera etkisine doğrudan etki etmeyen NO₂ salınımında hafif bir artış olmasına karşın; hidrokarbonlar (HC), karbonmonoksit (CO) ve egzozdan salınan partiküller (PM) gibi hava kirliliğindeki en önemli faktörlerde yüzde 70’lere varan azalma gözlenmektedir (EPA, 2002).

Geçtiğimiz yıllarda biyoetanol üretimine ağırlık verilmiştir. Fakat biyoteknolojideki ilerleme ve alglerin yağ potansiyelinin keşfi gibi gelişmeler; bu endüstride mikroalg kullanımını başlatmıştır. Mikroalglerden biyodizel elde edilmesinin bitkilerden biyoetanol üretimine kıyasla birçok avantajları bulunmaktadır. Biyoetanolden biyodizel elde edilmesinde kullanılan en yaygın bitkilerden biri, yağ oranının fazla olmasıyla bilinen hurma ağacıdır (Chisti, 2007). ABD’deki petrol ihtiyacının tamamını biyoetanolden elde edilen dizelle karşılamak istersek, yaklaşık 111 milyon hektar alana ekili hurma ağacı gerekmektedir. Bu durum diğer bir deyişle Birleşik Devletlerinin tarım alanlarının %61’ine bu ağacın ekilmesine ve bunların tümünün biyoetanol üretiminde kullanılmasına eşittir (Chisti, 2008).

Biyodizel, organik yağların baz ve alkolle karıştırılarak dizel yakıtı çevrilmesi sonucu elde edilen üründür. Rudolf Diesel yerfıstığı yağıyla dizel motoru 1900 yılında Paris’te düzenlenen Dünya Fuarında çalıştırmış, böylece sebze yağlarının yakıt olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Fakat petrolün daha revaçta olması sebebiyle uzun yıllar ilgi görmemiştir. Ancak 1970’lere gelindiğinde artan endüstriyel gereksinim ve yaşam standartlarının da artması, petrol sıkıntısını doğurmuş ve alternatif enerji kaynakları aranmaya başlanmıştır. Kyoto protokolüne göre 2010 yılında dizel yakıtlara %10 oranında biyodizel eklenme zorunluluğu programlanmış ve hâlihazırda Almanya, Fransa, kuzey Avrupa ülkeleri ve Amerika gibi gelişmiş ülkelerde bu zorunluluk uygulanmakta ve biyodizel üretiminin teşviki amacıyla çoğu gelişmiş ülkelerde biyodizele vergi muafiyeti getirilmiştir. Bu gün kanola, soya fasulyesi, mısır ve ayçiçeği gibi yağlı tohumlu bitkilerden biyodizel üretimi artık sanayileşmiştir. Ancak bu mahsuller ve bunlardan elde edilen ürünler mutfak tüketiminde başta gelen ürünlerdir ve biyodizel üretim amaçlı bu ürünlerin yetiştirilmesi ekilebilir tarım arazilerinin kullanımına ihtiyaç duyulması olumsuz ekonomik sonuçlar doğuracağından gelişmiş ülkeler artık üçüncü nesil biyodizel üretimi aracı olarak mikroalglerin kullanımı üzerine araştırmalarını yoğunlaştırmışlardır.

Mikroalglerin dünya mutfağında bilinen bir genel kullanımı yoktur ve yetiştirilmeleri için ekilebilir tarım arazilerinin kullanımına da gerek duyulmaz. Bununla birlikte mikroalglerin biyodizel üretiminde kullanılan nötral lipid içerikleri bu amaçla kullanılan diğer tüm biyolojik örneklerden daha yüksektir. Mikroalglerden biyodizel hammaddesi (nötral lipid = triağılglicerid) üretim etkinliğinin artırılması üzerine yapılmış çoğu çalışmada azot ve

fosfor gibi makrobesin element eksikliklerinin, mikroalglerin nötral lipid içeriğini önemli oranda artırdığı rapor edilmiştir (Zemke vd., 2010). Mavi-yeşil alglerin bor bileşimini bünyelerinde yeşil alglere göre daha çok absorbe ettikleri (Boyd, 1970; Gerloff, 1968) ve bu bileşiğin azot fiksasyon mekanizmasında etkili olduğu (Boyd, 1970) bildirilmiş olsa da bu konuda yapılan çalışmalar sınırlı sayıda tür ile yapılmıştır.

Biyolojik organizmalarda elementler arasındaki interaksiyon hücresel homeostazisin sağlanması için hayati ve sürekli bir öneme sahiptir. Daha önce yüksek yapılı bitkilerle yapılan çalışmalarda büyüme ortamına B ilave edildiğinde fosfor ve klor eksikliğinin olumsuz etkilerinin kısa süre içerisinde giderildiği (Robertson ve Loughman, 1974) ve bu elementlerin ortamdaki emiliminin hızlandırıldığı (Pollard vd., 1977) bildirilmiştir.

Doğada B, hidrojenden 10^9 kat ve karbon, nitrojen ve oksijen gibi elementlerden 10^6 kat daha az olan miktarı ile oldukça düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır (Kot, 2009). Ancak bu denli nadir düzeyde bulunmasına rağmen litosfer ve hidrosferde geniş bir dağılım göstermiştir. Örneğin kayalarda 5-10 mg/kg (Shorrocks, 1997), tatlı sularda 3-10 µg/L (Power ve Woods, 1997), deniz ve okyanuslarda 4-5 mg/L (Lemarchand vd., 2000) düzeyinde bulunmaktadır. Bitkisel organizmaların borik asit şeklinde aldıkları doğada elemental formda bulunmayan boron, kayalarda ve yoğun halde bazı borlu bileşikler şeklinde (silikon, sodyum, kalsiyum ve magnezyum ile birlikte oksijene bağlı bor bileşikleri) değişik formlarda bulunur. Doğada yaklaşık 200 farklı mineralin B içerdiği belirlenmiştir ancak bunlardan doğada en bol bulunan formları olan uleksit (hidratlı sodyum kalsiyum borat) ve kolemanit (hidratlı kalsiyum borat) kullanılabilir borlu bileşikler içerisinde ticari önemi en yüksek olanlarıdır. Bu proje kapsamında borik asite ek olarak ticari değeri yüksek olan bu iki farklı borlu bileşiğin farklı derişimlerinin mikroalgal büyüme ve biyodizel üretimindeki etkinliği de araştırılmıştır.

2.1.1. Mikroalglerden Biyodizel Üretimi

Işığın, suyun ve mineral besinlerin varlığı, diğer tüm fotosentetik organizmalar gibi mikroalglerin de büyümesi ve gelişmesi için üç temel gereksinimdir ve mikroalgler de diğer fotosentetik organizmalar gibi temel ergastik maddeler olarak türlere göre değişen oranlarda karbonhidrat, protein ve lipid bulundururlar. Algler tarafından üretilen doğal yağ (lipid) formunun, biyodizel üretimi için uygun yapıda oluşu, algleri biyodizel üretimde ayrıcalıklı bir yere koymuştur. Mikroalgler karasal bitkilere oranla çok hızlı büyürler. Genellikle ortalama 24 saatten az sürede sayılarını iki katına çıkarabilirler. Bazı algler de büyüme safhasının en üst noktasında her 3,5 saatte bir bölünürler. Mikroalglerdeki yağ miktarı genellikle %20-50 arasında değişirken bazılarında bu oran %80'e kadar çıkabilir. Algal biyokütle biyoyakıt ile ilgili sorunları çözmek için önemli bir rol oynamakla kalmayıp

ayrıca yeryüzünde CO₂ emisyon azalmasına katkıda bulunur. Bu nedenle, mikroalgler yakıt için küresel talebi karşılama yeteneğine sahip tek yenilenebilir biyodizel kaynağı gibi görünmektedir.

Biyodizel üretiminde kullanılan algler genellikle tek hücreli yeşil alglerdir. Bu tür algler fotosentetik planktonlardır ve aynı zamanda yüksek büyüme oranları ve yüksek populasyon yoğunluğuna sahiptir. Bu nedenle, algler biyodizel üretimi için önemli bir kaynaktır (Chisti, 2007). Mikroalglerden biyodizel üretimi konusunda üniversitelerde sürdürülen çalışmaların yanında özel sektörler de büyük miktarlarda yatırım yapmakta ve mikroalglerden verimli bir şekilde yakıt üretme teknolojisini geliştirmek için uğraşmaktadırlar. Örneğin 2010 yılının başında Donald Danforth Bitki Bilimleri Enstitüsü (The Donald Danforth Plant Science Center) alg bazlı biyodizel üretme çalışmaları için Birleşik Devletler Enerji Departmanının'dan 44 milyon ABD doları bütçe almıştır (<https://www.danforthcenter.org/>). Bunun yanında özel şirketlerde son yıllarda alglerden biyodizel geliştirmeye önem vermektedir. ABD merkezli Greenfuel Teknoloji (Greenfuel Technology Corporation) alglerden biyodizel üretimi geliştirilmesi üzerine merkezler açmak için 13,9 Milyon dolar bütçe ayırmıştır (<https://www.danforthcenter.org/>). Yine Amerika merkezli Aurora Biofuels, algleri manipüle ederek biyodizel üreten havuzlarına toplam 25 milyon dolar yatırım yapmıştır (AuroraBiofuels, 2010). Bilindiği gibi dünyanın en büyük benzin üreticilerinden biri olan Shell, HR Biopetroluem adlı bir şirketle 2007 de ortaklık anlaşması imzalayarak şirketin çalışmalarına sponsor olmuştur (HRBiopetroluem, 2007). Bu şirket, mikroalgleri genetik olarak seçen ve onları geniş hacimli havuzlarda yetiştirerek biyodizel üretimi gerçekleştiren bir kurumdur (www.hrbp.com). Bu konularda büyük yatırım yapan şirketlerden biri de Solazyme adlı kuruluştur. Şirket genetik olarak seçilmiş alglerden yalnızca biyodizel değil aynı zamanda sağlık ürünleri, cilt bakım ürünleri gibi yan ürünlerde üretmektedir (www.solazyme.com). Yukarıdaki şirket ve enstitülerin hepsinin ortak amacı çeşitli yöntemlerle mikroalglerden biyodizel üretimindeki verimi arttırmaktır.

Uygun çalışmalar yapıldıktan sonra mikroalglerden biyodizel üretiminin petrole alternatif olabileceği düşünülmektedir. ABD'de yapılan bir araştırmaya göre; ülkenin yıllık 0,53 milyar m³ petrol ihtiyacının tamamı alg bazlı biyodizelle karşılanmak istendiğinde, bu üretimi gerçekleştirmek için alglere yalnızca 5,4 milyon hektar alan gerekmektedir. Bu, ABD ekilebilir alanlarının yalnızca %3'ünü (biyoetanolle %61 gerekmede) kaplayan bir alandır (Chisti, 2008). Ayrıca alglerin yağları alınıp biyodizel üretimine geçildikten sonra; geriye kalan alg kalıntıları da biyoetanol üretimi ya da biyogübre yapımında kullanılabilir (Pulz ve Gross, 2004).

Bir tarım ülkesi olan Türkiye’de biyodizel üretimi için büyük bir potansiyel vardır. Biyodizel her türlü nebatî ve hayvansal yağdan, kullanılmış yağlardan üretilmektedir. Türkiye’de iklîme uygun çeşitli yağ bitkilerinden biyodizel üretilir. Ancak karasal ürünlerin dönemsî olarak büyümeleri ve sahip oldukları yağ miktarlarının kendi kuru ağırlıklarının yalnızca %5’i kadar olduğu, diğer taraftan mikroalglerdeki yağ miktarının genellikle %20-50 arasında bulunması, hızlı yaşam döngüleri ve yağ içeriklerinin artırılabilmesi durumlarını düşününce ülkemizde de algal biyodizel üretimine öncelikli yer verilmesinin daha faydalı olacağı öngörülmektedir. Ülkemizde biyodizel üretim çalışmaları bitkisel kaynaklı yağ elde edilmesiyle başlamış; günümüzde de bu yaklaşım pek değişmemiştir.

Mikroalglerden biyodizel üretimi birçok avantajlar içermesine rağmen şu aşamada ticarî olarak kullanımı yeterli seviyede değildir. Bunun en büyük sebebi ekonomik olarak mikroalglerden biyodizel üretiminin petrole rekabet edememesidir. Biz de, projemizde bor kullanarak alglerden biyodizel üretimini daha ekonomik hale getirmeye katkı sağlamayı planladık. Şu anki teknolojiyle alglerden 1 litre biyodizel üretilmesinin maliyeti ise 2,10 dolar civarındadır. Bu rakamın alglerin bölünme hızının artırılması, yağ içeriği yüksek algler elde edilmesi, algden alınan yağın biyodizele çevrilmesi reaksiyonlarının optimizasyonu gibi gelişmelerle 0,48 dolara kadar düşmesi beklenmektedir (Coyle, 2007; Chisti, 2007).

Proje kapsamında farklı özelliklerdeki mikroalg türleri üzerinde çalışarak bu mikroorganizmaların hücre içindeki triaçilgliserol ve nötral lipid miktarının yüksek bir seviyeye çekilmesi planlanmıştır. Bor miktarı ve bor bileşiği türünün mikroalg büyüme hızı ve biyodizel hammaddesi üretim verimine etkilerini büyüme ortamındaki bor yoğunluğu ve bor çeşitlerini değiştirerek denedik. Yapılan deneyler sonucunda biyodizel üretiminde kullanılan bor miktarını arttırarak, işlemin verimini arttıracak bir yaklaşım önerilmiştir. Bu yaklaşımın, şu anda biyodizel üretimi üzerine çalışan şirket ve araştırma merkezlerinin de uygulayabileceği bir yöntem olarak bor kullanımını arttırması düşünülmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kültür şartları ve deneysel yaklaşım

Bu araştırma projesinde kullanılan mikroalgler ve siyanobakteriler ülkemiz iç sularından izole edilmiş olup İstanbul Medeniyet Üniversitesi Mikroalg Kültür Koleksiyonunda muhafaza edilmektedir. Çalışmalarda kullanılmak üzere stok kültürlerden inoküle edilen türlerden *C.reinhardtii* (Sekans# KP259886), *C.vulgaris* C-27 (Sekans# KP259884.1) ve *N.oculata* (Sekans# KP259513.1) türleri 500 mL hacimli cam erlenlerde 200 mL kültür ortamında 120 rpm devir hızına ayarlanmış sıcaklık ayarlı çalkalamalı inkübatörde, 25 ± 2 °C sıcaklıkta $100 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ sürekli ışık şiddeti altında kültüre alınmıştır. *Synechocystis* sp. (Sekans# KP259263.1) türü, 1 L hacimli cam şişelerde 700 ml kültür ortamında hava kaldırmalı yöntemle, 28 ± 2 °C sıcaklıkta, *P.tricornutum* (Sekans# KP259588.1) ise yine 1 L hacimli cam şişelerde 700 ml kültür ortamında hava kaldırmalı yöntemle ve 23 ± 2 °C sıcaklıkta $100 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ sürekli ışık şiddeti altında kültüre alınmıştır.

Kullanılan mikroalglerden;

- *Chlamydomonas reinhardtii* türü, 7mM NH_4Cl , 0,4mM $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,34mM $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,61mM K_2HPO_4 , 0,39mM KH_2PO_4 , 6 μM $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,184mM H_3BO_3 , 25 μM $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 6 μM $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 6 μM $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 6 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 17,9 μM $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ içeren TAP besiyeri çözeltisinde (Harris, 1989),
- *Nannochloropsis oculata* ve *Phaeodactylum tricornutum* türleri, 0,882mM NaNO_3 , 0,0362 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,106mM $\text{Na}_2\text{SiO}_3\cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 0,0117mM $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,0117mM $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,04 μM $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,026 μM $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,0165 μM $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,042 μM CoCl_2 , 0,91 μM $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,3 μM Thiamine HCl, 2nM Biotin, 0,37nM Cyanocobalamin, içeren F/2 ortamında (Guillard, 1975),
- *Chlorella vulgaris* C-27 türü, 0,882mM NaNO_3 , 0,3mM $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,175mM K_2HPO_4 , 0,25mM $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,0312mM sitrik asit, 0,03mM Ferrik amonyum sitrat, 2,8 μM $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,189mM Na_2CO_3 , 1 μM H_3BO_3 , 0,158 μM $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1 μM $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 μM $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,01 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$,

0,3µM Thiamine HCl, 2nM Biotin, 0,37nM Cyanocobalamin içeren BG-11 ortamında (Rippka ve Herdman, 1993),

- *Synechocystis* sp. türleri de 308mM NaCl, 8,05mM KCl, 8,26mM Tris-Base, 20,3mM MgSO₄, 1,81mM CaCl₂, 11,8mM NaNO₃, 0,36mM KH₂PO₄, 0,014mM FeCl₃, 0,3µM Thiamine HCl, 0,554mM H₃BO₃, 0,23mM ZnCl₂, 0,021mM MoO₃, 0,14mM FeCl₃6H₂O, 0,22mM MnCl₂4H₂O, 0,12µM CuSO₄5H₂O, 0,5µM CoCl₂6H₂O ve 0,3µM Cyanocobalamin içeren A+ büyüme ortamında kültüre alınmıştır.

Türlerin kültüre alındığı TAP, F/2, BG-11 ve A+ büyüme ortamlarının H₃BO₃ içerikleri birbirinden oldukça farklıdır. TAP ortamında 0,184mM olan H₃BO₃ yoğunluğu BG-11 ortamında 1µM iken A+ ortamında 0,554mM olarak uygulanmakta ve F/2 ortamına da H₃BO₃ ilave edilmemektedir. Bu sebeple H₃BO₃'in büyüme üzerine etkilerini belirlemek için ilk çalışmalarda F/2 ortamına da, diğer ortamlara kıyasla düşük konsantrasyonda kullanıldığından dolayı, BG-11 ortamındaki konsantrasyonlar uygulanarak çalışma gerçekleştirilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Siyanobakteri ve mikroalglerin kültüre alındığı ortamlardaki H₃BO₃ konsantrasyonları

	TAP	Bg-11	F/2	A+
1xH ₃ BO ₃	0.184 mM	1 µM	1 µM	0.554 mM
10xH ₃ BO ₃	1.84 mM	10 µM	10 µM	5.54 mM
25xH ₃ B ₃	4.6 mM	25 µM	25 µM	13.85 mM
50xH ₃ BO ₃	9.2 mM	50 µM	50 µM	27.7 mM
100xH ₃ BO ₃	18.4 mM	100 µM	100 µM	55.4 mM
BG11 ve F/2 için 0.184mM	--	0.184 mM	0.184mM	--

Mikroalglerin büyümelerinde meydana gelen değişimin belirlenmesi için spektrofotometrik ölçümlerle (*P.tricornutum* ve *Synechocystis* sp. için 730 nm, *C.reinhardtii*, *C.vulgaris* ve *N. oculata*, türleri için 680 nm dalga boyları) elde edilen absorbans değerleri kaydedilmiştir. Araştırma bulgularında sunulduğu gibi yukarıdaki tabloda belirtilen konsantrasyonlar uygulandığında TAP ortamında kültüre alınan *C.reinhardtii* ve A+ ortamında kültüre alınan *Synechocystis* sp. siyanobakterisinin büyümelerinde artan H₃BO₃ konsantrasyonlarında baskılanma gözlemlenmiştir. Öte yandan literatürde 1 µM olarak uygulanan H₃BO₃ yoğunluğu 100 kat artırıldığında ve hatta TAP ortamında kullanılan 0,184 mM H₃BO₃ yoğunluğunda da *C.vulgaris*, *N.oculata* ve *P.tricornutum* mikroalglerinin 20 günlük

inkübasyon süresinde büyümelerinde bir farklılık gözlemlenmemiştir. Bu sebeple proje çalışmaları için kullanılan mikroalglerin (*C.reinhardtii*, *C.vulgaris*, *N.oculata* ve *P.tricornutum*) büyüme ortamlarında bulunan H_3BO_3 yoğunluğu 0,184 mM olarak belirlenmiş, artan konsantrasyonlarda borlu bileşik konsantrasyonları da bu değere göre hesaplanarak uygulanmıştır. Bu değerlendirmelere göre çalışma için kullanılan siyanobakteri ve mikroalgler uygulanan borlu bileşiklerin konsantrasyonları aşağıdaki tabloda belirtildiği şekli ile uygulanmıştır (Tablo 2).

Tablo 2. İlk büyüme analizi sonrasında çalışmada kullanılan mikroalgler (*C.reinhardtii*, *N.oculata*, *C.vulgaris* ve *P.tricornutum*) ile *Synechocystis* sp. siyanobakterisine uygulanan borlu bileşik konsantrasyonları.

Borlu Bileşik yoğunlukları	Mikroalgler uygulanan	<i>Synechocystis</i> sp. uygulanan
1x H_3BO_3	0.184 mM	0.554 mM
10x H_3BO_3	1.84 mM	5.54 mM
25x H_3BO_3	4.6 mM	13.85 mM
50x H_3BO_3	9.2 mM	27.7 mM
25x $CaB_3O_4(OH)_3H_2O$ (Kolemanit)	1.54mM	4.6 mM
50x $CaB_3O_4(OH)_3H_2O$ (Kolemanit)	3.08 mM	9.2 mM
25x $NaCaB_5O_9 \cdot 8H_2O$ (Uleksit)	0.93 mM	2.8 mM
50x $NaCaB_5O_9 \cdot 8H_2O$ (Uleksit)	1.85 mM	5.55 mM

3.2. Toplam nötral lipit tayini

Mikroalglerde toplam nötral lipit içeriğinin miktarsal olarak belirlenmesi için 730 nm veya 680 nm dalga boyunda absorbansı 0,2 olarak hacimlenmiş bir miktar mikroalg çözeltisi alınarak son konsantrasyonu 0,26 μM olacak şekilde Nil kırmızısı (9-diethylamino-5H-benzophenoxazine-5-one) (Invitrogen) boyası ile 15 dk boyunca karanlıkta inkübe edildikten sonra, 5000rpm'de 3dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve örneklerin her biri TAP ortamıyla yıkandı ve vortekslendi daha sonra Nil kırmızısı ile boyanan örneklerin her birinden 275 μl , 96 kuyucuklu mikrotiplerdeki kuyucuklara belirli bir sıraya göre pipetlenmiştir. Her gruba ait örneklerin ölçümleri 3 tekrarlı ve 2 paralelde gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 490 nm eksitasyon ve 570 nm emisyon değerleri kullanılarak floresans özelliği bulunan eliza okuyucusu sayesinde absorbans değerlerine bakılarak lipit içeriklerinde meydana gelen değişiklikler tayin edilmiştir (Fedorov vd., 2005).

3.3. Toplam lipit tayini

Toplam lipit miktarları Bligh ve Dyer (1959)'a göre tespit edilmiştir. 500 mg mikroalg örneği 10 ml metanol içerisinde vortekslenerek, 5 ml kloroform ve 1 ml ddH₂O ilave edilip 1 dakika boyunca vortekslendi. Daha sonra santrifüj edildi (5000 rpm, 15dk) ve üst kısımda bulunan metanol/su tabakası uzaklaştırıldı. Alt kısımdaki metanol/kloroform tabakası ise temiz bir tüpe aktarıldı. Elde edilen lipit sıvısı Whatmann no 1 filtre kağıdı kullanılarak filtrelendi ve rotary evaporator kullanılarak (50°C sıcaklık ve düşük basınç altında) metanol ve kloroformun buharlaştırılması sağlandı. Tüpler tekrar tartılarak lipit miktarı ağırlıksal olarak hesaplandı. Örnekte bulunan lipit miktarının yüzde olarak hesaplanmasında ise aşağıdaki formül kullanıldı

$$\text{Lipit yüzdesi} = (\text{ekstrakt edilen lipit miktarı (gr)} / \text{mikroalg örnek ağırlığı (g)}) \times 100$$

3.4. Sitoplazmik Lipit Cisimlerinin Floresans Görüntülenmesi

Mikroalglerde oluşan sitoplazmik lipit cisimlerinin görüntülenmesi amacıyla mikroalgler Elsey vd. (2007) tarafından tarif edildiği şekilde Nil kırmızısı ile boyanmıştır. Buna göre, 680nm dalga boyunda yapılan ölçüme göre alınarak absorbans değerleri 0,2-0,3 aralığında seyreltilmiş olan 1 ml hacimde mikroalg örneklerinin içerisine 5µg/ml Nil kırmızısı (Invitrogen) ilave edilmiş ve mutlak karanlıkta 15dk boyunca oda şartlarında hafif şekilde çalkalanmak suretiyle karıştırılmıştır. İnkübasyon sonrasında örneklerin floresans görüntüleri TXRED (560nm ex-630nm em) filtresi ile floresans mikroskop sistemi (Zeiss AXIO Imager M2) kullanılarak elde edilmiştir.

3.5. FT-IR analizi ile Triaçilgliserollerin miktarsal tayini

Mikroalglerin ürettikleri triaçilgliserollerin (TAG) miktarsal tayinleri Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FT-IR) analizi ile nisbi olarak belirlenmiştir. Ölçüm için 50mg liyofilize edilmiş mikroalg örnekleri pens yardımıyla doğrudan ATR modülü ile desteklenmiş FT-IR (PerkinElmer-L160000A, USA) cihazının örnek modülüne yerleştirilmiştir. Numune alıcısının kızılötesi spektrumu, 4000-400 cm⁻¹ dalga boyu aralığında 128 tarama ile kaydedilmiştir. FTIR analizinde çevresel koşullardan fazla etkilenmeyen absorpsiyon bandı olan Amid 1 (1652 cm⁻¹) değeri doğrulama değeri olarak seçilmiştir. Böylece, trigliseritlerin ester grubunun (C=O) titreşimi (1744 cm⁻¹) ile verdiği absorpsiyon değerinin Amid 1 değerlerine oranlanarak mikroalglerdeki triaçilgliserol miktarında meydana gelen değişiklikler tespit edilmiştir (Mairet vd., 2011). Daha sonra farklı konsantrasyonlarda Borik asit, Uleksit ve Kolemanit uygulanan mikroalglerden elde edilen TAG/Amid 1 oranları, kontrol grubu ile elde edilen TAG/Amid 1 oranına bölünerek mikroalglerin TAG içeriklerinde meydana gelen nisbi değişim “-n katı değişim” olarak grafiklendirilmiştir.

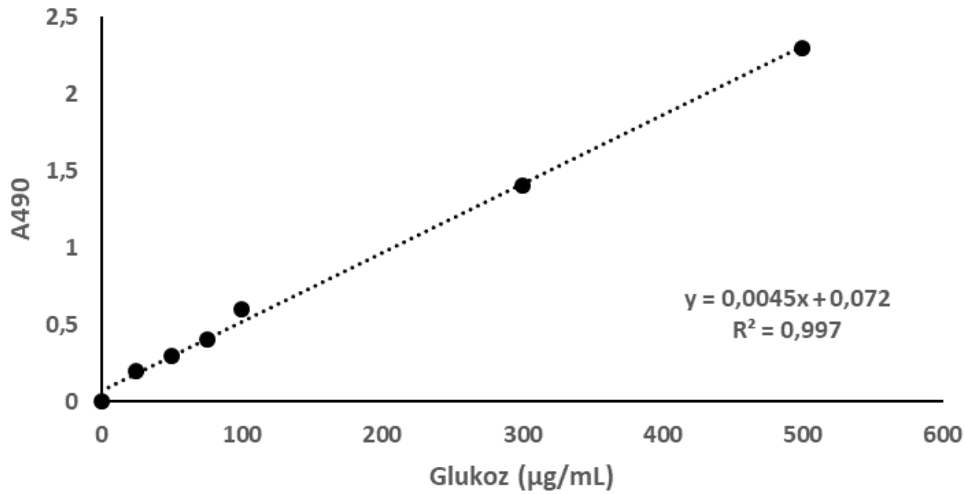
3.6. Mikroalgal lipidlerin transesterifikasyonu ve yağ asidi metil ester (YAME) analizi

Siyanobakteri ve mikroalglerin yağ asidi profillerinde meydana gelen değişimin belirlenmesi amacıyla yağ asitlerinin ekstraksiyonu, metilleştirilmesi ve analizi için Xu vd. (2010), tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır. Bu amaçla, liyofilize edilmiş 100mg mikroalg ya da siyanobakteri biyomas örnekleri kullanılmıştır.

- a. İçerisinde 100mg biyomas bulunan vida kapaklı tüplere 300 µl ekstraksiyon solüsyonu (metanol içerisinde hazırlanmış %2'lik H_2SO_4 çözeltisi) ilave edilmiştir.
- b. İnternal standart olarak, kör numune dahil her tüpe 30 µg nonadecanoic acid ilave edilmiştir.
- c. Örnekler 2 saat boyunca 80 °C sıcaklıkta termomikser yardımı ile 750 rpm devir hızında sürekli çalkalanarak hücrelerin parçalanması ve lipidlerin açığa çıkması sağlanmıştır
- d. İnkübasyon sonrasında örnekler 10 dk oda şartlarında bekletilmiş ve sıcaklığın düşmesi sağlanmıştır
- e. Tüplerin içerisine 300 µl %0,9 konsantrasyonda NaCl ve 300 µl hekzan ilave edilmiştir.
- f. Böylece metanolde bulunan lipidlerin hekzan fazına geçmesi için örnekler 30 sn boyunca vortekslenmiş ve 10 dk boyunca da nutating mikser üzerinde çalkalanmıştır
- g. Daha sonra örnekler 3 dk boyunca 20 °C sıcaklıkta 3000 g devir hızında santrifüjlenmiştir
- h. Son olarak üstteki hekzan tabakasından 150 µl örnek alınarak GC-MS tüplerine aktarılmıştır
- i. Tüplere aktarılan örnekler analiz için Agilent marka GC-MS cihazına yerleştirilmiştir. Ölçüm için cihaza 130°C başlangıç sıcaklık, 240°C ye kadar her 5°C de 5 dk beklenmesi talimatı işlenmiştir.
- j. Standart olarak 37 komponentli YAME (Supelco FAME-37) karışımı kullanılmıştır.
- k. Ölçüm sonucu elde edilen pikler analiz edilmiş, alan hesaplaması yapılarak belirlenen metil esterlerin yüzdeleri oransal olarak sunulmuştur.

3.7. Toplam nişasta tayini

Sıvı kültürden toplanarak santrifüjlenmiş ve 80°C de 48 saat kurutulmuş olan mikroalg örneklerinden 50 mg tartılarak alınmış nişasta ekstraksiyonu için örnekler üzerine 10 kat hacimde etanol ilave edilerek 90°C'ye ayarlanmış su banyosu içerisinde, inkübasyon süreleri değişmekle birlikte örnekler tümüyle homojenize olup, mikroalg/etanol çözeltisi tümüyle renksiz bir hal alıncaya kadar inkübe edilmiştir (süre örneğe göre 10 dk ile 70 dk arasında değişmiştir). İnkübasyondan sonra eşit hacimde %35'lik perklorik asit ilave edilmiş, 5 dk vortekslendikten sonra 2 ml H₂SO₄ ilave edilerek 3 dk daha karıştırılan örnekler süzülerek 490 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen değerler glukoz standartları kullanılarak % nişasta % kuru ağırlık olarak sunulmuştur (Şekil 2) (Rose vd., 1991).

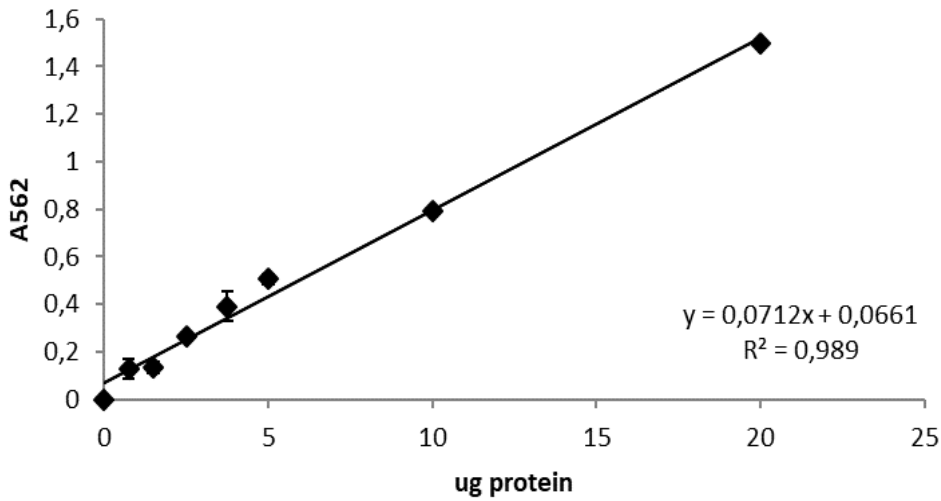


Şekil 2. Toplam karbohidrat tayini için kullanılmış olan standart grafik.

3.8. Toplam protein tayini

Bu amaçla liyofilize edilmiş mikroalg örnekleri liziz tamponu (50 mM Tris-HCl pH 8,0, %2 SDS, 10 mM EDTA, ve protease inhibitor mix) içerisinde yeniden süspanse edilmiş, 1 dk boyunca sonikasyona maruz bırakılmış (%60 güç 7W/pin) ve 4°C sıcaklıkta 13000rpm devir hızında santrifüjlenmiştir. Örneklerdeki protein miktarı Bichinoninic asit (BCA) metodu kullanılarak belirlenmiştir (Smith vd., 1985). Çalışma solüsyonu karışımı olarak 1 kat %4 bakır sülfat / 50 kat Bicinchoninic asit solüsyonu (Sigma) oda sıcaklığında karanlıkta saklandı. Standart için 0,5 mg/ml Bovin Serum Albumin çözeltisinden kuyucuklara sırasıyla -0, -1,5, -3, -5, -7,5 ve -10 ul ilave edilerek son hacim saf suyla 10

ul'ye tamamlandı. Mikroalg ekstraktlarından 5µl alınarak 96 kuyucuklu mikropalakaya aktarıldı ve son hacim 10 µl'ye tamamlandı. Hazırlanmış olan çalışma solüsyonundan 190 µl alınarak örnekler ve standartların üzerine ilave edildi. İçerisinde standart ve örnekler bulunan 96 kuyucuklu mikropalaka 60°C de 30 dk boyunca inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda örnekler 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiş ve meydana gelen renk değişimi 562 nm de okunmuştur. Elde edilen değerler, Bovin serum albumin ile hazırlanmış olan standart grafikten yola çıkılarak (Şekil 3) mikroalg örneklerinin protein değerleri mg protein/gr örnek olacak şekilde hesaplandı.



Şekil 3. Protein tayini için hazırlanmış standart grafik

3.9. Toplam Klorofil ve Toplam Karotenoidlerin Spektrofotometrik Tayini

Mikroalglerin içerdikleri toplam klorofil ve karotenoid miktarı Jeffrey ve Humphrey (1975)'den modifiye edilerek spektrofotometrik metodla belirlenmiştir. Tayin için 100mg mikroalg örneği üzerine 500 µl %90'lık aseton ilave edilerek 15 dk boyunca karıştırılmış ve 10000 xg devir hızında 5 dk boyunca 4°C'de santrifüj edilmiş, 250µl süpernatant 96 kuyucuklu plağa yüklenmiştir. Süpernatant absorbansları sırasıyla 750, 664, 647, 470 ve 630 nm'dalgı boylarında %90'lık aseton körüne karşı okunmuştur. Toplam klorofil ve karotenoid miktarları Jeffrey ve Humphrey (1975) tarafından bildirilen denklemler kullanılarak hesaplanmış olup toplam klorofil sonuçları klorofil a ve b'nin toplamı olarak sunulmuştur.

$$Chla = (11,85(E_{664} - E_{750}) - 1,54(E_{647} - E_{750}) - 0,08(E_{630} - E_{750})) \times \text{dilüsyon oranı}$$

$$Chlb = (-5,43(E_{664} - E_{750}) + 21,03(E_{647} - E_{750}) - 2,66(E_{630} - E_{750})) \times \text{dilüsyon oranı}$$

$$\text{Toplam karotenoid} = (1000E_{470} - (1,86 \times \text{Chla}) - (74,08 \times \text{Chlb})) / 206$$

Synechocystis sp. siyanobakterisinin içerdiği klorofil-a yoğunluğu Zavřel vd., (2015)'e göre belirlenmiştir. Bu amaçla yaklaşık 50mg siyanobakteri örneği 1,5mL metanol (%100, önceden 4°C'de soğutulmuş) içerisinde çözölmüş, 1dk boyunca vortekslenmiş ve 20dk boyunca karanlık ortamda oda şartlarında rotator üzerine yerleştirilerek alt-üst edilmiştir. Daha sonra örnekler 10000cg de 5dk boyunca santrifüjlenmiş ve süpernatantın absorbansı 664 ve 720nm dalga boylarında okunarak değerler kaydedilmiştir. Siyanobakterideki Klorofil-a yoğunluğu aşağıdaki formöl kullanılarak belirlenmiştir.

$$\text{Chla [mg/L]} = 12,9447 (E_{665} - E_{720})$$

3.10. İstatistik hesaplamalar

Grafiklerde belirtilen değerler en az 3 farklı költürden iki farklı zamanda alınmış verilerin ortalamasıdır (n≥6). Uygulamalı gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar Student ttest (2;2) analizi ile belirlenmiştir (P<0,05).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Türlerle uygulanacak Borik asit yoğunluğunun belirlenmesi

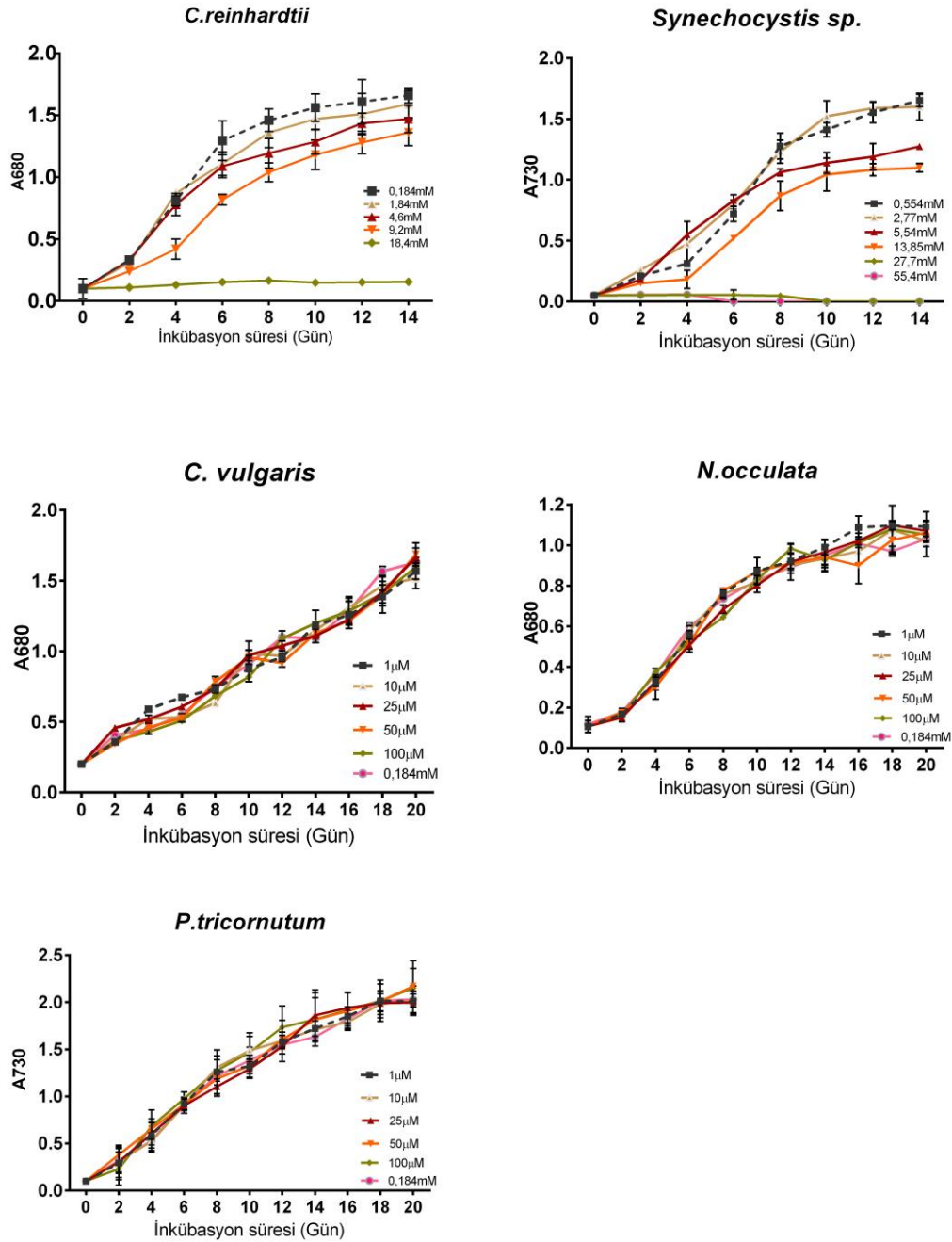
Gereç ve yöntem kısmında tablo halinde gösterildiği gibi bu araştırma projesine konu olan siyanobakteri ve mikroalglerin büyüme ortamlarında normal olarak kullanılan Borik asit içerikleri oldukça farklıdır. *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalginin kültüre alındığı TAP ortamında 0,184 mM olarak kullanılan H_3BO_3 içeriği *Chlorella vulgaris* mikroalginin kültüre alındığı BG-11 büyüme ortamında 1 μM olarak uygulanmakta, denizel türler olan *Phaeodactylum tricornutum* ve *Nannochloropsis oculata* mikroalglerinin kültüre alındığı F2 ortamında H_3BO_3 ilave edilmemekte ve nihayet *Synechocystis* sp. siyanobakterisinin kültüre alındığı A+ büyüme ortamında da 0,554 mM olarak (TAP ortamında kullanılan yoğunluğun 3 katı) uygulanmaktadır. Bu organizmaların şube ve sınıf düzeyinde birbirinden farklı oldukları büyüme ortamlarının kimyasal kompozisyonlarının da farklı olduğu değerlendirilerek çalışılan organizmaların kendi büyüme ortamına göre n-katı şeklinde borlu bileşiklerin konsantrasyonları uygulanmıştır. Öte yandan denizel türler olan *N.oculata* ve *P.tricornutum* mikroalglerinin kültüre alındığı F2 büyüme ortamında H_3BO_3 kullanılmadığı için bu mikroalglerle de nispeten düşük konsantrasyonda uygulandığı için BG-11 ortamında kullanılan 1 μM H_3BO_3 yoğunluğu uygulanmış ve diğer hesaplamalar da bu değerler üzerinden yapılmıştır.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan türlerin sistematik farklılıkları, büyüme ortamları ve ilk büyüme ölçümleri için büyüme ortamlarında kullanılan H_3BO_3 konsantrasyonları.

	<i>C.reinhardtii</i>	<i>C.vulgaris</i>	<i>N.oculata</i>	<i>P.tricornutum</i>	<i>Synechocystis</i> sp.
Şube	Chlorophyta	Chlorophyta	Chlorophyta	Bacillariophyta	Cyanobacteria
Sınıf	Chlorophyceae	Trebouxiophyceae	Eustigmatophyceae	Phaeodactylaceae	Cyanophyceae
Büyütme ortamı	TAP	BG-11	F2	F2	A+
H_3BO_3 yoğunluğu	0,184 mM	1 μM	YOK	YOK	0,554 mM
İlk büyüme çalışmaları için uygulanan H_3BO_3 yoğunlukları					
	TAP	Bg-11	F/2	A+	
1x H_3BO_3	0,184 mM	1 μM	1 μM	0,554 mM	
10x H_3BO_3	1,84 mM	10 μM	10 μM	5,54 mM	
25x H_3B_3	4,6 mM	25 μM	25 μM	13,85 mM	
50x H_3BO_3	9,2 mM	50 μM	50 μM	27,7 mM	
100x H_3BO_3	18,4 mM	100 μM	100 μM	55,4 mM	
BG11 ve F/2 için 0,184mM	--	0,184 mM	0,184mM	--	

Mikroalglerde Bor elementinin biyodizel hammaddesi olarak kullanılan triaçilgliserol üretimi üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bu çalışmada mikroalglerin büyümeleri üzerine baskı yapan Bor yoğunluğunun belirlenmesi öncelik arz etmektedir.

Çünkü mikroalglerin lipid içerikleri ve böylece mikroalgal lipidlerin büyük kısmını oluşturan triaçilgliserol içerikleri stres koşullarında artmaktadır. Stresin en iyi gözlemlenebildiği durum da büyümedeki baskılanmadır. Bu sebeple çalışmada öncelikli olarak yukarıdaki tabloda (Tablo 3) belirlenen H_3BO_3 konsantrasyonları uygulanmış mikroalglerin büyümelerindeki değişim kaydedilmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. Mikroalglerin kültüre alındıkları ortamlardaki Bor elementi yoğunluğuna göre artan H_3BO_3 konsantrasyonlarının mikroalglerin büyümeleri üzerine etkileri.

4.2. Mikroalglerin büyümesi üzerine borlu bileşiklerin etkileri

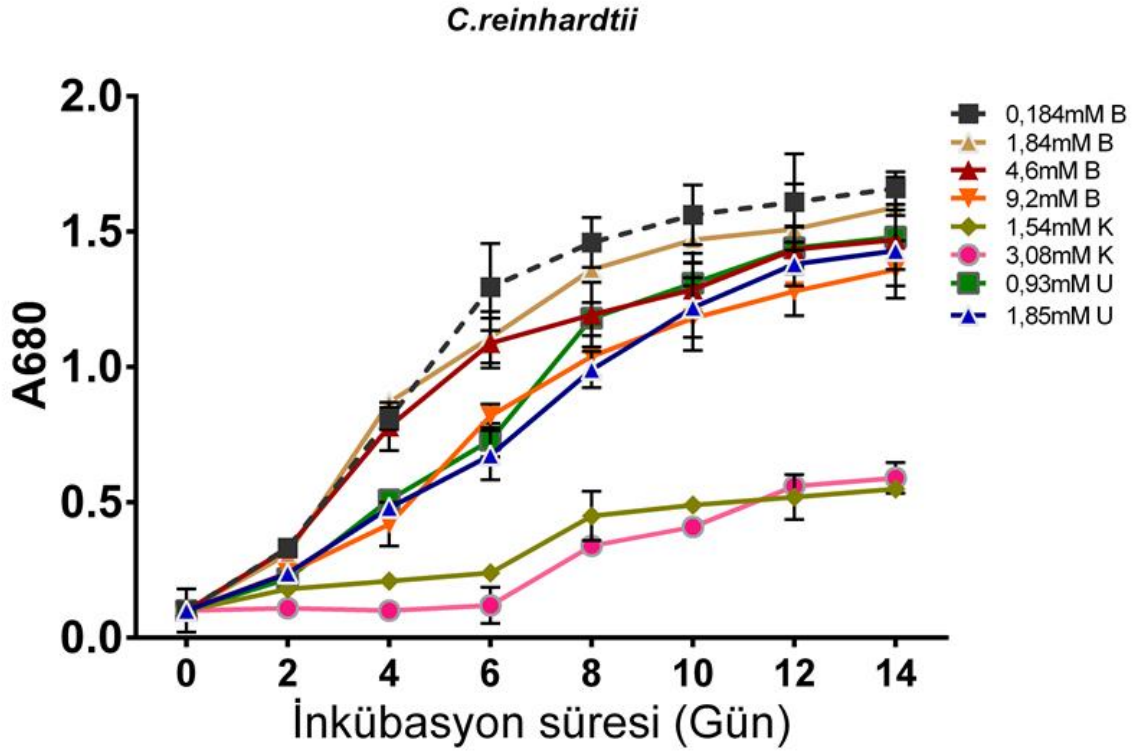
Chlamydomonas reinhardtii mikroalginin normal olarak büyüme ortamına uygulanan 0,184mM H_3BO_3 yoğunluğu 50 kata kadar artırıldığında büyümede baskılanma görülmüş, 100x konsantrasyonda H_3BO_3 uygulanan mikroalglerde büyüme gözlenmemiştir. Yine normal olarak A+ büyüme ortamına 0,554mM H_3BO_3 uygulanan *Synechocystis* sp. siyanobakterisinin büyümesi ortamdaki H_3BO_3 yoğunluğu 25 kata kadar artırıldığında büyümede dereceli olarak baskılanma kaydedilmiş, ancak 50x ve 100x konsantrasyonda H_3BO_3 uygulanan siyanobakterilerde büyüme baskılanmış ve hatta durmuştur. Öte yandan normal olarak büyüme ortamına uygulanan 1 μ M H_3BO_3 konsantrasyonu 100 kat kadar artırılmış olsa da *C.vulgaris*, *P.tricornutum*, ve *N.oculata* mikroalglerinin büyümelerinde kayda değer farklılıklar gözlemlenmemiştir (Şekil 4). Zira 0,184mM konsantrasyonda H_3BO_3 uygulandığında dahi *C.vulgaris*, *P.tricornutum*, ve *N.oculata* mikroalglerinin büyümelerinde önemli bir değişim kaydedilmemiştir. Bu sebeple *Synechocystis* sp. siyanobakterisi için A+ büyüme ortamında kullanılan H_3BO_3 konsantrasyonlarının dışında diğer mikroalgler için TAP ortamında kullanılmış olan 0,184mM H_3BO_3 yoğunluğu referans H_3BO_3 konsantrasyonu olarak kullanılmış, Uleksit ve kolemanit bileşiklerinin uygulama konsantrasyonları da 0,184mM H_3BO_3 'de bulunan Bor elementi yoğunluğuna göre hesaplanarak uygulanmıştır. Bu durumda yapılan hesaplama sonucunda 0,184mM H_3BO_3 kullanıldığında çözeltideki Bor element miktarı 2mg/L olarak hesaplanmış, Kolemanit ($CaB_3O_4(OH)_3H_2O$) ve Uleksit ($NaCaB_5O_9 \cdot 8H_2O$) konsantrasyonları da içerdikleri Bor element miktarına göre belirlenmiş ve bileşikteki Bor elementi yoğunluğuna göre 25x ve 50x konsantrasyonda uygulanmıştır. Böylece proje çalışması için oluşturulan deney gruplarını gösteren tablo aşağıda sunulmuştur.

Tablo 4. Yapılan büyüme analizleri dikkate alınarak çalışmanın ilerleyen evresinde mikroalglerin büyüme ortamlarında kullanılan borlu bileşiklerin konsantrasyonları

Borlu Bileşik yoğunlukları	Mikroalgler uygulanan	<i>Synechocystis</i> sp. uygulanan
1x H_3BO_3	0,184 mM	0,554 mM
10x H_3BO_3	1,84 mM	5,54 mM
25x H_3BO_3	4,6 mM	13,85 mM
50x H_3BO_3	9,2 mM	27,7 mM
25x $CaB_3O_4(OH)_3H_2O$ (Kolemanit)	1,54mM	4,6 mM
50x $CaB_3O_4(OH)_3H_2O$ (Kolemanit)	3,08 mM	9,2 mM
25x $NaCaB_5O_9 \cdot 8H_2O$ (Uleksit)	0,93 mM	2,8 mM
50x $NaCaB_5O_9 \cdot 8H_2O$ (Uleksit)	1,85 mM	5,55 mM

Çalışmada kullanılan mikroalglerin ikiye katlanma süreleri değişiklik sergilediğinden dolayı kontrol ortamında kültüre alınan mikroalg grubu takip edilerek büyümenin başlangıç-logaritmik büyüme ve lineer büyüme evrelerinin tümüyle gözlemlendiği inkübasyon süreleri dikkate alınarak deney süreleri de türe özgü olarak değerlendirilmiştir.

Chlamydomonas reinhardtii mikroalginin büyümesi üzerine artan konsantrasyonlarda Borik asit, Kolemanit ve Uleksit uygulamalarının etkileri Şekil 5’de sunulmuştur. Borik asit uygulaması normal yoğunluğun 25 katına kadar büyümede önemli bir değişime sebep olmadığı halde 50 katı (9,2mM) H_3BO_3 uygulanan mikroalglerin büyümeleri ilk günlerden itibaren önemli oranda baskılanmış, inkübasyonun ilk 4 gününde yaklaşık %48 oranında en yüksek düzeyde kaydedilen baskılanma 14 günlük inkübasyonun sonunda %18 olarak kaydedilmiştir. Yine 1,54mM ve 3,08mM konsantrasyonda Kolemanit uygulaması *C.reinhardtii*’nin büyümesini ilk günlerden itibaren çok önemli düzeyde baskılamış, inkübasyonun 2. gününde sırasıyla %46 ve %67 olarak gözlemlenen büyümedeki baskılanma inkübasyonun 6. gününde sırasıyla %81,5 ve %90,7 olarak en yüksek düzeyde kaydedilmiş, 14 günlük inkübasyonun son gününde büyümedeki baskılanma sırasıyla %66,8 ve %64,5 olarak ölçülmüştür. Öte yandan 0,93mM ve 1,85mM konsantrasyonda Uleksit uygulaması inkübasyonun ilk günlerinde büyümede önemli düzeylerde baskılanmaya sebep olsa da zamanla bu baskı azalmıştır. Sırasıyla 0,93mM ve 1,85mM konsantrasyonda Uleksit uygulanan *C.reinhardtii*’nin büyümesi inkübasyonun 6. gününde %43,6 ve %48 düzeylerinde baskılanmış iken takip eden günlerde bu baskılama azalmış ve 8.günde %19,2 ve %32,2 düzeylerinde görülen baskılama inkübasyonun 12.gününden itibaren istatistiksel olarak önemsiz düzeylere inmiştir. Dolayısıyla Uleksit uygulaması bu mikroalgin logaritmik büyüme evresini uzatmakla birlikte büyüme de görülen baskılanma nispeten düşük belirlenmiş, oysa kolemanit uygulaması büyümeyi ilk günlerden itibaren önemli oranda baskılamıştır.

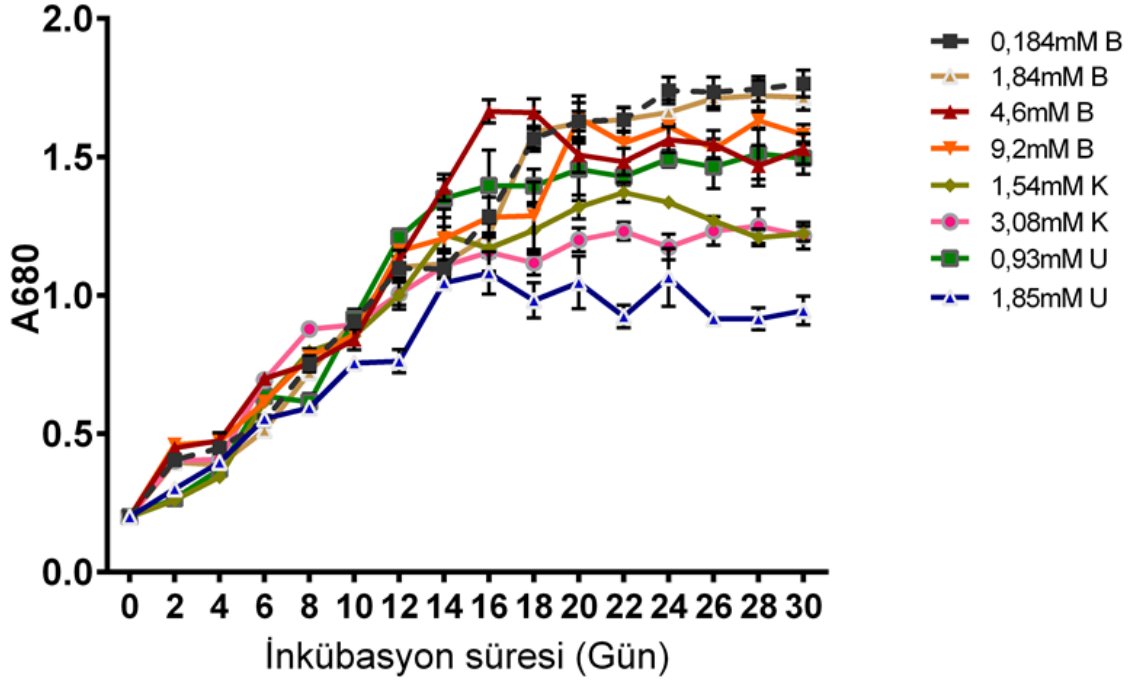


Şekil 5. *C.reinhardtii* mikroalginin büyümesi üzerine artan konsantrasyonlarda Borik asit (B), Kolemanit (K) ve Uleksit (U) etkileri.

Chlorella vulgaris mikroalginin büyümesi üzerine artan konsantrasyonlarda borlu bileşiklerin etkilerini değerlendirmek amacıyla mikroalgler 30 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol ortamında kültüre alınan mikroalgler inkübasyonun 18. gününden itibaren lineer büyüme evresine girmişlerdir. Bu mikroalgde 30 günlük inkübasyon süresinde H_3BO_3 uygulaması dikkate değer bir değişikliğe sebep olmamıştır. Diğer taraftan artan konsantrasyonlarda kolemanit ve uleksit uygulanan mikroalglerin büyümelerini inkübasyonun 18.gününden itibaren önemli oranda baskılamıştır. Öte yandan 50x konsantrasyonda Uleksit (1,85mM) ve Kolemanit (3,08mM) uygulanan mikroalglerin ekspanensiyal büyüme evreleri kısalmış, bu gruplar inkübasyonun 14.gününden itibaren lineer büyüme evresine girmişlerdir. Sırasıyla 1,54mM ve 3,08mM konsantrasyonda Kolemanit uygulanan *C.vulgaris* mikroalginin büyümesi inkübasyonun 18. gününde %21,1 ve %28,6 oranında baskılanmışken 30 günlük inkübasyon süresinin sonunda büyümedeki baskılanma sırasıyla %30,7 ve %31,2 düzeylerinde kaydedilmiştir. Diğer taraftan Uleksit uygulanan *C.vulgaris*'in büyümesi artan Uleksit yoğunluğuna da net cevaplar sergilemiştir. Büyüme ortamına 0,93mM konsantrasyonda Uleksit uygulandığında büyümedeki baskılanma 22.günden itibaren %12-15 düzeylerinde iken 1,85mM konsantrasyonda Uleksit uygulaması büyümenin 16. gününde yaklaşık %16

oranında baskılanmış ve bu noktadan sonra artan büyümedeki baskılanma 30 günlük inkübasyon süresinin sonunda yaklaşık %46,5 düzeylerinde belirlenmiştir (Şekil 6).

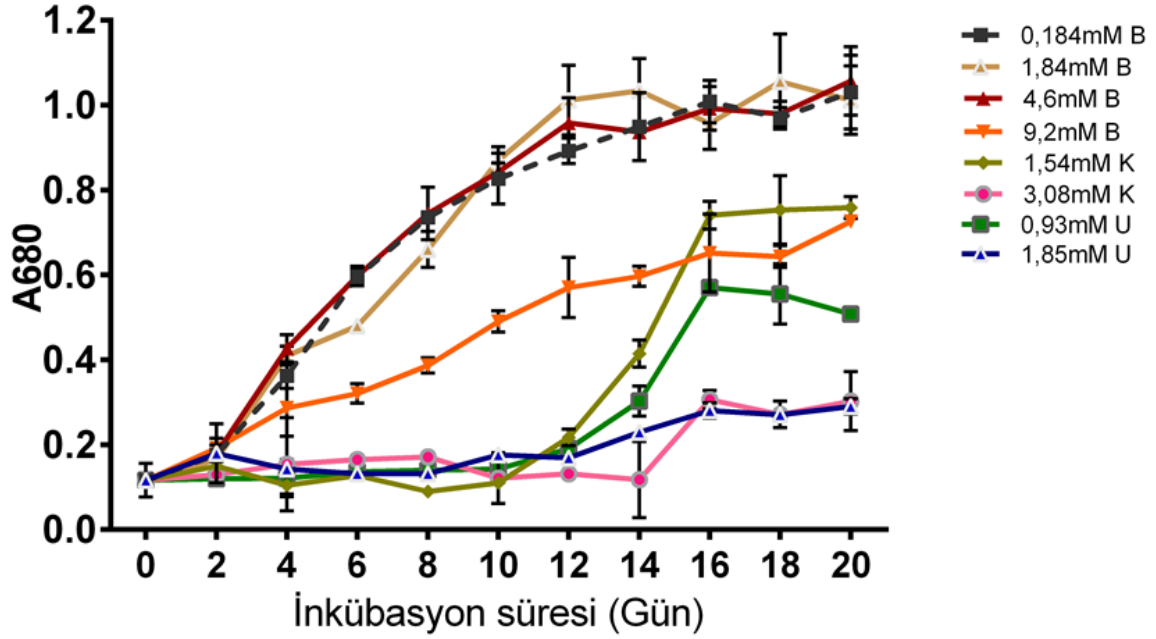
C. vulgaris



Şekil 6. *C. vulgaris*'in büyümesi üzerine artan konsantrasyonlarda Borik asit (B), Kolemanit (K) ve Uleksit (U) etkileri.

Nannochloropsis oculata mikroalginin büyümesi üzerine borlu bileşiklerin etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla mikroalgler 20 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu mikroalgin büyümesi üzerine 4,6mM'a kadar H_3BO_3 uygulaması önemli bir farklılık sergilememiştir. Öte yandan 9,2mM konsantrasyonda H_3BO_3 uygulandığında büyümenin ikinci gününden itibaren büyümede baskılanma gözlemlenmiş büyümenin 4.gününde %46,1 ile en yüksek düzeyde gözlemlenen baskılanma tüm inkübasyon evresi süresince kaydedilmiş ve inkübasyonun son gününde büyüme yaklaşık %29,5 oranında baskılanmıştır. Öte yandan bu mikroalge Uleksit ve Kolemanit uygulamaları ilk günden itibaren büyümeyi çok önemli düzeyde baskılamış inkübasyonun 10. gününe kadar kayda değer bir büyüme belirlenmemiştir. Bu noktadan sonra 1,54mM Kolemanit ve 0,93mM Uleksit uygulamasına cevapta inkübasyonun 16. Gününe kadar hızlı bir büyüme gözlemlenmiş ve daha sonra mikroalgler lineer büyüme evresine girmiştir. Son olarak 3,08mM Kolemanit ve 1,85mM Uleksit uygulanan mikroalglerin büyümesi 20 günlük inkübasyonun sonuna kadar baskılanmıştır (Şekil 7).

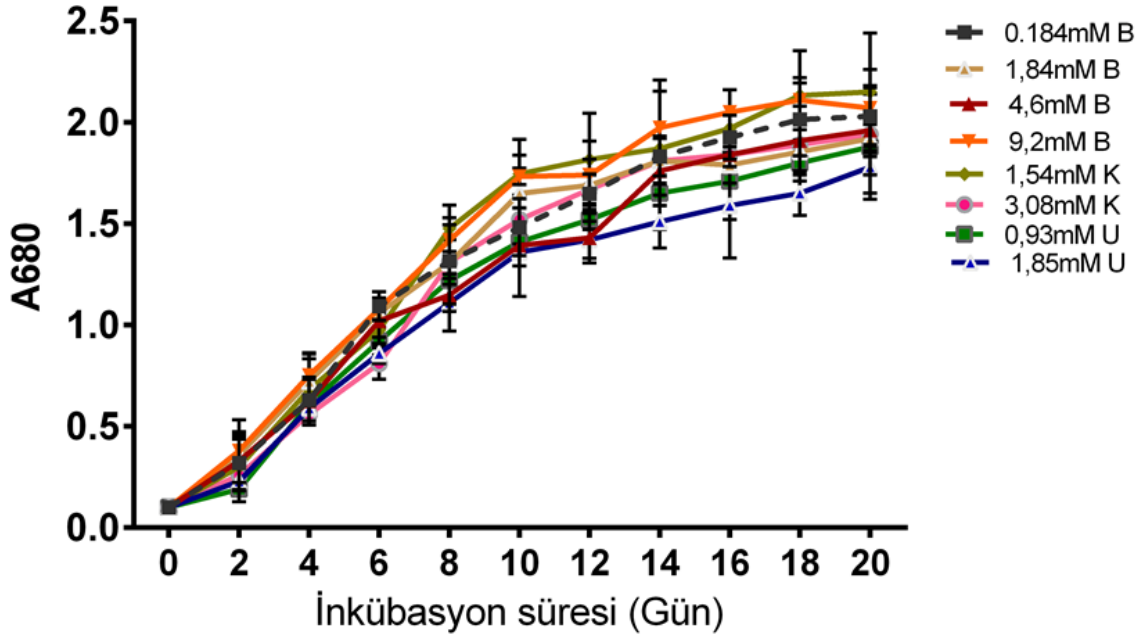
N.oculata



Şekil 7. *N.oculata*'nın büyümesi üzerine artan konsantrasyonlarda Borik asit (B), Kolemanit (K) ve Uleksit (U) etkileri.

Phaeodactylum tricornutum mikroalginin büyümesi üzerine borlu bileşiklerin etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla mikroalgler 20 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu mikroalgin büyüme ortamına uygulanan 0,184mM H_3B_3 yoğunluğu 50 kata kadar artırıldığında mikroalgin büyümesinde kayda değer bir değişme olmamıştır. Bununla birlikte Kolemanit uygulaması da *P.tricornutum*'un büyümesinde dikkate değer bir fark ortaya koymamıştır. Diğer taraftan Uleksit uygulaması bu mikroalgin büyümesi üzerine olumsuz etki yapmıştır. Özellikle büyümenin 12.gününde kaydedilen yaklaşık %13,8 oranında baskılanma takip eden günlerde de sürmüştü ve 20 günlük inkübasyon periyodunun sonunda yaklaşık %12,3 oranında bir baskılanma kaydedilmiştir (Şekil 8).

P.tricornutum

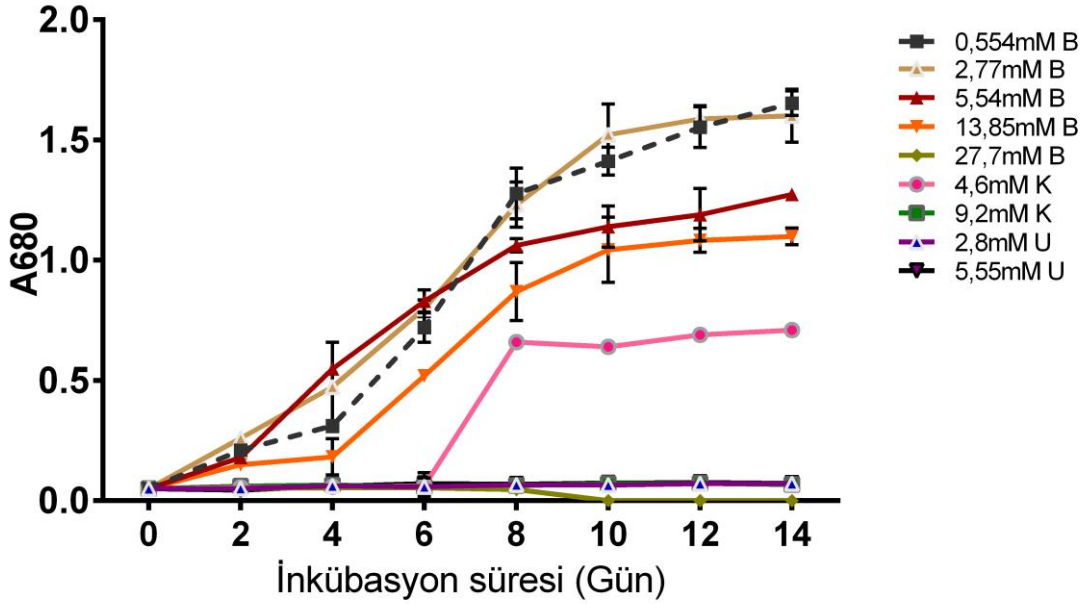


Şekil 8. *P.tricornutum*'un büyümesi üzerine artan konsantrasyonlarda Borik asit (B), Kolemanit (K) ve Uleksit (U) etkileri.

Synechocystis sp. siyanobakterisinin kültüre alındığı A+ büyüme ortamında diğer mikroalgler için kullanılan (0,184mM) 3 katı konsantrasyonda H_3BO_3 kullanılmaktadır (0,554mM). Bu siyanobakterinin büyüme ortamında bulunan H_3BO_3 yoğunluğu ile büyüme arasında sıkı bir ilişki kaydedilmiştir (Şekil 9). Büyüme ortamında 0,554mM olan H_3BO_3 yoğunluğu 5 kat artırıldığında büyümede önemli bir değişme gözlenmemişse de konsantrasyon 10 kat artırıldığında 8. Günden itibaren büyümedeki baskılanma istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur. Ortamdaki H_3BO_3 yoğunluğu 25 kat artırıldığında ilk günden itibaren büyüme %23-%32 düzeylerinde baskılanmıştır. Bununla birlikte ortamdaki H_3BO_3 yoğunluğu 50 kat artırıldığında bu siyanobakterinin büyümesi ilk günden itibaren %76-92 oranlarında baskılanmış ve 6.günden itibaren de büyüme durmuştur. Dolayısıyla Bor elementinin çözeltideki yoğunluğu bu siyanobakteri için kısıtlayıcı bir etken olarak ortaya çıkmıştır. Diğer taraftan Kolemanit ve özellikle de Uleksit uygulamaları bu siyanobakterinin büyümesini çok önemli oranlarda baskılamıştır. Kolemanit borlu bileşiği 4,6mM konsantrasyonda uygulandığı zaman *Synechocystis* sp.'de ilk 6 gün önemli bir büyüme kaydedilmemiş, 6-8. günler arası kısa bir logaritmik büyüme evresinden sonra kontrol grubunun yaklaşık olarak yarısı sayıda hücre ile lineer büyüme evresine girmiştir. Öte yandan kolemanit yoğunluğu 9,2mM olarak uygulandığında bu siyanobakterinin büyümesi ilk günden itibaren baskılanmıştır. Son olarak Uleksit minerali

her iki konsantrasyonda (2,8–5,55 mM) uygulandığında da bu siyanobakterinin büyümesini ilk günden itibaren baskılamış, büyüme gözlenmemiştir (Şekil 9).

Synechocystis sp.



Şekil 9. *Synechocystis* sp. mikroalginin büyümesi üzerine artan konsantrasyonlarda Borik asit (B), Kolanin (K) ve Uleksit (U) etkileri.

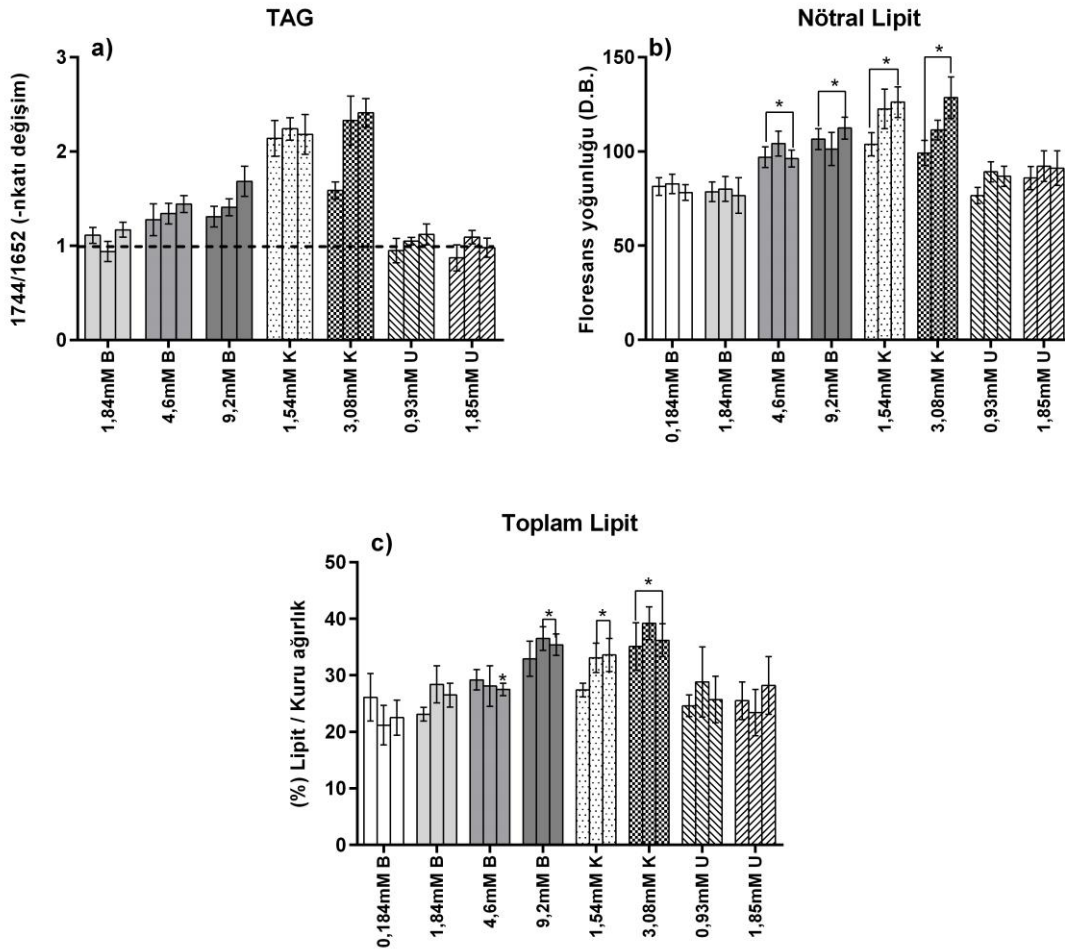
4.3. Artan konsantrasyonda borlu bileşiklere cevapta mikroalglerin Triasilgliserol (TAG), nötral lipid ve toplam lipid içeriklerinde meydana gelen değişiklikler

Artan konsantrasyonda borlu bileşiklerin mikroalglerin biyodizel hammaddesi olarak kullanılan TAG üretimleri üzerine etkileri FTIR analizi ile belirlenmiştir. Çoğu durumda floresans ölçüm ile elde edilen nötral lipid verileri ile klasik Bligh-Dyer yöntemi ile elde edilen toplam lipid verilerinin birbirini destekler nitelikte olduğu kaydedilmiştir.

4.3.1. *C.reinhardtii*'nin TAG, nötral lipid ve toplam lipid içeriğindeki değişimler

Artan H_3BO_3 ve Kolanin konsantrasyonlarına cevapta *C.reinhardtii*'nin TAG içeriklerini önemli oranda artırmış ancak Uleksit uygulaması önemli bir değişikliğe sebep olmamıştır (Şekil 10a). *C.reinhardtii* büyüme ortamında normal olarak bulunan 0,184mM H_3BO_3 içeriği 10 kat artırıldığında TAG içeriğinde önemli bir değişim belirlenmemiştir. Ancak ortam H_3BO_3 içeriği 25 ve 50 kat artırılarak 4,6mM ve 9,2mM yoğunluğa çıkarıldığında inkübasyonun 4. gününden itibaren mikroalgin TAG içeriği sırasıyla 1,28 ve 1,31 kat artmış, zamana bağlı olarak yükselme göstermiş ve inkübasyonun 12. gününde sırasıyla 1,44 ve 1,68 kat artış kaydedilmiştir (Şekil 10a). Kolanin uygulaması *C.reinhardtii*'nin

TAG içeriğini önemli oranda artırmıştır. Bu mikroalgin büyüme ortamına 1,54mM Kolemanit ilavesi mikroalgin TAG içeriğini kontrol grubuna kıyasla inkübasyonun 4. gününde yaklaşık 2,14 kat artırmış, ölçüm yapılan 8. ve 12. günlerde de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Öte yandan büyüme ortamındaki kolemanit yoğunluğu iki katına çıkarıldığında (3,08mM) *C.reinhardtii*'nin TAG içeriği 4.günün sonunda 1,58 kat, 8. ve 12. günlerde de artmış ve sırasıyla kontrol grubuna kıyasla 2,33 ve 2,41 kat daha yüksek düzeyde TAG belirlenmiştir.



Şekil 10. *C.reinhardtii*'nin TAG (a), Nötral lipid (b) ve Toplam lipid (c) üretimi üzerine borlu bileşiklerin (B, Borik asit; K, Kolemanit; U, Uleksit) etkileri. Aynı gruptaki kolonlar sırasıyla 4., 8. ve 12. günlerde alınan ölçüm sonuçlarını gösterir. (*) ile işaretlenmiş değerler en az %95 güven aralığında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.

Floresans boyama ile yapılan nötral lipid tayini sonuçları da bu artışları doğrular nitelikte veriler sunmuştur (Şekil 10b). *C.reinhardtii*'nin nötral lipid içeriği ortam bor yoğunluğu 25 ve 50 kat artırıldığında inkübasyonun 4. gününde yaklaşık %19 ve %30,8 oranında daha yüksek iken inkübasyonun 12. gününde de yine yaklaşık %23,1 ve 43,7 oranında daha yüksek düzeyde belirlenmiştir. Kolemanit uygulaması yine inkübasyonun ilk 4 gününde nötral lipid içeriğini önemli oranda artırmıştır. Büyütme ortamında 1,54mM ve 3,08mM

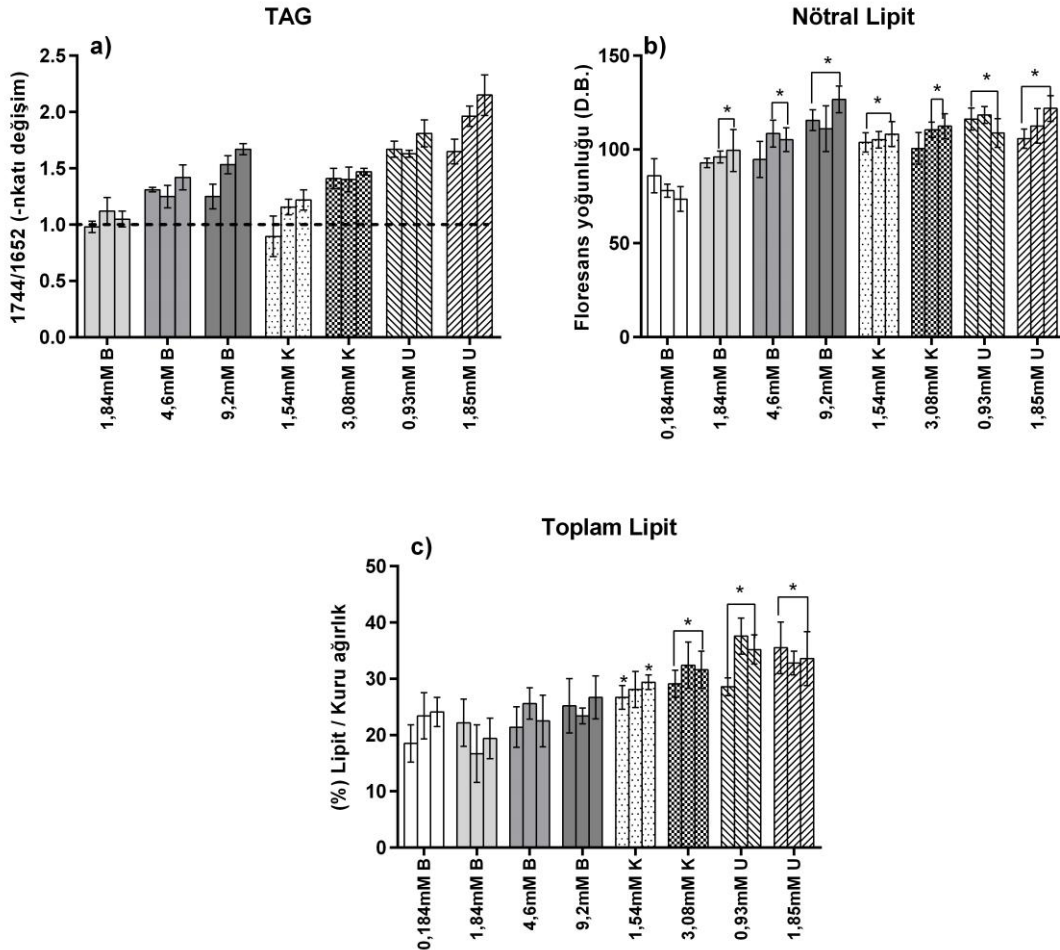
Kolemanit uygulanan *C.reinhardtii*'nin nötral lipid içeriği inkübasyonun 4. gününde sırasıyla yaklaşık %27,5 ve %21,5 düzeylerinde daha yüksek düzeyde iken her iki grupta da zamana bağlı olarak artışlar sürmüştür ve inkübasyonun 8. gününde sırasıyla %47,9 ve %34,6 dolaylarında ölçülen artış inkübasyonun 12. Gününde sırasıyla %61,4 ve %64,3 artış olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla kolemanit uygulaması konsantrasyondan ziyade zamana bağlı olarak *C.reinhardtii*'nin nötral lipid içeriğinde sürekli artışlara sebep olmuştur. Son olarak mikroalgin nötral lipid içeriğinde uleksit uygulamasına cevapta önemli bir değişiklik görülmemiştir.

C.reinhardtii'nin toplam lipid içeriği ortam H_3BO_3 yoğunluğu 10 kat artırıldığında önemli oranda değişmemiş, 25 kat artırıldığında da yalnızca inkübasyonun 12. gününde yaklaşık %22,3 düzeyinde bir artış kaydedilmiş, 50 kat artırıldığında inkübasyonun 8. ve 12. günlerinde sırasıyla %72,2 ve %57,3 düzeylerinde artışlar kaydedilmiştir (Şekil 10c). Büyütme ortamına 1,54mM Kolemanit uygulanan *C.reinhardtii*'nin toplam lipid miktarı kontrol grubu ile kıyaslandığında ilk 4 gün önemli bir değişiklik sergilememiş, inkübasyonun 8. ve 12. günlerinde yaklaşık %56,1 ve %49,3 düzeylerinde daha yüksek lipid içeriği belirlenmiştir. Üstelik ortamdaki Kolemanit yoğunluğu iki katına çıkarıldığında inkübasyonun 4. gününden itibaren istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir. Bu mikroalgin büyüme ortamına 3,08mM Kolemanit uygulandığında inkübasyonun 4.gününde yaklaşık %34,5 artış kaydedilmişken, inkübasyonun 8. gününde kontrol grubuna (0,184mM H_3BO_3 uygulanan grup) kıyasla yaklaşık %84,9 daha yüksek düzeyde lipid belirlenmiştir. İnkübasyonun 8. gününde kaydedilen artış en yüksek düzeyde olsa da 12. günde yaklaşık %60,9 düzeyinde daha yüksek lipid miktarı kaydedilmiştir. Son olarak bir başka borlu bileşik olan Uleksit uygulaması bu mikroalgin büyümesi üzerine etkili olmadığı gibi TAG, nötral lipid ve toplam lipid üretimi üzerine de önemli etkilere sebep olmamıştır.

4.3.2. *C.vulgaris*'in TAG, nötral lipid ve toplam lipid içeriğindeki değişimler

Chlorella vulgaris'in TAG, nötral lipid ve toplam lipid içerikleri ortamdaki borlu bileşiklerin çeşitleri ve konsantrasyonlarına cevapta artma eğilimi sergilemiştir (Şekil 11). Bu mikroalgin büyüme ortamına 0,184mM olarak uygulanan H_3BO_3 yoğunluğu 10 kat artırıldığında TAG içeriğinde önemli bir değişim kaydedilmemiş olsa da H_3BO_3 yoğunluğu 25 ve 50 kat artırıldığında TAG içeriğinde dikkate değer artışlar belirlenmiştir (Şekil 11a). Büyütme ortamında 4,6mM H_3BO_3 bulunan *C.vulgaris*'in TAG içeriği kontrol grubuna (0,184mM) kıyasla inkübasyonun 8., 16. ve 24. günlerinde sırasıyla 1,31, 1,25 ve 1,42 kat daha yüksek düzeyde belirlenmiştir. Büyütme ortamındaki H_3BO_3 yoğunluğu 9,2mM'a çıkarıldığında kontrole kıyasla 8.,-16.,-24., günlerde elde edilen veriler TAG içeriğinin

ortalama 1,25-1,67 arasında daha yüksek düzeylerde olduğunu göstermiştir. Kolemanit ve Uleksit uygulamalarının bu mikroalgin TAG içeriği üzerine önemli etkileri olmuştur. Büyütme ortamında 1,54mM Kolemanit uygulanan *C.vulgaris*'in TAG içeriği ancak 24. günde 1,22 kat daha yüksek düzeyde belirlenmiş olsa da Kolemanit yoğunluğu iki katına çıkarıldığında (3,08mM) inkübasyonun ilk 8 gününde görülen yaklaşık 1,41 katlık artış inkübasyon boyunca korunmuş ve nihayet inkübasyonun 16. ve 24. günlerinde de kontrol grubuna kıyasla sırasıyla 1,4 ve 1,47 kat daha yüksek düzeyde TAG içeriği belirlenmiştir. Borlu bileşikler içerisinde Uleksit uygulaması hem borik asit ve hem de kolemanit uygulamalarına kıyasla *C.vulgaris*'de TAG üretimi açısından daha etkili olmuştur. Büyütme ortamına 0,93mM Uleksit uygulanan *C.vulgaris*'in TAG içeriği logaritmik büyüme evresini yansıtan 8. ve 16. günlerde sırasıyla 1,67 ve 1,63 kat daha yüksek düzeyde belirlenmişken geç logaritmik büyüme evresini yansıtan 24. günde de TAG içeriği kontrol grubuna kıyasla 1,81 kat daha yüksek düzeyde belirlenmiştir. Ortam Uleksit yoğunluğu 2 kat artırıldığında (1,85mM) dahi TAG içerikleri inkübasyonun 8., 16. ve 24. günlerinde kontrol grubuna göre sırasıyla 1,65, 1,96 ve 2,15 kat daha yüksek düzeyde belirlenmiştir (Şekil 11a).



Şekil 11. *C.vulgaris*'in TAG (a), Nötral lipid (b) ve Toplam lipid (c) üretimi üzerine borlu bileşiklerin (B, Borik asit; K, Kolemanit; U, Uleksit) etkileri. Aynı gruptaki kolonlar sırasıyla 8., 16. ve 24. günlerde alınan ölçüm sonuçlarını gösterir. (*) ile işaretlenmiş değerler en az %95 güven aralığında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.

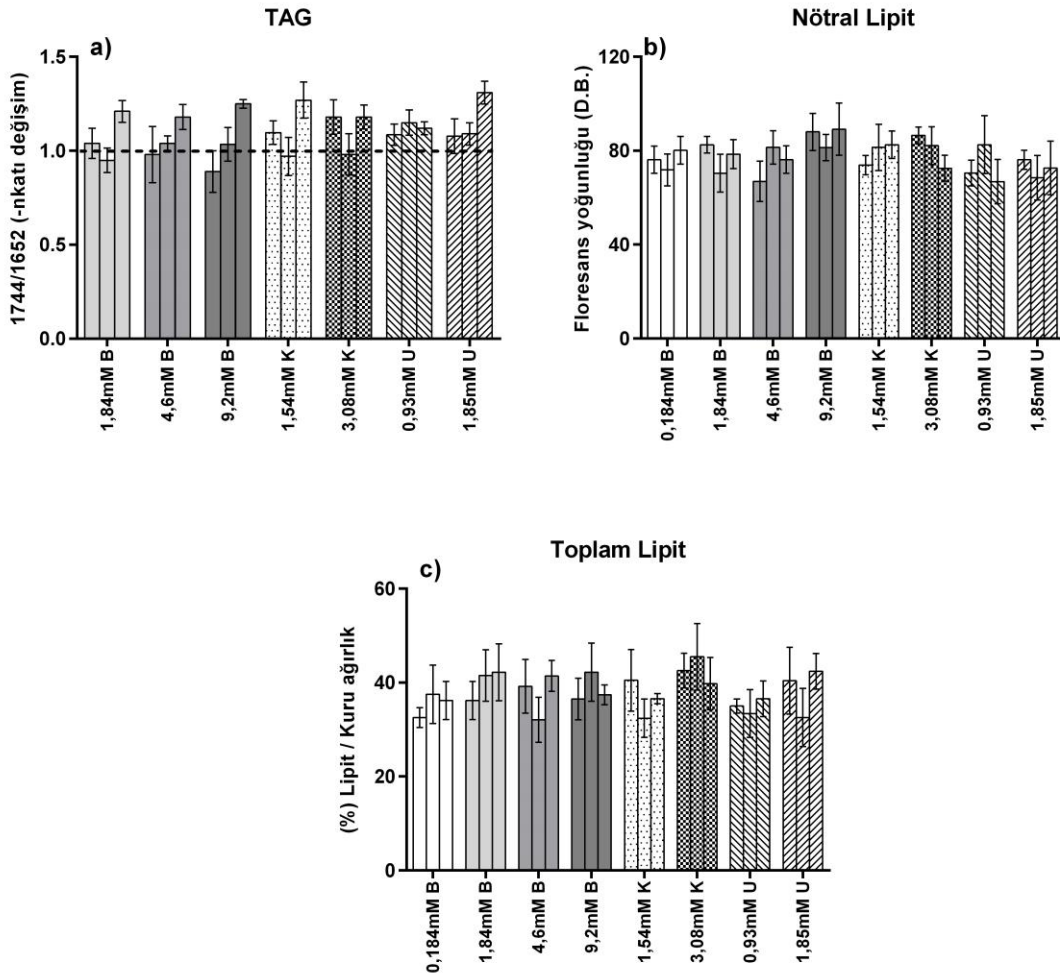
C.vulgaris'in büyüme ortamına uygulanan 0,184mM H_3BO_3 yoğunluğu 10 ve 25 kat artırıldığında bu mikroalgin nötral lipid içeriğinde inkübasyonun ilk 8 gününde önemli bir değişim kaydedilmemiş olsa da inkübasyonun 16. ve 24. günlerinde görülen yaklaşık %22,9-%38,9 ve %35,1-%42,9 düzeylerindeki artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 11b). Keza bu mikroalgin büyütme ortamına 9,2mM H_3BO_3 uygulandığında inkübasyonun 8., 16. ve 24. günlerinde kaydedilen sırasıyla yaklaşık %34,4, %42,3 ve %72,1 düzeylerinde artışlar kaydedilmiş, böylece zamana ve bor yoğunluğuna cevapta bu mikroalgin nötral lipid içeriğinde anlamlı artışların olduğu anlaşılmıştır. Diğer taraftan Kolemanit ve Uleksit uygulamaları bu mikroalgin nötral lipid içeriğinde benzer düzeylerde artışlara sebep olmuştur. Sırasıyla 1,54mM Kolemanit ve 0,93mM Uleksit uygulanan *C.vulgaris*'in nötral lipid içeriği inkübasyonun 8. gününde kontrol grubuna kıyasla yaklaşık %20,7 ve %35,1 düzeylerinde iken bu artışlar inkübasyon süresince çok bozulmamış, inkübasyonun 24. gününde sırasıyla yaklaşık %47,1 ve %47,8 düzeylerinde artışlar kaydedilmiştir. Hem kolemanit ve hem de uleksit konsantrasyonları iki kat artırıldığında da yine *C.vulgaris*'in nötral lipid içeriğinde benzer düzeylerde değişim kaydedilmiştir (Şekil 11b).

C.vulgaris'in içerdiği toplam lipid miktarı, büyüme ortamındaki H_3BO_3 yoğunluğu arttığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim sergilememiştir. Ancak Kolemanit ve Uleksit uygulamaları TAG ve nötral lipid üretiminde olduğu gibi toplam lipid içeriklerinde de ciddi artışlara sebep olmuştur (Şekil 11c). Büyüme ortamına 1,54mM ve 3,08mM Kolemanit uygulanan *C.vulgaris*'i toplam lipid içeriği inkübasyonun 8. gününde kontrol grubuna kıyasla yaklaşık %44,3 ve 57,3 düzeylerinde daha yüksek olarak belirlenmiş, inkübasyonun 24. gününde de yine kontrol grubuna kıyasla yaklaşık %22,1 ve 31,1 daha yüksek düzeyde belirlenmiştir. Uleksit uygulaması da benzer sonuçlar vermiştir. Büyüme ortamında 0,93mM ve 1,85mM Uleksit uygulanan *C.vulgaris*'in toplam lipid içeriği kontrol grubuna kıyasla inkübasyonun 8.; 16.; ve 24. günlerinde sırasıyla %54,6 ve 91,8; 60,6 ve 40,2; ile 46,1 ve 39,5 düzeylerinde daha yüksek olarak belirlenmiştir.

4.3.3. *N.oculata*'nın TAG, nötral lipid ve toplam lipid içeriğindeki değişimler

N.oculata'nın TAG, nötral lipid ve toplam lipid içerikleri 20 günlük inkübasyonun 6., 12. ve 18. günlerinde alınan örneklerden yapılan ölçümlerle belirlenmiştir. Genel olarak Borlu bileşiklerin artan konsantrasyonlarda uygulandığında dahi bu mikroalgin TAG içeriğinde ilk 12 gün boyunca çok belirgin değişikliklere sebep olmadığı görülmüştür (Şekil 12a).

Diğer taraftan inkübasyon süresi uzadığında borlu bileşiklerin genel olarak bu mikroalgin TAG içeriğinde artışları tetiklediği anlaşılmaktadır. Zira ortam H_3BO_3 yoğunluğu sırasıyla 10, 25 ve 50 kat artırıldığında *N.oculata*'nın TAG içeriği kontrol grubuna kıyasla inkübasyonun 18. gününde sırasıyla 1,21, 1,18 ve 1,25 kat daha yüksek düzeyde belirlenmiştir. Üstelik bu durum projede kullanılan diğer borlu bileşikler olan Kolemanit ve Uleksit için de geçerlidir. İnkübasyonun ilk 12 gününde önemli bir farklılık görünmese de inkübasyonun 18. gününde 1,54mM ve 3,08mM konsantrasyonda Kolemanit uygulandığında sırasıyla 1,27 ve 1,18 kat artış kaydedilmiştir. Benzer şekilde 0,93mM Uleksit uygulanan *N.oculata*'nın TAG içeriğinde önemli bir değişim kaydedilmese de 1,85mM Uleksit uygulanan *N.oculata*'nın TAG içeriğinde ilk 12 günlük ölçümlerde kayda değer bir farklılık olmamakla birlikte 18. günde 1,31 kat artış kaydedilmiştir (Şekil 12a). Diğer taraftan yapılan analizlerde borlu bileşiklerin artan konsantrasyonlarda uygulandığı gruplarda büyüme ortamına 0,184mM H_3BO_3 uygulanan kontrol grubu mikroalglere kıyasla hem nötral lipid içeriği ve hem de toplam lipid içeriğinde önemli bir değişim olmadığı anlaşılmıştır (Şekil 12b,c).



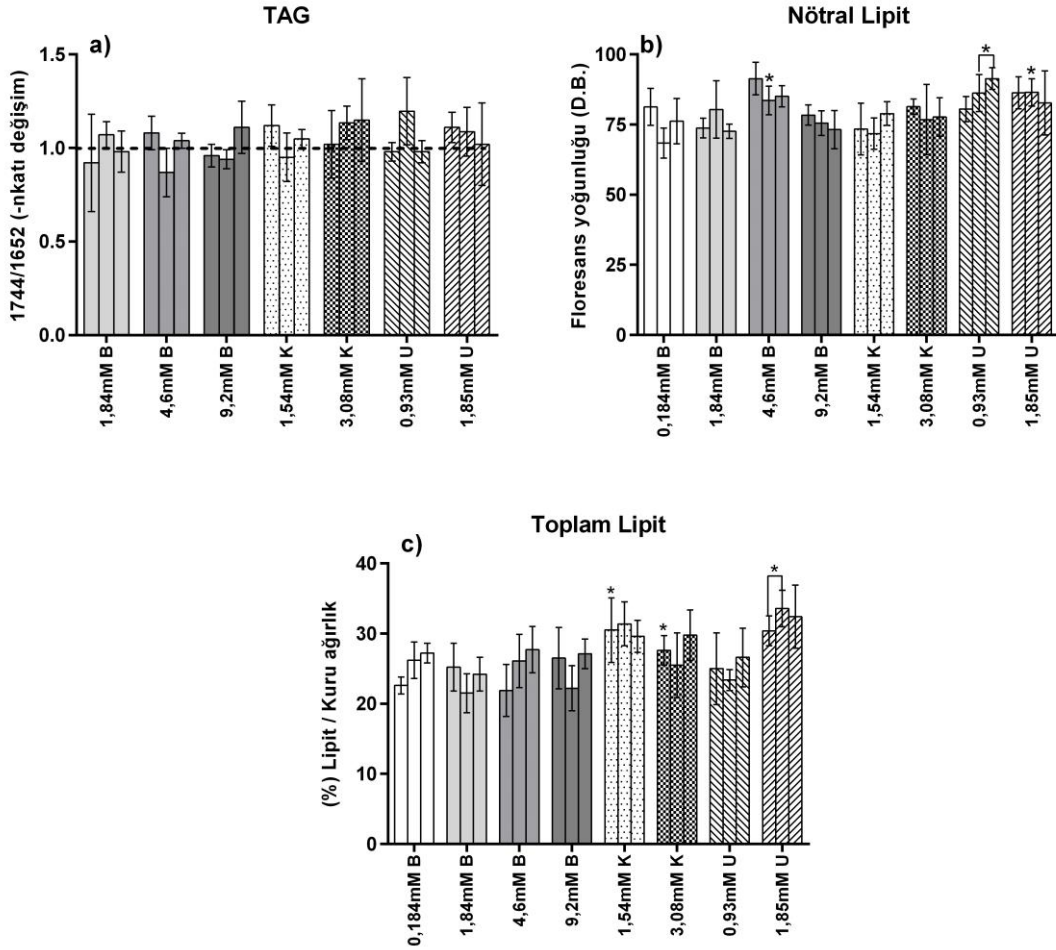
Şekil 12. *N.oculata*'nın TAG (a), Nötral lipid (b) ve Toplam lipid (c) üretimi üzerine borlu bileşiklerin (B, Borik asit; K, Kolemanit; U, Uleksit) etkileri. Aynı gruptaki kolonlar sırasıyla 6., 12. ve 18. günlerde alınan ölçüm sonuçlarını gösterir. (*) ile işaretlenmiş değerler en az %95 güven aralığında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.

4.3.4. *P.tricornutum*'un TAG, nötral lipid ve toplam lipid içeriğindeki değişimler

P.tricornutum'un TAG, nötral lipid ve toplam lipid içerikleri 20 günlük inkübasyonun 6., 12. ve 18. günlerinde alınan örneklerden yapılan ölçümlerle belirlenmiştir. FTIR analizi ile elde edilen veriler bu mikroalgin TAG içeriğinde, artan konsantrasyonlarda borlu bileşiklerin etki etmediğini göstermiştir (Şekil 13a).

Normal olarak büyütme ortamında 0,184mM H_3BO_3 uygulanan kontrol grubuna göre ortam H_3BO_3 yoğunluğu 50 kata kadar artırıldığında mikroalgin nötral lipid içeriğinde çarpıcı değişiklikler belirlenmemiştir (Şekil 13b). Bu mikroalgin büyütme ortamına Kolemanit uygulandığında da yine nötral lipid içeriğinde önemli bir değişim belirlenmemiştir. Bununla birlikte Uleksit uygulaması bu mikroalgin nötral lipid içeriğini artırmıştır. İnkübasyonun 12. ve 18. günlerinde yapılan ölçümler 0,93mM Uleksit uygulamasının bu mikroalgin nötral lipid içeriğini sırasıyla yaklaşık %26 ve %20,1 düzeylerinde artırdığını göstermiştir (Şekil 13b). Büyütme ortamına ilave edilen Uleksit yoğunluğu 1,85mM olarak artırıldığında yine *P.tricornutum*'un nötral lipid içeriği artmış, en yüksek %26,4 düzeylerinde 12. günde kaydedilen artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

P.tricornutum'un toplam lipid içeriği ortam H_3BO_3 yoğunluğu 50 kata kadar artırıldığında önemli bir değişim sergilememiştir (Şekil 13c). Diğer taraftan düşük oranda da olsa sırasıyla 1,54mM ve 3,08mM Kolemanit uygulaması bu mikroalgin toplam lipid içeriğini inkübasyonun ilk 6 gününde yaklaşık %35 ve %22,1 düzeylerinde artırmış takip eden günlerde gözlenen sayısal artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Son olarak 0,93mM Uleksit uygulaması bu mikroalgin toplam lipid içeriğinde kayda değer bir artışa sebep olmasa da Uleksit yoğunluğu 1,85mM olarak uygulandığında inkübasyonun 6. ve 12. günlerinde kaydedilen yaklaşık %34,5 ve %28,2 düzeylerindeki artışlar istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olarak değerlendirilmiştir.

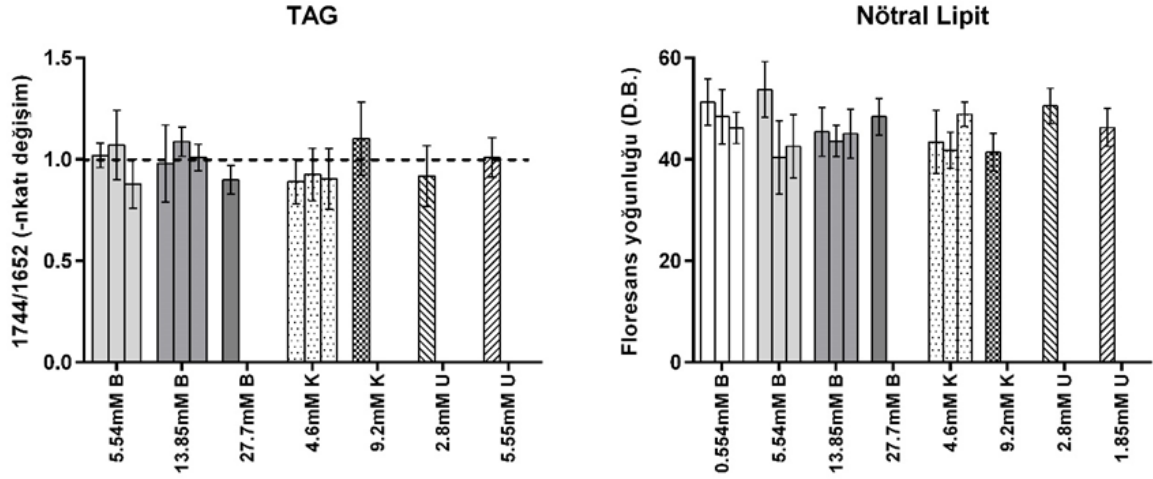


Şekil 13. *P.tricornutum*'un TAG (a), Nötral lipid (b) ve Toplam lipid (c) üretimi üzerine borlu bileşiklerin (B, Borik asit; K, Kolemanit; U, Uleksit) etkileri. Aynı gruptaki kolonlar sırasıyla 6., 12. ve 18. günlerde alınan ölçüm sonuçlarını gösterir. (*) ile işaretlenmiş değerler en az %95 güven aralığında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.

4.3.5. *Synechocystis* sp.'in TAG, nötral lipid ve toplam lipid içeriğindeki değişimler

Synechocystis sp.'in TAG içeriği FTIR analizi ile belirlenmiştir. Elde edilen veriler bu mikroalgın TAG içeriğinde artan konsantrasyonlarda borlu bileşiklerin etki etmediğini göstermiştir (Şekil 14a). Benzer şekilde floresans ölçümle yapılan nötral lipid miktarının belirlenmesi çalışmaları da bu siyanobakterinin nötral lipid üretimi üzerine borlu bileşiklerin etki etmediğini göstermiştir (Şekil 14b). Öte yandan standart Bligh-Dyer yöntemi ile gerçekleştirilen toplam lipid tayini çalışmasında bu siyanobakteri ile ilgili sağlıklı bir veri elde edilememiştir. Oysa artan konsantrasyonlarda uygulandıklarında bu siyanobakterinin büyümesi Bor yoğunluğundaki artışla ters orantılı olarak düşmektedir. Dolayısıyla artan Bor yoğunluğunun bu siyanobakteride toksik etki gösterdiği değerlendirilmiştir. Böylece

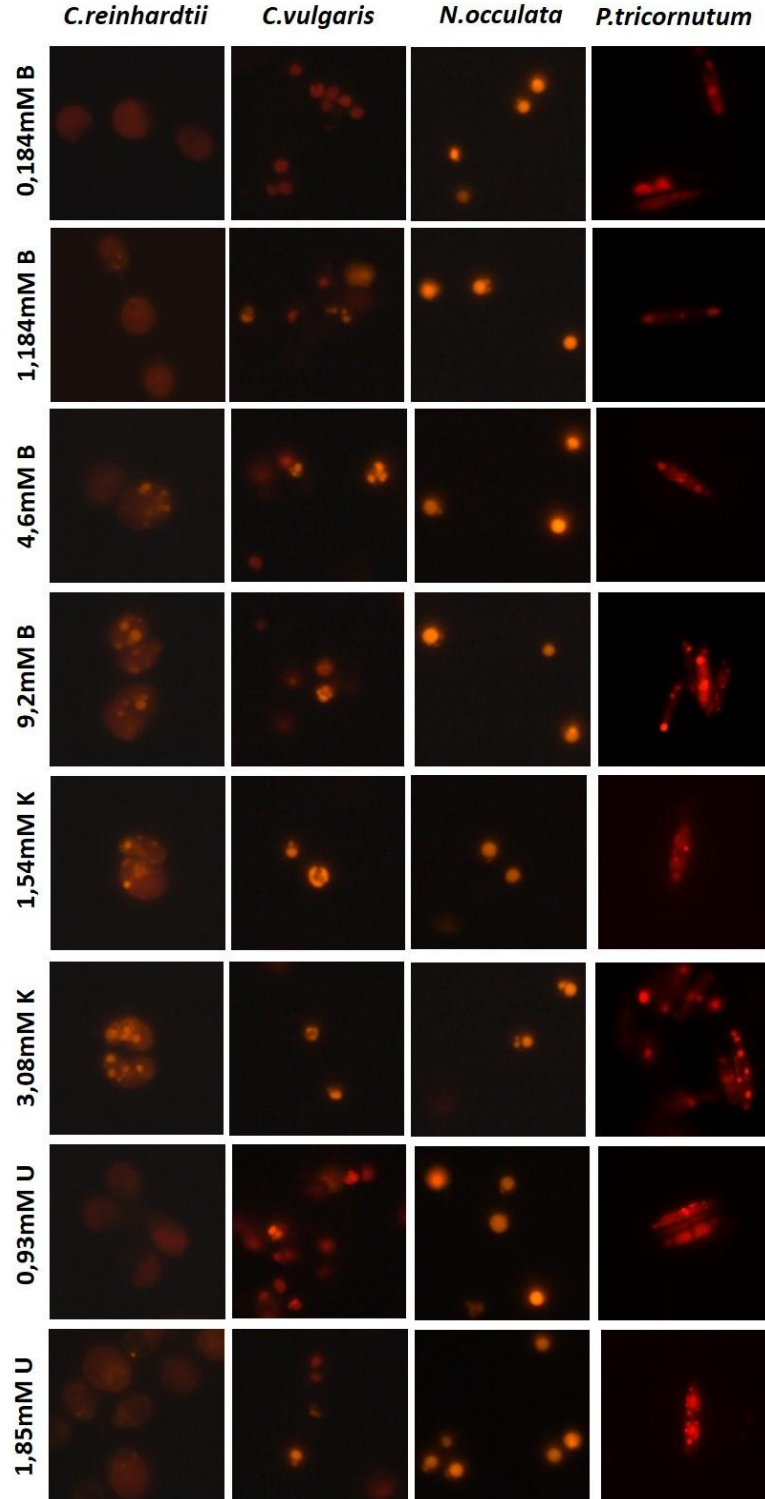
takip eden çalışmalar için bu siyanobakterinin dışında diğer ökaryotik türler ile devam edilmesine karar verilmiştir.



Şekil 14. *Synechocystis* sp.ın TAG (a) ve Nötral lipid (b) üretimi üzerine borlu bileşiklerin (B, Borik asit; K, Kolesterol; U, Uleksit) etkileri. Aynı gruptaki kolonlar (5,54mM ve 13,85mM Borik asit ile 4,6mM Kolesterol uygulamalarında) sırasıyla 4., 8. ve 12. günlerde alınan ölçüm sonuçlarını gösterir. Diğer gruplarda yalnızca 4. günden alınan ölçümler sunulmuştur.

4.4. Sitoplazmik lipid cisimlerinin floresans görüntülenmesi

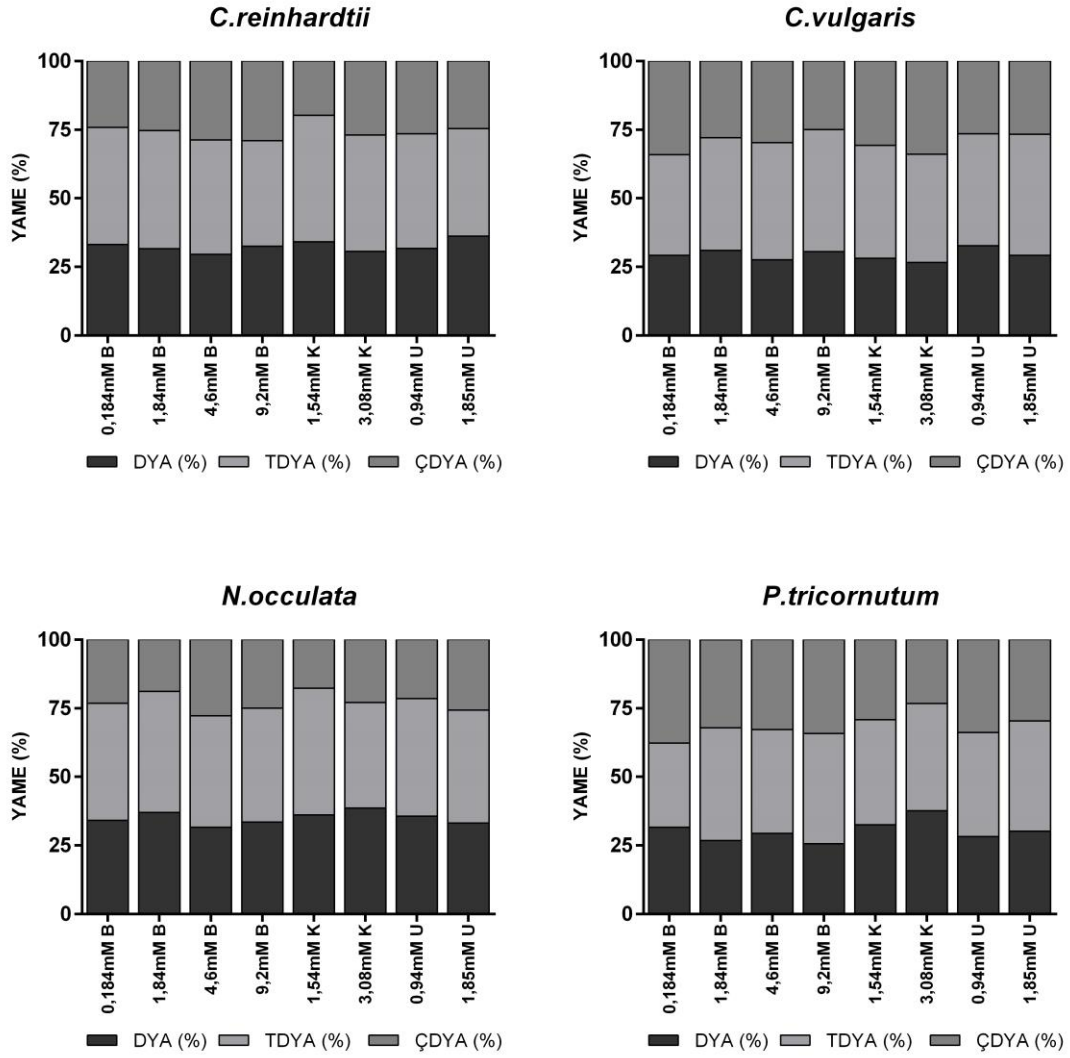
Tablo 5. Logaritmik büyüme evresinde mikroalglerin sitoplazmik lipid cisimlerinin floresans görüntüleri (M.B. 40x10). *C.reinhardtii* 8. gün; *C.vulgaris* 16. gün; *N.oculata* ve *P.tricornutum* ise 12.günde hasat edilmiştir. Açık turuncu renkte görünen noktalar sitoplazmik lipid cisimleridir.



Farklı konsantrasyonlarda Borik asit, Kolemanit ve Uleksit borlu bileşikler uygulanan türlerin ürettikleri sitoplazmik lipid cisimlerinin görüntülenmesi amacıyla Nil kırmızısı ile boyanan türlerin floresans görüntülenmesi yapılmıştır (Tablo 5). Yukarıdaki resimde de sunulduğu gibi *C. reinhardtii*'de ortam H_3BO_3 yoğunluğundaki artışla birlikte sitoplazmik lipid cisimi üretiminde artış gözlenmiştir. Öte yandan Kolemanit uygulaması da sitoplazmik lipid cisimi üretiminde artışa sebep olmuşken Uleksit uygulaması genel olarak etkili olmamıştır. *C. vulgaris*'de artan H_3BO_3 konsantrasyonları ve diğer borlu bileşiklerin uygulanmasına cevapta sitoplazmik lipid cisimi üretiminde artış kaydedilmiştir. *N. oculata*'da sitoplazmik lipid cisimleri kontrol grubunda da gözlemlenmişken borlu bileşik uygulamasına cevapta kayda değer bir artış gözlemlenmemiştir. Son olarak *P. tricornutum*'da yüksek H_3BO_3 konsantrasyonları ve Kolemanit ile özellikle Uleksit uygulamasına cevapta sitoplazmik lipid cisimlerinin daha yoğun sentezlendiği gözlemlenmiştir. Genel olarak floresans boyama ile gözlemlenen sitoplazmik lipid cisimi üretimindeki değişiklikler spektro(floro)metrik ölçümlerle uyumlu çıkmıştır.

4.5. Mikroalglerin Yağ asidi metil ester (YAME) analizleri

Mikroalglerin lipid içeriğinin artırılmasına yönelik yürütülen çalışmalarda yapılan uygulama sonrasında mikroalgler tarafından üretilen yağ asidi bileşenlerinin oranı önem taşımaktadır. Biyodizelin kalitesini belirleyen ana unsurlar olan setan numarası, iodin numarası, yanma noktası, NOx emisyon değeri, oksidatif durgunluğu ve akışkanlığı gibi değerler temelde biyodizelin içindeki YAME profiline bağlıdır (Saraf ve Thomas, 2007; Francisco vd., 2010). Doymamış yağ asitleri kolay okside olduklarından biyodizelin akışkanlığını etkiler (Saraf ve Thomas, 2007). Bu sebeple biyodizelin doymuş (DYA) ve tekli doymamış yağ asidi (TDYA) içeriği yüksek, çoklu doymamış yağ asidi (ÇDYA) içeriği de düşük olmalıdır. Zira Avrupa birliği EN 14214 standartlarına göre biyodizel amaçlı kullanılan yağlardaki DYA ve TDYA oranlarının toplamı %70'den yüksek olmalıdır (European standard EN 14214, 2008). Bu çalışmada artan konsantrasyonlarda borlu bileşiklerin logaritmik büyüme evresindeki mikroalglerin ürettikleri lipidlerdeki YAME içerikleri üzerine etkileri değerlendirilmiştir (Şekil 15).



Şekil 15. Logaritmik büyüme evresinde mikroalglerin Yağ asidi metil ester (YAME) analizi. *C.reinhardtii* 8. gün; *C.vulgaris* 16. gün; *N.occulata* ve *P.tricornutum* ise 12.günde hasat edilmiştir. DIA, Doymuş yağ asidi; TDYA, Tekli doymamış yağ asidi; ÇDYA, Çoklu doymamış yağ asidi

Büyütme ortamında normal olarak 0.184mM H_3BO_3 bulunan *C.reinhardtii*'nin ÇDYA içeriği inkübasyonun logaritmik büyüme evresi olarak belirlenen 8. gününde yaklaşık %24,1 olarak belirlenmiştir (Şekil 15). Ortam H_3BO_3 yoğunluğu arttıkça bu mikroalgin ürettiği ÇDYA içeriğinde de artışlar kaydedilse de sınırlı düzeydedir. Öyle ki büyütme ortamında H_3BO_3 yoğunluğu 25 ve 50 kat artırıldığında *C.reinhardtii*'nin ÇDYA içeriği toplam YAME'in yaklaşık %29'u kadar belirlenmiştir. Diğer taraftan 1,54mM uygulanan *C.reinhardtii*'de ÇDYA içeriği toplam YAME'in yaklaşık %19,7'si iken Kolemanit yoğunluğu 3,08mM olarak uygulandığında ÇDYA içeriği yaklaşık %26,9 olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla artan konsantrasyonlarda H_3BO_3 ve Kolemanit uygulaması bu mikroalgde TAG, toplam lipid ve nötral lipid üretiminde artışa sebep olmakla birlikte ürettiği lipid

biyodizel hammaddesi olarak kullanım için Avrupa standartlarına uygun nitelikte olduğu anlaşılmaktadır. Son olarak 0,94mM ve 1,85mM Uleksit uygulanan *C.reinhardtii*'nin ÇDYA içeriği toplam YAME üretiminin %24,6-%26,5'i düzeyinde belirlenmiştir.

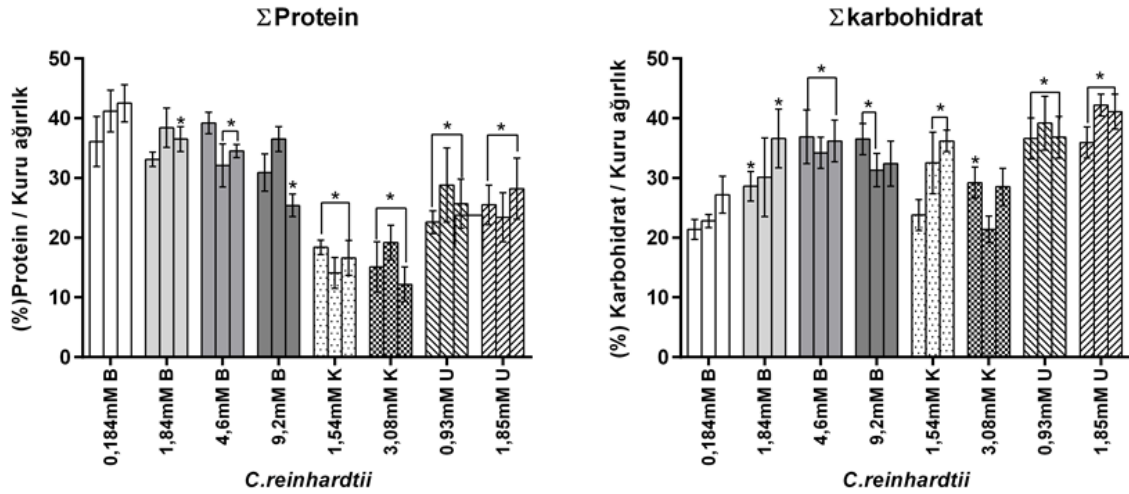
Büyütme ortamında 0,184mM H_3BO_3 bulunan *C.vulgaris*'in ÇDYA içeriği inkübasyonun logaritmik büyüme evresi olarak belirlenen 16. gününde yaklaşık %34,2 olarak belirlenmiştir (Şekil 15). Ortam H_3BO_3 yoğunluğu artırıldığında bu mikroalgin ÇDYA içeriğinde dikkate değer azalmalar kaydedilmiştir. Sırasıyla 4,6mM ve 9,2mM H_3BO_3 uygulanan *C.vulgaris*'in ÇDYA içeriği toplam YAME üretiminin %29,7 ve %25'i düzeylerinde belirlenmiştir. Öte yandan Kolemanit uygulanan *C.vulgaris*'in ÇDYA içeriği toplam YAME üretiminin yaklaşık %30,7-%33,9'u düzeylerinde iken Uleksit uygulanan *C.vulgaris*'te yaklaşık %26,5 düzeylerinde belirlenmiştir. Dolayısıyla bu mikroalge borlu bileşiklerin uygulanması ile üretilen YAME içeriği yine Avrupa standartlarına uygun olduğu değerlendirilmiştir.

Büyütme ortamında 0,184mM H_3BO_3 bulunan *N.oculata*'nın ÇDYA içeriği inkübasyonun logaritmik büyüme evresi olarak belirlenen 12. gününde yaklaşık %23,1 olarak belirlenmiştir (Şekil 15). Ortam H_3BO_3 yoğunluğu 50 kata kadar artırıldığında bu mikroalgin ÇDYA içeriği toplam YAME üretiminin yaklaşık %18,8-%27,6 düzeylerinde, kolemanit uygulaması ile %17,7-%22,9 düzeylerinde, Uleksit uygulaması ile %21,5-%25,6 düzeylerinde belirlenmiştir.

Büyütme ortamında 0,184mM H_3BO_3 bulunan *P.tricornutum*'un ÇDYA içeriği inkübasyonun logaritmik büyüme evresi olarak belirlenen 12. gününde yaklaşık %37,7 olarak belirlenmiştir (Şekil 15). Ortam H_3BO_3 yoğunluğu 50 kata kadar artırıldığında bu mikroalgin ÇDYA içeriği toplam YAME üretiminin yaklaşık %32,1-%34,2 düzeylerinde belirlenmiştir. Uleksit uygulanan *P.tricornutum*'un ÇDYA içeriği toplam YAME üretiminin yaklaşık %29,6-%33,8'i düzeylerinde ölçülmüştür. Kolemanit uygulanan *P.tricornutum*'un ÇDYA içeriği kayda değer düzeyde azalmıştır. Sırasıyla 1,54mM ve 3,08mM Kolemanit uygulanan *P.tricornutum*'un ÇDYA içeriği toplam YAME üretiminin yaklaşık %29,1 ve %23,2 düzeylerinde olduğu kaydedilmiştir.

4.6.Mikroalglerin toplam protein ve karbohidrat içeriklerinde meydana gelen değişimler

C.reinhardtii'nin toplam protein içeriği artan H_3BO_3 yoğunluğuna cevapta düşüş sergilemiştir. Özellikle inkübasyonun 12. Gününde ortam H_3BO_3 yoğunluğu 10, 25 ve 50 kat artırılan *C.reinhardtii*'nin toplam protein içeriği sırasıyla yaklaşık olarak %14,1; %18,8 ve %40,2 düzeylerinde azalmıştır (Şekil 16). Sırasıyla 1,54mM ve 3,08mM Kolemanit uygulanan *C.reinhardtii*'nin toplam protein içeriği ilk günden itibaren %49 ve %58,1 düzeylerinde azalmış inkübasyon süresi uzadıkça protein içeriğinde azalma sürmüştü ve inkübasyonun 12. gününde toplam protein içeriği kontrol grubuna kıyasla yaklaşık %60,9 ve %71,3 düzeylerinde azalma göstermiştir. Son olarak 0,94mM ve 1,85mM Uleksit uygulanan *C.reinhardtii*'nin toplam protein içeriği 0,184mM H_3BO_3 uygulanan kontrol grubuna kıyasla inkübasyonun 4.gününde %37,3 ve %29,4 düzeylerinde bir azalma göstermişken inkübasyon süresi uzasa da protein seviyesi ortalama bu düzeylerde seyretmiştir.

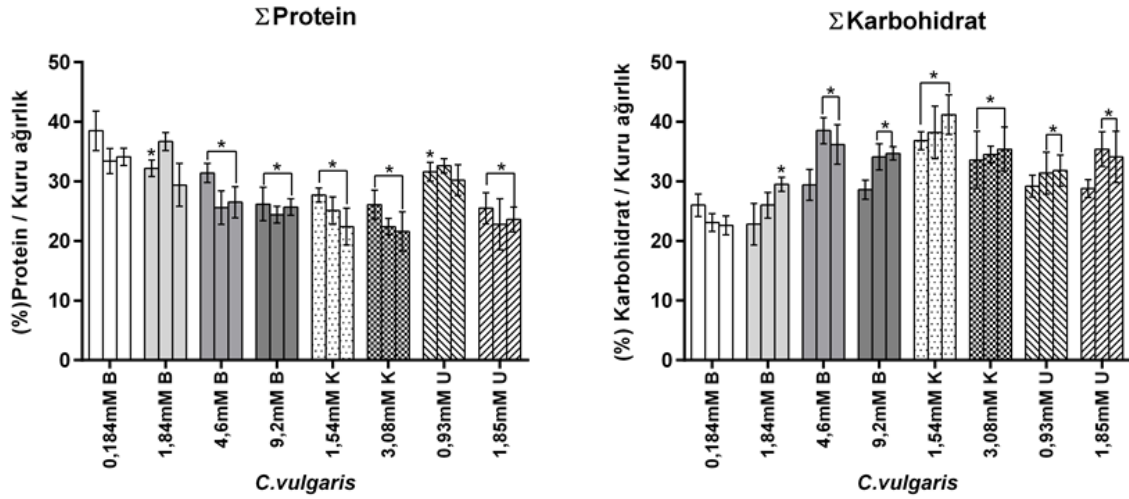


Şekil 16. *C.reinhardtii*'nin toplam protein ve karbohidrat üretimi üzerine borlu bileşiklerin etkileri. Aynı gruptaki kolonlar sırasıyla 4., 8. ve 12. günlerde alınan ölçüm sonuçlarını gösterir. (*) ile işaretlenmiş değerler kontrol grubuna göre en az %95 güven aralığında farklı olduğunu gösterir.

Artan H_3BO_3 , Kolemanit ve Uleksit uygulamalarına cevapta protein içeriğindeki azalmayla birlikte toplam karbohidrat üretiminde artışlar belirlenmiştir (Şekil 16). Ortam H_3BO_3 yoğunluğu 10, 25 ve 50 kat artırıldığında *C.reinhardtii*'nin toplam karbohidrat içeriği inkübasyonun 4. gününde sırasıyla yaklaşık %33,6; %72,4 ve %70,5 düzeylerinde artmıştır. Diğer taraftan 1,54mM kolemanit uygulaması inkübasyonun 8. ve 12. günlerinde *C.reinhardtii*'nin toplam karbohidrat içeriğini sırasıyla %42,5 ve 33,1 oranında artırmışken kolemanit yoğunluğu 2 katına çıkarıldığında yalnızca inkübasyonun 4. gününde %36,4 düzeyinde artışa sebep olmuş takip eden günlerde kontrol grubuna kıyasla önemli bir değişikliğe sebep olmamıştır. Son olarak Uleksit uygulaması *C.reinhardtii*'nin toplam karbohidrat içeriğini ilk günlerden itibaren çok yüksek düzeyde artırmıştır. Büyüme

ortamına 0,93mM ve 1,85mM Uleksit uygulanan *C.reinhardtii*'nin toplam karbohidrat içeriği inkübasyonun 4. gününde %71,1 ve %67,8 düzeyinde artırmış, takip eden günlerde benzer düzeylerde belirlenen karbohidrat içerikleri inkübasyonun 12. gününde kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak %35,3 ve %51,1 daha yüksek olarak belirlenmiştir.

C.vulgaris'in toplam protein içeriği borlu bileşik uygulamasına cevapta düşüş sergilemiştir (Şekil 17). Büyütme ortamındaki H_3BO_3 içeriği 25 ve 50 kat artırıldığında inkübasyonun 8. gününde %18,4 ve %31,9 düzeylerinde düşüş kaydedilmiş, takip eden günlerde de benzer durumlar kaydedilmiş, inkübasyonun 24. gününde kontrol grubuna kıyasla mikroalgin toplam protein içeriği sırasıyla yaklaşık %22,2 ve %24,6 düzeylerinde daha düşük olarak belirlenmiştir. Yine Kolemanit ve Uleksit uygulamaları da bu mikroalgin toplam protein içeriğinde düşüşe sebep olmuştur. Kolemanit uygulaması *C.vulgaris*'in toplam protein içeriğinde yaklaşık olarak %24,8-%36,6 düzeylerinde azalmaya sebep olmuştur. Öte yandan 0,93mM Uleksit uygulanan *C.vulgaris*'in inkübasyonun 8. gününde sebep olduğu yaklaşık %17,9 oranındaki düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Son olarak 1.85mM Uleksit uygulanan *C.vulgaris*'in toplam protein içeriği inkübasyonun 8. gününden itibaren yaklaşık olarak %30,8-%33,7 düzeylerinde daha düşük olarak belirlenmiştir.

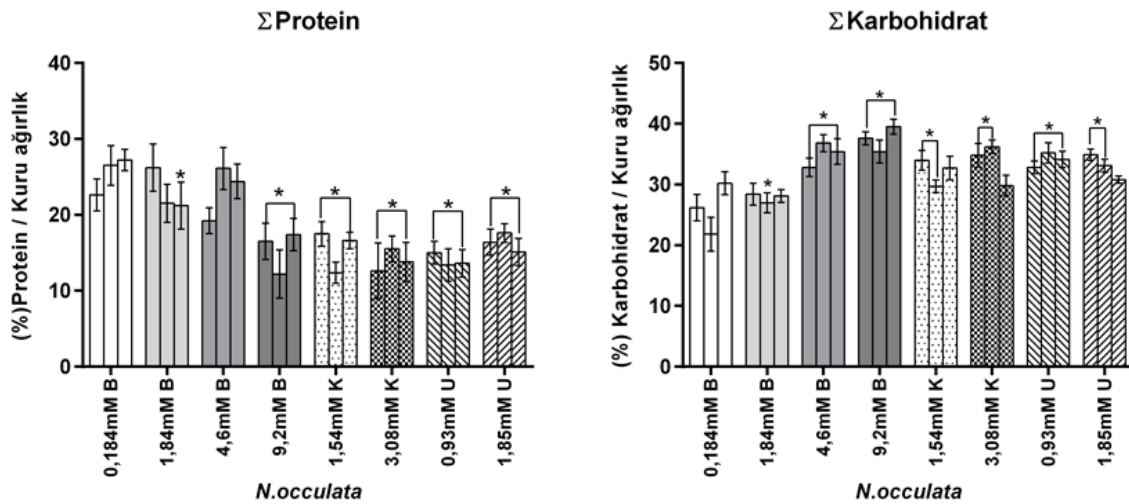


Şekil 17. *C.vulgaris*'in toplam protein ve karbohidrat üretimi üzerine borlu bileşiklerin etkileri. Aynı gruptaki kolonlar sırasıyla 8. 16. ve 24. günlerde alınan ölçüm sonuçlarını gösterir. (*) ile işaretlenmiş değerler kontrol grubuna göre en az %95 güven aralığında farklı olduğunu gösterir.

C.vulgaris'in toplam karbohidrat içeriği borlu bileşik uygulamasına cevapta artış sergilemiştir (Şekil 17). Ortam H_3BO_3 yoğunluğu artırıldığında toplam karbohidrat içeriğindeki artış zamana bağlı olarak da süreklilik göstermiştir. Ortamdaki H_3BO_3 yoğunluğu 10, 25 ve 50 kat artırıldığında inkübasyonun 24. gününde sırasıyla %30,5,

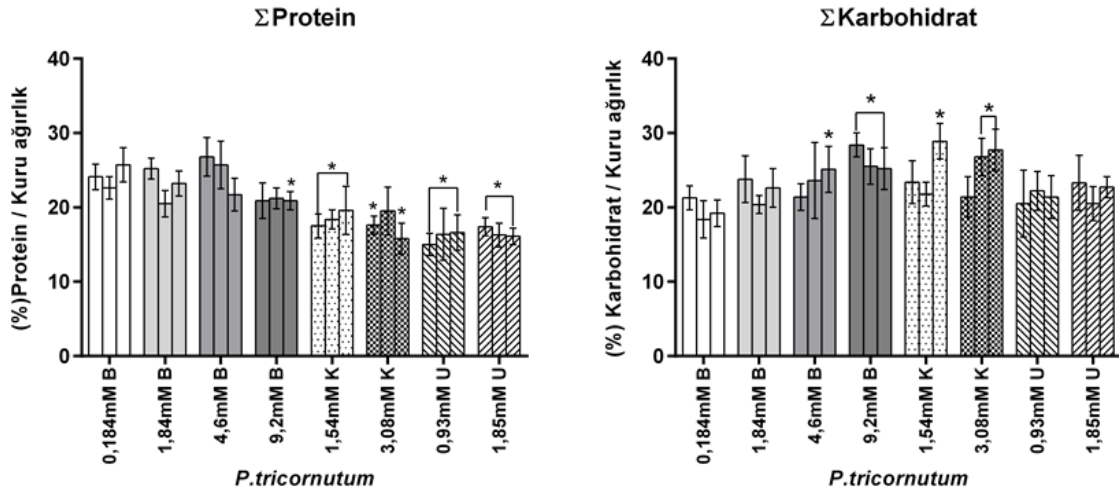
%60,2 ve %53,5 düzeylerinde artış kaydedilmiştir. *C.vulgaris*'in büyüme ortamına 1,54mM ve 3,08mM konsantrasyonlarında Kolemanit uygulandığında inkübasyonun 8. gününde sırasıyla %41,5 ve %29,2 düzeylerinde artış kaydedilmiş, takip eden günlerde de artış sürmüş ve inkübasyonun 24. gününde sırasıyla %82,3 ve %56,6 düzeyinde artış kaydedilmiştir. Son olarak 0,93mM ve 1,85mM Uleksit uygulaması inkübasyonun ilk günlerinde önemli bir değişime sebep olmamış, ancak inkübasyon süresi uzadıkça karbohidrat içeriğinde artışa sebep olmuş, inkübasyonun 24. gününde *C.vulgaris*'in toplam karbohidrat içeriği 0,184mM H₃BO₃ uygulanan kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %40,7 ve %50,8 düzeyinde artışa sebep olmuştur.

N.oculata'nın toplam protein içeriği ortam H₃BO₃ yoğunluğu 50 kat artırıldığında inkübasyonun 6. gününde yaklaşık %26,9 düzeyinde azalmış ve takip eden günlerde de benzer durum kaydedilmiştir (Şekil 18). Diğer taraftan Uleksit ve Kolemanit uygulamalarında da benzer şekilde *N.oculata*'nın toplam protein içeriği ilk günlerden itibaren yaklaşık %23,5 ile %50,1 arasında düşmüştür. Bu mikroalge borlu bileşikler uygulandığında lipid üretiminde kayda değer bir değişim belirlenmese de toplam karbohidrat içeriği önemli oranda artmıştır. Büyüme ortamındaki H₃BO₃ yoğunluğu 25 ve 50 kat artırılan *N.oculata*'nın toplam karbohidrat içeriği inkübasyonun 6. gününde yaklaşık %25,4 ve %43,5 düzeylerinde artmış takip eden günlerde de benzer şekilde yüksek belirlenen toplam karbohidrat içeriği inkübasyonun 18. gününde sırasıyla %17,2 ve %30,8 daha yüksek düzeyde belirlenmiştir. Kolemanit ve Uleksit uygulanan *N.oculata*'nın toplam karbohidrat içeriği ilk günlerde artış göstermiştir. Kolemanit ve Uleksit uygulanan *N.oculata*'da inkübasyonun 6. gününde ortalama %30 düzeylerinde artış kaydedilmiştir (Şekil 18).



Şekil 18. *N.oculata*'nın toplam protein ve karbohidrat üretimi üzerine borlu bileşiklerin etkileri. Aynı gruptaki kolonlar sırasıyla 6., 12. ve 18. günlerde alınan ölçüm sonuçlarını gösterir. (*) ile işaretlenmiş değerler kontrol grubuna göre en az %95 güven aralığında farklı olduğunu gösterir.

P.tricornutum'un toplam protein içeriği artan H_3BO_3 yoğunluğunda dikkate değer bir değişim sergilememiştir (Şekil 19). Yalnızca ortam H_3BO_3 yoğunluğu 50 kat artırıldığında inkübasyonun 18. gününde gözlemlenen %18,6 düzeyindeki düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bununla birlikte Kolemanit ve Uleksit uygulaması bu mikroalgin toplam protein içeriğinde %23,5-%38,6 düzeylerinde azalmaya sebep olmuştur. Ortam H_3BO_3 yoğunluğu 50 kat artırıldığında bu mikroalgin toplam karbohidrat içeriği ilk günlerden itibaren artmış, inkübasyonun 6. gününden itibaren ortalama %30 düzeyinde artış kaydedilmiştir. Kolemanit uygulanan mikroalglerin toplam karbohidrat içeriği ilk günlerde değişmemiş, inkübasyon süresinin uzaması ile birlikte %50,4'e varan düzeyde anlamlı artışlar kaydedilmiştir. Son olarak Uleksit uygulanan *P.tricornutum*'da toplam karbohidrat içeriği dikkate değer oranda değişiklik sergilememiştir (Şekil 19).



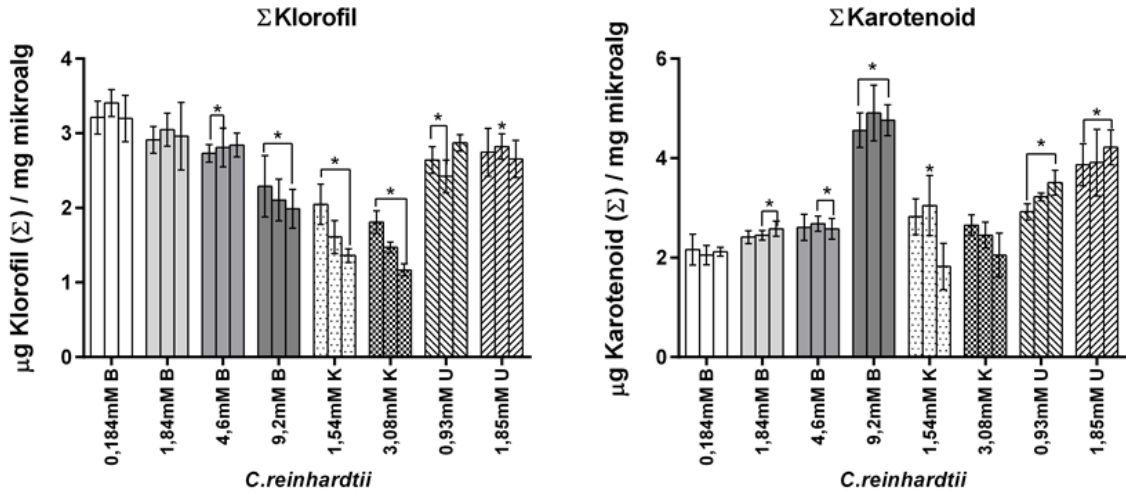
Şekil 19. *P.tricornutum*'un toplam protein ve karbohidrat üretimi üzerine borlu bileşiklerin etkileri. Aynı gruptaki kolonlar sırasıyla 6., 12. ve 18. günlerde alınan ölçüm sonuçlarını gösterir. (*) ile işaretlenmiş değerler kontrol grubuna göre en az %95 güven aralığında farklı olduğunu gösterir.

4.7.Mikroalglerin toplam klorofil ve karotenoid içeriklerinde meydana gelen değişimler

Proje kapsamında ölçmeyi planladığımız mikroalglerin fotosentez hızlarını yansıtabilecek olan net oksijen tüketim değerlerinin analizi laboratuvarımızda bulunan Hansatech (Oxytherm) marka oksijen elektrot sisteminin elektrotları zarar gördüğünden sağlıklı veri alınamamıştır. Ancak mikroalglerin toplam klorofil ve karotenoid içeriğindeki değişimler belirlenmiştir.

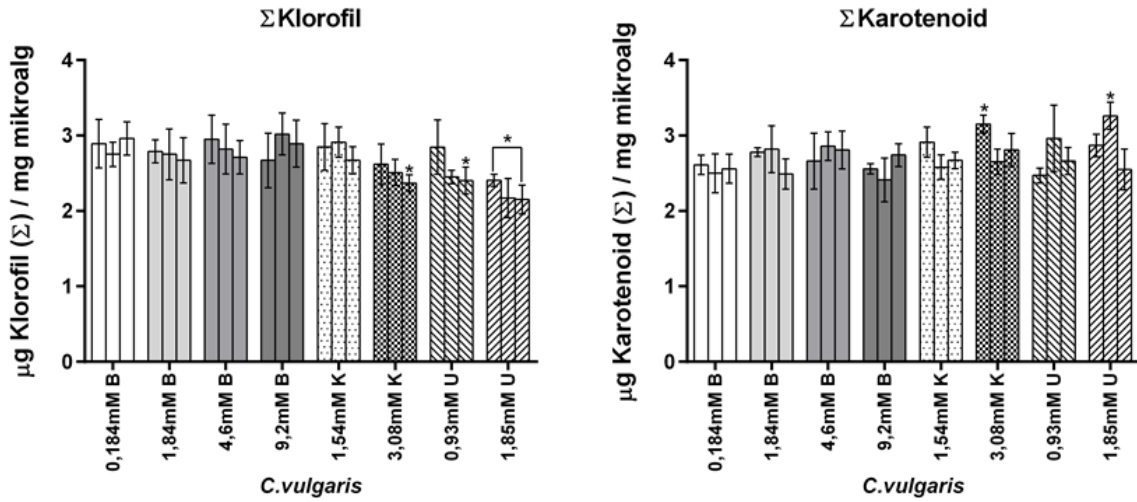
C.reinhardtii'nin toplam klorofil içeriği büyütme ortamındaki H_3BO_3 yoğunluğu 10 kat artırıldığında önemli bir değişiklik sergilemese de H_3BO_3 yoğunluğu 25 ve 50 kat artırıldığında inkübasyonun 4. gününde yaklaşık %15,1 ve %28,7 düzeyinde azalma kaydedilmiş, özellikle 50 kat yüksek konsantrasyonda H_3BO_3 uygulaması ile toplam klorofil içeriğindeki düşüş sürmüştür ve inkübasyonun 12. gününde kontrol grubuna kıyasla bu grup mikroalglerin toplam klorofil içeriği yaklaşık olarak %37,8 oranında azalma göstermiştir (Şekil 20). *C.reinhardtii*'nin toplam klorofil içeriğinde en sert düşüşü Kolemanit uygulaması tetiklemiştir. Bu mikroalgin büyüme ortamına 1,54mM ve 3,08mM Kolemanit uygulandığında toplam klorofil içeriği inkübasyonun 4. gününde sırasıyla %36,2 ve %43,6 oranında, 12. gününde de yaklaşık %57,4 ve %63,6 oranında daha düşük düzeyde belirlenmiştir. Son olarak Uleksit uygulanan *C.reinhardtii*'nin toplam klorofil içeriği ilk günlerde azalma gösterse de inkübasyon süresinin uzamasıyla birlikte gözlenen farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

C.reinhardtii'nin toplam karotenoid üretimi ortam H_3BO_3 yoğunluğundaki artışa paralel olarak yükselmiştir. Ortam H_3BO_3 yoğunluğu 1,84mM ve 4,6mM'a çıkarıldığında ilk günlerde önemli bir değişim gözlenmese de inkübasyonun 8. gününde sırasıyla %19,5 ve %30,7 düzeyinde inkübasyonun 12. gününde de %21,6 ve %21,7 düzeyinde artışlar belirlenmiştir (Şekil 20). Ortam H_3BO_3 yoğunluğu 9.2mM'a yükseltildiğinde inkübasyonun ilk günlerinden itibaren çok önemli düzeyde artışlar kaydedilmiştir. Öyle ki inkübasyonun 4., 8. ve 12. günlerinde sırasıyla yaklaşık %111,2, %139,5 ve %124,4 düzeylerinde artışlar kaydedilmiştir. Diğer taraftan Kolemanit uygulaması bu mikroalgin toplam karotenoid içeriğinde sürekli bir değişikliğe sebep olmamışken 0,93mM ve 1,85mM Uleksit uygulanan *C.reinhardtii*'nin toplam karotenoid içeriği inkübasyonun 4. gününde %35,2 ve %79,2 düzeyinde artmış bu artış süreklilik göstermiş ve inkübasyonun 12. gününde sırasıyla yaklaşık %65,6 ve %98,4 düzeylerinde artışlar kaydedilmiştir.



Şekil 20. *C.reinhardtii*'nin toplam klorofil ve karotenoid içeriğine borlu bileşiklerin etkileri. Aynı gruptaki kolonlar sırasıyla 4., 8. ve 12. günlerde alınan ölçüm sonuçlarını gösterir. (*) ile işaretlenmiş değerler kontrol grubuna göre en az %95 güven aralığında farklı olduğunu gösterir.

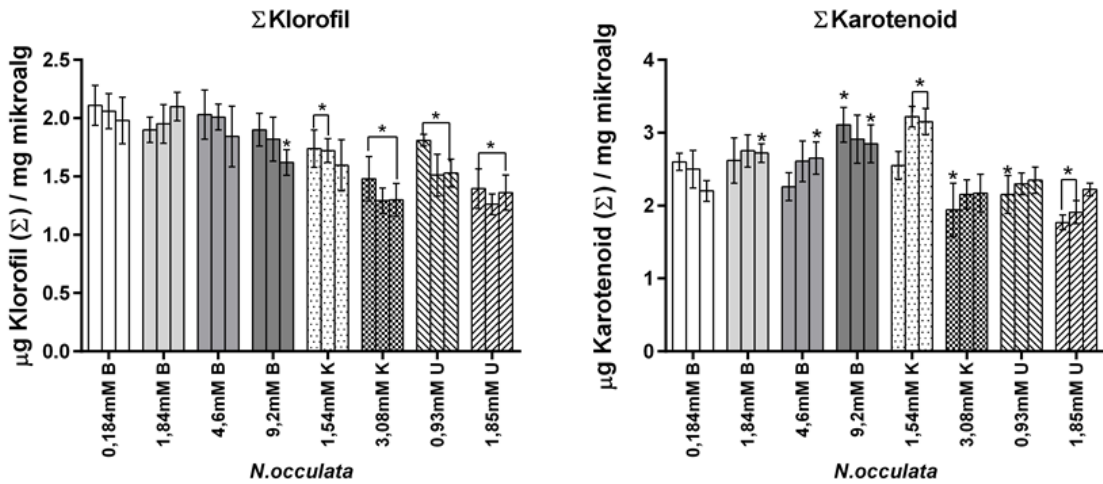
C.vulgaris'in toplam klorofil ve karotenoid içeriği ortam H_3BO_3 yoğunluğundaki artışa cevapta önemli bir değişim sergilememiştir (Şekil 21). Diğer taraftan bu mikroalgin büyüme ortamına 1,54mM Kolemanit uygulandığında yine toplam klorofil ve karotenoid içeriğinde önemli bir değişim görülme de kolemanit yoğunluğu iki katına çıkarıldığında ancak inkübasyonun 24. gününde toplam klorofil içeriğinde istatistiksel olarak önemli bir azalma belirlenmiştir. Son olarak 1,85mM Uleksit uygulanan *C.vulgaris*'in toplam klorofil içeriği inkübasyonun 8., 16. ve 24. günlerinde %16,8, %21,1 ve %27,4 düzeylerinde azalma gösterse de toplam karotenoid içeriğinde istatistiksel olarak anlamlı sayılabilecek sürekli bir değişim belirlenmemiştir.



Şekil 21. *C.vulgaris*'in toplam klorofil ve karotenoid içeriğine borlu bileşiklerin etkileri. Aynı gruptaki kolonlar sırasıyla 8., 16. ve 24. günlerde alınan ölçüm sonuçlarını gösterir. (*) ile işaretlenmiş değerler kontrol grubuna göre en az %95 güven aralığında farklı olduğunu gösterir.

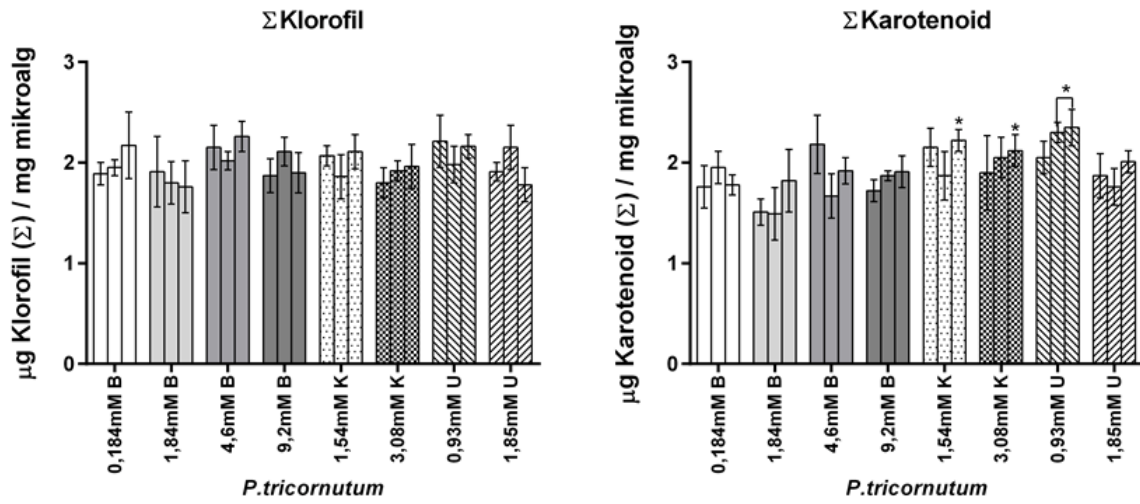
N.oculata'nın toplam klorofil içeriği ortam H_3BO_3 yoğunluğundaki artışa cevapta çok önemli bir değişim sergilemese de ortam H_3BO_3 yoğunluğu 9,2mM'a çıkarıldığında toplam klorofil içeriğindeki azalma inkübasyonun 18. gününde anlamlı bulunmuştur (Şekil 22). Diğer taraftan büyüme ortamına 1,54mM Kolemanit uygulanan *C.vulgaris*'in toplam klorofil içeriği inkübasyonun ilk 12 gününde ortalama %17 düzeylerinde azalmıştır. Kolemanit yoğunluğu iki katına çıkarıldığında toplam klorofil içeriği inkübasyonun 6. gününde %29,8 düzeyinde azalmış, takip eden günlerde de benzer durum kaydedilmiş, inkübasyonun 24. gününde yaklaşık %34,3 düzeyinde azalma belirlenmiştir. Son olarak sırasıyla 0,93mM ve 1,85mM Uleksit uygulanan *N.oculata*'nın toplam klorofil içeriği inkübasyonun 6. gününde %14,2 ve %33,8 düzeylerinde azalmışken takip eden günlerde durum değişmemiş, inkübasyonun 18. gününde sırasıyla yaklaşık %22,7 ve %31,3 düzeylerinde azalmalar kaydedilmiştir.

N.oculata'nın toplam karotenoid içeriği ortam H_3BO_3 yoğunluğu 10, 25 ve 50 kat artırıldığında inkübasyonun 18. gününde sırasıyla yaklaşık olarak %23,6, %20,5 ve %29,6 oranında artmıştır (Şekil 22). Bu mikroalgin büyüme ortamına 1,54mM Kolemanit ilave edildiğinde ilk günlerinde önemli bir değişim olmasa da inkübasyonun 12. ve 18. günlerinde ortalama %28,8 ve %43,2 oranında artış kaydedilmiştir. Bununla birlikte büyüme ortamına ilave edilen Kolemanit yoğunluğu iki katına çıkarıldığında ya da Uleksit ilave edildiğinde inkübasyonun ilk günlerinde *N.oculata*'nın toplam karotenoid üretimi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır.



Şekil 22. *N.oculata*'nın toplam klorofil ve karotenoid içeriğine borlu bileşiklerin etkileri. Aynı gruptaki kolonlar sırasıyla 6., 12. ve 18. günlerde alınan ölçüm sonuçlarını gösterir. (*) ile işaretlenmiş değerler kontrol grubuna göre en az %95 güven aralığında farklı olduğunu gösterir.

P.tricornutum'un toplam klorofil içeriği artan konsantrasyonlarda uygulanan borlu bileşiklere cevapta önemli bir değişim sergilememiştir (Şekil 23). Diğer taraftan bu mikroalgin toplam karotenoid içeriği ortam H_3BO_3 yoğunluğundaki artışa cevapta önemli bir değişim sergilememiş, Kolemanit uygulanan mikroalglerde toplam karotenoid içeriğindeki artış inkübasyonun 18. gününde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Son olarak 0,93mM Uleksit uygulanan *P.tricornutum*'un toplam karotenoid içeriğindeki artışlar inkübasyonun 12. ve 18. günlerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunsada ortam Uleksit yoğunluğu iki katına çıkarıldığında kayda değer bir değişim belirlenememiştir.



Şekil 23. *P.tricornutum*'un toplam klorofil ve karotenoid içeriğine borlu bileşiklerin etkileri. Aynı gruptaki kolonlar sırasıyla 6., 12. ve 18. günlerde alınan ölçüm sonuçlarını gösterir. (*) ile işaretlenmiş değerler kontrol grubuna göre en az %95 güven aralığında farklı olduğunu gösterir.

5. SONUÇLAR

Bor (B) bütün bitkisel organizmaların büyüme ve gelişimi için gerekli bir elementtir. Fotosentez yapan mikroskobik canlılar olan mikroalglerin birçoğunun büyüme ortamlarında da B elementi kullanılmaktadır. Bu projede çeşitli bor bileşiklerinin bazı mikroalglerin büyümeleri ve biyodizel hammaddesi olarak kullanılan triaçilgliserol (TAG) üretimleri üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bununla birlikte büyümede en az baskılanma ile nötral lipid içeriğinde en fazla artışın kaydedildiği Bor konsantrasyonlarını belirleyerek Bor elementinin ve borlu bileşiklerin mikroalglerin biyodizel hammaddesi olarak kullanılan TAG içeriklerinin artırılmasında kullanılabilirliğinin tanımlanması hedeflenmiştir.

Bu amaçla, proje kapsamında biyoteknolojik açıdan literatürde önemi yer tutan tatlı su mikroalgleri *C. reinhardtii* ve *C.vulgaris* ile denizel mikroalg *N.oculata* ve diyatom *P.tricornutum* türünün yanında bir de siyanobakteri *Synechocystis* sp. türleri çalışmaya tabi tutulmuştur. Genel olarak mikroalglerin ürettikleri depo metaboliti olarak rol oynayan nötral lipid üretimindeki artış büyümedeki baskılanma ile doğru orantılı olduğu bildirilmiştir (Sharma vd., 2012) nötral lipid üretimi için uygulanacak boron yoğunluğunun belirlenmesi amacıyla mikroalglerin büyüme ortamlarına artan konsantrasyonlarda H_3BO_3 uygulanmış ve büyümelerindeki değişim takip edilmiştir. Yapılan çalışmada elde edilen büyüme verileri sonrası *Synechocystis* sp. siyanobakterisi için A+ büyüme ortamında kullanılan H_3BO_3 konsantrasyonlarının dışında diğer mikroalgler için TAP ortamında kullanılmış olan 0,184mM H_3BO_3 yoğunluğu referans H_3BO_3 yoğunluğu olarak kullanılmış, Uleksit ve kolemanit bileşiklerinin uygulama konsantrasyonları da 0,184mM H_3BO_3 de bulunan Bor elementi yoğunluğuna göre hesaplanarak uygulanmıştır. Bu durumda yapılan hesaplama sonucunda 0,184mM H_3BO_3 kullanıldığında çözeltideki Bor element miktarı 2mg/L olarak hesaplanmış, Kolemanit ($CaB_3O_4(OH)_3H_2O$) ve Uleksit ($NaCaB_5O_9 \cdot 8H_2O$) konsantrasyonları da içerdikleri Bor element miktarına göre belirlenmiş ve bileşikteki Bor elementi yoğunluğuna göre 25x ve 50x konsantrasyonda uygulanmıştır. Böylece, borlu bileşik konsantrasyonları için mikroalglerde ortam H_3BO_3 yoğunluğu 0,184mM uygulanan grup kontrol grubu olarak kullanılmış, deney grupları da Tablo 1’de gösterildiği gibi 1,84mM H_3BO_3 , 4,6mM H_3BO_3 , 9,2mM H_3BO_3 , 1,54mM ve 3,08mM Kolemanit ile 0,93mM ve 1,85mM Uleksit uygulanan mikroalg grupları şeklinde sınıflandırılmıştır. *Synechocystis* sp.’nin normal olarak büyüme ortamında 0,554mM H_3BO_3 kullanıldığından deney grupları da diğer mikroalglerle uygulanan konsantrasyonların üç katı olarak uygulanmıştır.

Synechocystis sp.’nin büyümesi ortam H_3BO_3 yoğunluğundaki artışa cevapta önemli oranda baskılanmış, yüksek konsantrasyonda Kolemanit ve özellikle Uleksit uygulamaları

bu siyanobakterinin büyümesini durdurmuştur. Diğer taraftan bu siyanobakterinin toplam lipid üretimi belirlenemediği gibi TAG ve nötral lipid üretiminde de bir değişim kaydedilmemiştir. Bu sebeple, bu aşamadan sonra bu siyanobakteri proje kapsamında artık değerlendirilmemiş, çalışmaya konu olan diğer mikroalgler kullanılarak takip eden analizler gerçekleştirilmiştir.

Yapılan çalışmada artan konsantrasyonlarda H_3BO_3 ve Uleksit uygulaması *C.reinhardtii*'nin büyümesinde bir miktar baskılanmaya sebep olsa Kolemanit uygulamasının bu mikroalgin büyümesini ilk günlerden itibaren çok önemli düzeyde baskıladığı anlaşılmıştır. Diğer taraftan artan H_3BO_3 yoğunluğu ve Kolemanit uygulamasına cevapta toplam lipid, nötral lipid ve TAG üretiminde kayda değer artışlar belirlenmiş, Uleksit uygulanan gruplarda önemli bir değişim kaydedilmemiştir. Nitekim sitoplazmik lipid cisimlerinin floresans görüntülenmesi ile elde edilen veriler de bu bulguları desteklemiştir. Bu mikroalgden ekstrakte edilen lipidlerin transesterifikasyonu ile gerçekleştirilen YAME analiz sonuçlarından *C.reinhardtii*'nin düşük ÇDYA içeriği ile Avrupa birliği EN 14214 standartlarına uygun nitelikte biyodizel hammaddesi üretebileceği anlaşılmış, uygulanan borlu bileşikler ile artırılan lipid üretiminde ÇDYA içeriği %30'un altında olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte artan konsantrasyonlarda borlu bileşikler uygulanan *C.reinhardtii*'nin toplam protein içeriği önemli düzeyde azalmış buna karşın artan H_3BO_3 yoğunluğu ve Uleksit uygulamasına cevapta toplam karbohidrat üretimi de kayda değer düzeyde artışlar sergilemiştir. Böylece Uleksit uygulanan *C.reinhardtii*'nin lipid üretiminde önemli bir değişim görülmemesine karşın karbohidrat üretimini artırdığı, buna karşın artan H_3BO_3 uygulamasının lipid üretimindeki artışla birlikte toplam karbohidrat üretimini de artırdığı kaydedilmiştir. Böylece yapılabilecek daha detaylı çalışmalar için uygun türlere biyoetanol gibi karbohidrat temelli ürün üretimi amacıyla kullanılabileceği değerlendirilmiştir. Son olarak borlu bileşik uygulanan *C.reinhardtii*'de toplam protein üretimi ve büyümedeki baskılanmadaki azalmayı toplam klorofil üretimindeki azalma da takip etmiştir. Buna karşın toplam karotenoid üretimi de artmıştır. Mikroalglerde artan karotenoid üretiminin fotosentetik aygıtın zarar görmesine karşı geliştirilen savunma mekanizmasının önemli bir kısmını oluşturduğu bildirilmiştir (Ledford ve Niyogi, 2005).

C.vulgaris'in büyümesinde ortam H_3BO_3 yoğunluğundaki artışa cevapta önemli bir değişim kaydedilmemiştir. Bununla birlikte özellikle yüksek konsantrasyonlarda Kolemanit ve Uleksit uygulamaları bu mikroalgin büyümesini baskılamıştır. Buna karşın artan konsantrasyonlarda uygulanan bütün borlu bileşikler bu mikroalgin sentezlediği TAG ve nötral lipid üretiminde artışa sebep olmuştur. Özellikle toplam lipid üretimindeki artış

Kolemanit ve Uleksit uygulanan mikroalglerde önemli düzeyde belirlenmiştir. Yine sitoplazmik lipid cisimlerinin floresans boyaması ile elde edilen görüntüler bu artışları doğrular niteliktedir. Bununla birlikte YAME analizi ile elde edilen veriler borlu bileşik uygulanan *C.vulgaris*'in ÇDYA içeriğinde azalma ile lipid üretiminde artışı tetiklediği anlaşılmaktadır ki bu durum *C.vulgaris*'ten biyodizel hammaddesi üretimi için borlu bileşik uygulamasını avantajlı kılmaktadır. *C.vulgaris*'in toplam protein üretimi artan konsantrasyonlarda borlu bileşik uygulamasına cevapta azalmış, buna karşın toplam karbohidrat üretiminde de önemli artışları tetiklemiştir. Son olarak bu mikroalgin klorofil içeriği yalnızca yüksek konsantrasyonda Uleksit uygulamasında kararlı düşüş sergilemiş ve yapılan tüm uygulamalarda karotenoid içeriğinde sürekli bir değişim belirlenmemiştir. Dolayısıyla bu mikroalgde depo metabolitleri olarak kullanılabilen lipid ve karbohidrat üretimindeki artışla birlikte büyüme faaliyetlerinde önemli bir baskılanma olmaması kullanılan borlu bileşiklerin metabolik faaliyetlerde kullanılabileceğini akla getirmektedir. Bu yönüyle değerlendirildiğinde borlu bileşiklerin uygulandığı *C.vulgaris*'in genomik, metabolomik ve hatta proteomik analizlerinin yapılması ile yeni biyoteknolojik uygulama alanlarının değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

N.oculata'nın büyüme ortamındaki H_3BO_3 yoğunluğu 25 kata kadar artırıldığında büyümede baskılanma görülmemiş, buna karşın H_3BO_3 yoğunluğundaki 50 kat artış ile Kolemanit ve Uleksit uygulamaları büyümeyi dikkate değer oranda baskılamıştır. Bununla birlikte bu mikroalgin toplam lipid, nötral lipid ve TAG üretiminde ya da YAME içeriğinde artan konsantrasyonlarda borlu bileşik uygulamasına cevapta önemli bir değişim belirlenmemiştir. Diğer taraftan özellikle Kolemanit ve Uleksit uygulanan *N.oculata*'nın toplam protein ve klorofil içeriğinde düşüş görülse de toplam karbohidrat üretimi özellikle inkübasyonun ilk günlerinde artmıştır. Bununla birlikte ortam H_3BO_3 yoğunluğu 25 kata kadar artırıldığında büyümede bir baskılanma ya da lipid üretiminde bir değişiklik olmamakla birlikte hem toplam protein ve klorofil içeriğinde anlamlı bir değişim olmamış ve hem de toplam karbohidrat üretiminde önemli artış olmuştur. Böylece 4,6mM'a kadar artan konsantrasyonlarda borlu bileşik uygulamasının lipid içeriği yüksek olan bu mikroalgin karbohidrat üretiminin de artırıldığı ve bu sayede lipid ekstraksiyonundan arta kalan posanın da sakkarit içeriği yüksek olabileceğinden biyoetanol üretimi için kullanılabilmesi açısından olumlu katkı sağlayabileceği kaydedilmiştir.

P.tricornutum'un büyümesi borlu bileşik uygulamasına cevapta ciddi değişiklikler sergilememiştir. Diğer taraftan yüksek konsantrasyonda Uleksit uygulaması bu mikroalgin lipid üretimini artırsa da diğer uygulamalar TAG, nötral lipid ya da toplam lipid üretimi üzerine sürekli bir değişime sebep olmamıştır. Bununla birlikte bu çalışmada kullanılan

P.tricornutum'un yüksek ÇDYA içeriğine rağmen Kolemanit uygulanan mikroalglerin ÇDYA içeriklerinde kayda değer azalmalar belirlenmiştir. Yine Kolemanit uygulanan *P.tricornutum*'un protein içeriğinde azalmayla birlikte toplam karbohidrat üretiminde artışlar öne çıkan bulgular olarak değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak;

1. Bu araştırma projesinde artan konsantrasyonlarda Borik asit, Kolemanit ve Uleksit uygulamalarına verilen fizyolojik cevaplar kullanılan borlu bileşiğin çeşidi ve projede kullanılan mikroalg türüne bağlı olarak farklılıklar sergilemiştir.
2. *C.vulgaris*'in kültüre alındığı BG-11 ortamındaki H_3BO_3 yoğunluğu son derece düşük ($1\mu M$), *N.oculata* ve *P.tricornutum*'un kültüre alındığı F/2 ortamına da literatürde uygulandığı haliyle Bor elementi ilave edilmemektedir. Diğer taraftan *C.reinhardtii*'nin de kültüre alındığı TAP ortamındaki H_3BO_3 yoğunluğu $0,184mM$ 'dir. Oysa genel manada $4,6mM$ 'a kadar uygulandığında bu mikroalglerin büyümelerinde kaydadeğer bir değişim belirlenmemiştir. Nitekim siyanobakteri *Synechocystis* sp.'in büyüme ortamı olarak literatürde önerilen A+ besiyerindeki H_3BO_3 yoğunluğu $0,554mM$ 'dir. Yüksek yapılı bitkilerin büyümeleri için gerekli olduğu giriş kısmında da belirtildiği gibi çok sayıda çalışma ile belgelenmiş olan bu elementin mikroalg büyüme ortamlarında da kullanımının test edilmesi için çok yönlü çalışmaların faydalı olabileceği değerlendirilmiştir.
3. *C.reinhardtii*'ye artan konsantrasyonlarda borik asit ve kolemanit uygulanması biyodizel hammaddesi olarak kullanılan TAG üretiminde ve YAME içeriğinde olumlu katkılar sağladığı anlaşılmaktadır. Kolemanit uygulamasının sebep olduğu büyümedeki baskılanma dikkate alındığında 4 güne kadar $1,54mM$ konsantrasyonda Kolemanit uygulaması ya da bu **mikroalgin** büyütme ortamındaki Borik asit yoğunluğunun 8 gün boyunca $4,6mM$ 'a çıkarılması *C.reihardtii*'den biyodizel hammaddesi üretimi için bu projeden elde edilen sonuçlara göre en uygun yaklaşımlar olabileceği değerlendirilmiştir.
4. *C.vulgaris*'in büyüme ortamına artan konsantrasyonda borlu bileşikler uygulandığında biyodizel hammaddesi üretimi artmış, YAME içerisindeki ÇDYA oranında da azalma kaydedilmiştir. Bununla birlikte bu çalışmada, $0,93mM$ Uleksit uygulamasının büyümede düşük düzeyde sayılabilecek bir baskılanma ile kısa sürede lipid üretiminde artışı tetiklediği, böylece 8 gün boyunca $0,94mM$ Uleksit uygulamasının *C.vulgaris*'ten biyodizel hammaddesi üretimi için diğer uygulamalara göre daha üstün olduğu değerlendirilmiştir.

5. *N.oculata*'dan biyodizel hammaddesi üretimi üzerine borlu bileşiklerin önemli etkilerinin olmadığı anlaşılmıştır. Ancak 4,6mM'a kadar artan konsantrasyonlarda borlu bileşik uygulamasının lipid içeriği yüksek olan bu mikroalgın karbohidrat üretiminin de artırıldığı, ve bu sayede lipid ekstraksiyonundan arta kalan posanın da sakkarit içeriği yüksek olabileceğinden biyoetanol üretimi için kullanılabilmesi açısından olumlu katkı sağlayabileceği kaydedilmiştir.
6. Bu çalışmada kullanılan *P.tricornutum*'un büyüme ortamına uygulanan Borlu bileşikler diğer mikroalgelere nazaran daha sınırlı etkilere sebep olmuştur. Bununla birlikte 12 gün boyunca Kolemanit uygulanan *P.tricornutum*'un ÇDYA içeriğinde kayda değer azalmalar ile birlikte karbohidrat üretimini de artırdığı belirlenmiştir.

6. KAYNAKLAR

1. AuroraBiofuels, 2010. "How much funding does aurora have?". <https://www.crunchbase.com/funding-round/4a21cf81-7969-5453-3a41-b2180d134148>, Son erişim tarihi: 1 Şubat 2017.
2. Bennett, A., Rowe, R., Soch, N., Eckhert, C. 1999. "Boron stimulates yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) growth", Journal of Nutrition, 129, 2236-2238.
3. Bligh, E.G., Dyer, W.J. 1959. "A rapid method for total lipid extraction and purification", Canadian Journal of Biochemistry and Physiology , 37(8), 911-917.
4. Boyd, C. E. 1970. "Boron Accumulation by Native Algae", The American Midland Naturalist, 84(2), 565-567.
5. Chisti, Y. 2007. "Biodiesel from microalgae", Biotechnology Advances, 25(3), 294-306.
6. Chisti, Y. 2008. "Biodiesel from microalgae beats bioethanol", Trends in biotechnology, 26(3), 126-131.
7. Coyle, W. 2007. "The Future of Biofuels: A Global Perspective", Amber Waves, 5 (5), 24-29.
8. Elsey, D., Jameson, D., Raleigh, B., Cooney, M.J. 2007. " Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids", Journal of Microbiological Methods, 68, 639-642.
9. European Standard EN14214. 2008. "Automotive fuels fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines requirements and test methods", Brussels: European Committee for Standardization, pp. 1-15.
10. Fedorov, A.S., Kosourov, S., Ghirardi, M.L., Seibert, M. 2005. "Continuous H₂ photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii* using a novel two-stage, sulfate-limited chemostat system", Applied Biochemistry and Biotechnology, 121-124, 403-412.
11. Francisco, E.C., Neves, D.B., Jacob-Lopes, E., Franco, T.T. 2010. "Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbondioxide sequestration, lipid production and biofuel quality", Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 85(3), 395-403.
12. Gerloff, G.C. 1968. "The Comparative Boron Nutrition of Several Green and Blue-Green Algae", Physiologia Plantarum, 21, 369-377.
13. Global Bioenergy Industry News."Greenfuel Funds \$13.9M for Algae Farming". <https://www.danforthcenter.org/>, Son erişim tarihi: 3 Mart 2017.
14. Global Bioenergy Industry News. "Danforth Plant Science Center Awarded \$44 Million". <https://www.danforthcenter.org/>, Son erişim tarihi: 7 Şubat 2017.
15. Gouveia, L., A. Oliveira A. 2009." Microalgae as a raw material for biofuels production", Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 36(2), 269-274.
16. Guillard, R.R.L. 1975. "Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates", pp 26-60. In Smith W.L. and Chanley M.H (Eds.) Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum Press, New York, USA.
17. Harris, E.H. 1989. "The Chlamydomonas sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use", San Diego: Academic Press, 780pp.
18. HRBiopetroluem, 2007. "Cellana: The Shell / HR Biopetroluem Joint Venture". <http://cellana.com/>, Son erişim tarihi: 10 Mart 2017.
19. Jeffrey, S.W., Humphrey, G.F. 1975. "New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural

- phytoplankton". Biochem. Physiol. Pflanzen. 167, 191 – 194.
20. Ju, Z. 2011. "Effects of Silicon, Calcium or Boron on Cell Growth and Lipid Accumulation in *Pinnularia gibba* var. *Linearis*", 2nd International Conference on Agricultural and Animal Science, IPCBEE, 22, Singapore: IACSIT Press.
 21. Kim, J. 2004. "Traffic-Related Air Pollution near Busy Roads- The East Bay Children's Respiratory Health Study", American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 170(5), 520-526.
 22. Kot, F. 2009. "Boron sources, speciation and its potential impact on health", Reviews in environmental science and biotechnology, 8, 3-28.
 23. Lanoue, L., Trollinger, D., Strong, P., Keen, C. 2000. "Functional impairments in preimplantation mouse embryos following boron deficiency", Faseb Journal, 14, A539.
 24. Lemarchand, D., Gaillardet, J., Lewin, E., Allegre, C. 2000. "The influence of rivers on marine boron isotopes and implications for reconstructing past ocean pH", Nature, 408, 951.
 25. Ledford, H.K., Niyogi, K.K. 2005. "Singlet oxygen and photooxidative stress management in plants and algae", Plant Cell and Environment, 28, 1037–45.
 26. Mairet, F., Bernard, O., Masci, P., Lacour, T., Sciandra, A. 2011. "Modelling neutral lipid 408 production by the microalga *Isochrysis galbana* under nitrogen limitation", Bioresource Technology, 102,142-149.
 27. Mateo, P. 1987. "Effects of High Boron Concentrations on Nitrate Utilization and Photosynthesis in Blue-green Algae *Anabaena* PCC 7119 and *Anacystis nidulans*", J Plant. Physiol., 128, 161-168.
 28. Mengel, K., Kirkby, E.A. 2001. "Principles of Plant Nutrition", Netherlands:Kluwer Academic Publishers. 849 p.
 29. O'Neill, M., Ishii, T., Albersheim, P., Darvill, A. 2004. "Rhamnogalacturonan II: Structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide", Annual Review of Plant Biology, 55,109.
 30. Pollard, A., Parr, A., Loughman, B. 1977. "Boron in relation to membrane function in higher plants", Journal of Experimental Botany, 28,831-839.
 31. Power, P., Woods, W. 1997. "The chemistry of boron and its speciation in plants", Plant and Soil, 193, 1.
 32. Pulz, O., Gross, W. 2004. "Valuable products from biotechnology of microalgae", Applied Microbiology and Biotechnology, 65(6), 635-648.
 33. Rippka, R., Herdman, M. 1993. "Pasteur culture collection of cyanobacterial strains in Axenic culture", Volum. 1, Catalogue of strains 103pp., Institute Pasteur Paris, France.
 34. Robertson, G., Loughman, B. 1974. "Reversible effects of boron on the absorption and incorporation of phosphate in *Vicia faba* L. ", New Phytologist, 73, 291.
 35. Rose, R., C.L. Rose, S.K. Omi, K.R. Forry, D.M. Durall and W.L. Bigg. 1991. "Starch determination by perchloric acid vs enzymes: evaluating the accuracy and precision of six colorimetric methods", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39, 2–11.
 36. Saraf, S., Thomas, B. 2007. "Influence of feedstock and process chemistry on biodiesel quality", Process Safety and Environmental Protection, 85, 360-364.

37. Sharma, K., Schuhmann, H., Schenk, P., 2012. "High lipid induction in microalgae for biodiesel production", *Energies*, 5(12), 1532–1553.
38. Sheppard, L. 1999. "Effects of ambient air pollution on nonelderly asthma hospital admissions in Seattle Washington, 1987-1994", *Epidemiology*, 10(1), 23-30.
39. Shorrocks, V.M. 1997. "The occurrence and correction of boron deficiency", *Plant and Soil*, 193(1-2), 121-148.
40. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. 1985. "Measurement of protein using bicinchoninic acid", *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76-85.
41. Smyth, D., Dugger, W. 1981. "Cellular-Changes during Boron-Deficient Culture of the Diatom *Cylindrotheca-Fusiformis*", *Physiologia Plantarum*, 51,111.
42. Taştan, B. E. 2012. "Boron bioremoval by a newly isolated *Chlorella* sp. and its stimulation by growth stimulators", *Water Research*, 46(1), 167-175.
43. EPA. 2002. "A Comprehensive Analysis of Biodiesel Impacts on Exhaust Emissions", Draft Technical Report: EPA420-P-02-001; October 2002. <http://www.epa.gov/otaq/models/analysis/biodsl/p02001.pdf>.(accessed 01 August 2012).
44. Xu, Z., Harvey, K., Pavlina, T., Dutot, G., Zaloga, G., Siddiqui, R. 2010. "An Improved Method for Determining Medium- and Long-Chain FAMES Using Gas Chromatography", *Lipids*, 45,199–208.
45. www.hrbp.com, Son erişim tarihi: 10 Şubat 2017.
46. www.solazyme.com, Son erişim tarihi: 10 Şubat 2017.
47. <http://www.turksan.com> Son erişim tarihi: 12 Şubat 2017.
48. Zavřel, T., Sinetova, M. A. and Červený, J. (2015). Measurement of Chlorophyll a and Carotenoids Concentration in Cyanobacteria. *Bio-protocol* 5(9): e1467.
49. Zemke, P., Wood, B., Dye, D. 2010. "Considerations for the maximum production rates of triacylglycerol from microalgae", *Biomass & Bioenergy*, 34, 145.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Dr. ZEYNEP ELİBOL ÇAKMAK
Proje No:	117Y314
Proje Başlığı:	Mikroalgal Biyodizel Üretiminde Bor Kullanımı Üzerine Bir Araştırma
Proje Türü:	1002 - Hızlı Destek
Proje Süresi:	9
Araştırmacılar:	TURGAY ÇAKMAK
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İSTANBUL MEDENİYET Ü.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/03/2018 - 01/03/2019
Onaylanan Bütçe:	29988.0
Harcanan Bütçe:	25990.46
Öz:	Bor (B) bütün bitkisel organizmaların büyüme ve gelişimi için gerekli bir elementtir. Hatta bitki, mantar, maya ve alg kültürlerinde büyüme ortamına ilave edilen ve sürekli bulunması gereken tek yarı-metal B elementidir. Bu projede çeşitli borlu bileşiklerin (Borik asit, Kolemanit ve Uleksit) bazı mikroalglerin büyümeleri ve biyodizel hammaddesi olarak kullanılan triaçilgliserol (TAG) üretimleri üzerine etkileri incelenmiştir. Bununla birlikte büyümede en az baskılanma ile nötral lipid içeriğinde en fazla artışın kaydedildiği B yoğunluklarını belirleyerek B elementinin ve borlu bileşiklerin mikroalglerin biyodizel hammaddesi olarak kullanılan TAG içeriklerinin artırılmasında kullanılabilirliğinin tanımlanması hedeflenmiştir. Bu amaçla, proje kapsamında biyoteknolojik açıdan literatürde önemi yer tutan tatlı su mikroalgleri <i>C. reinhardtii</i> ve <i>C. vulgaris</i> ile denizel mikroalg <i>N. occulata</i> ve diyatom <i>P. tricornutum</i> türünün yanında bir de siyanobakteri <i>Synechocystis</i> sp. türleri çalışmaya tabi tutulmuştur. Yapılan çalışmalar sonucunda artan yoğunluklarda Borik asit, Kolemanit ve Uleksit uygulamalarına verilen fizyolojik cevaplar kullanılan borlu bileşiğin çeşidi ve projede kullanılan mikroalg türüne bağlı olarak farklılıklar sergilediği anlaşılmıştır. Öncelikle artan B yoğunluğunun TAG üretim açısından siyanobakteri <i>Synechocystis</i> sp.?de önemli bir etkisinin olmadığı değerlendirilmiştir. Öte yandan ortam Borik asit yoğunluğu 4.6mM'a kadar çıkarıldığında çalışmada kullanılan mikroalglerin büyümelerinde kaydadeğer bir değişim belirlenmemiştir. Yine artan yoğunluklarda Borlu bileşik uygulamasının genel olarak <i>P. tricornutum</i> ve <i>N. occulata</i>'nın toplam karbohidrat üretiminde artışa sebep olsa da TAG üretiminde kayda değer bir artışı tetiklemediği anlaşılmıştır. <i>C. reinhardtii</i>'ye artan yoğunluklarda Borik asit ve Kolemanit uygulanması biyodizel hammaddesi olarak kullanılan TAG üretiminde ve yağ asidi metil ester (YAME) içeriğinde olumlu katkılar sağladığı anlaşılmaktadır. Kolemanit uygulamasının sebep olduğu büyümedeki baskılanma dikkate alındığında 4 güne kadar 1.54mM yoğunlukta Kolemanit uygulaması ya da bu mikroalg'in büyüme ortamındaki Borik asit yoğunluğunun 8 gün boyunca 4.6mM'a çıkarılması <i>C. reinhardtii</i>'den biyodizel hammaddesi üretimi için bu projeden elde edilen sonuçlara göre en uygun yaklaşımlar olabileceği değerlendirilmiştir. <i>C. vulgaris</i>'in büyüme ortamına artan yoğunlukta borlu bileşikler uygulandığında TAG üretimi artmış, YAME içeriisindeki çoklu doymamış yağ asidi oranında da azalma kaydedilmiştir. Bununla birlikte bu çalışmada, 0.93mM Uleksit uygulamasının büyümede düşük düzeyde sayılabilecek bir baskılanma ile kısa sürede lipid üretiminde artışı tetiklediği, böylece 8 gün boyunca 0.93mM Uleksit uygulamasının <i>C. vulgaris</i>'ten biyodizel hammaddesi üretimi için diğer uygulamalara göre daha üstün olduğu değerlendirilmiştir. Sonuç olarak bu proje kapsamında yapılan çalışmalarda farklı yoğunluklarda uygulanan borlu bileşiklerin <i>C. reinhardtii</i> ve <i>C. vulgaris</i> gibi bazı mikroalglerden biyodizel hammaddesi üretimi amacıyla kullanılabilecek ekonomik ve potansiyel bir yaklaşım olduğu değerlendirilmiştir.
Anahtar Kelimeler:	Biyodizel, Borik asit, Kolemanit, mikroalg, Uleksit
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır