

Doğal Deniz Suyu ve Tuzla Tuzu ile Hazırlanan Ortamlardaki *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann, 1898) Kültürlerinde Işık ve Nutrientlerin Etkileri

Tolga Göksan¹, Yaşar Durmaz¹, Oya Işık², Şevket Gökpınar¹

¹Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, 35100, Bornova, İzmir, Türkiye.

²Çukurova Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Balcalı, Adana, Türkiye.

Abstract: *Effects of light and nutrients on Chaetoceros muelleri (Lemmermann, 1898) cultures prepared with natural seawater and saltern salt.* Marine microalgae is usually cultivated in filtered seawater. There is no doubt that, seawater is an excellent medium for cultivation of marine microalgal species. However, such media may have some drawbacks, i.e., including various contaminants such as bacteria, predators and competitor species. It is also possible to replace natural seawater with synthetic sea water or distilled water prepared with sea salt to reduce the risks of contamination, and in case of having some difficulty in providing seawater. Such application, on the other hand, significantly increases the production costs in large scale cultivation, e.g., tubular and pond systems. Although the cell numbers and chlorophyll amounts in the experimental groups carried on natural sea water were slightly higher, the experiment we did showed that, growth medium prepared with saltern salt, especially in small scale works carried on under laboratory conditions, can successfully be used without having any significant differences when compared to natural sea water. In addition, light played a more effective role in the cultivation of *C. muelleri* rather than the addition of nutrient salts.

Key Words: Light, nutrient, *Chaetoceros muelleri*, natural seawater, saltern salt

Özet: Denizel mikroalgler genellikle filtre edilmiş deniz suyunda kültür edilirler. Şüphesiz ki deniz suyu, denizel mikro-algal türlerin kültürü için mükemmel bir ortamdır. Fakat bu tip ortamlar bakteriler, predatörler ve fırsatçı türler gibi çeşitli kontaminantların da dahil olduğu bazı dezavantajlara sahip olabilir. Ayrıca kontaminasyon risklerini azaltmak için ve deniz suyunun temin edilmesinde bazı zorlukların bulunduğu durumda, doğal deniz suyu yerine sentetik deniz suyu veya deniz tuzu ile hazırlanmış saf su kullanılması da mümkündür. Diğer taraftan bu tip bir uygulama, tübüler ve havuz sistemleri gibi büyük ölçekli üretimlerde üretim masraflarını önemli miktarda artırır. Doğal deniz suyu ile yürütülen gruplardaki hücre sayıları ve klorofil miktarları doğal deniz tuzu eklenmiş saf sudan hafifçe daha yüksek olmasına rağmen, yaptığımız deneme, özellikle laboratuvar koşulları altında yürütülen küçük ölçekli çalışmalarda, tuzla tuzu ile hazırlanan büyüme ortamının doğal deniz suyu ile karşılaştırıldığında herhangi bir önemli farklılığa sahip olmaksızın başarıyla kullanılabileceğini gösterdi. Ayrıca ışık, *C. muelleri*'nin üretiminde besin tuzlarının ilavesinden daha etkili bir role sahip olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Işık, nütriyent, *Chaetoceros muelleri*, doğal deniz suyu, tuzla tuzu

Giriş

Mikroalgler, lipitleri büyük miktarlarda depo edebilen ve bunları doğrudan üretebilme yeteneğine sahip olan az

sayıdaki fotosentetik mikroorganizmalar arasında yeralan tek hücreli bitkilerdir (Neenan ve diğ., 1986). Fototrofik mikroalg kültürlerinde büyümeyi ve biyomas üretimini sınırlayan en önemli

faktör ışığın şiddeti ve süresidir (Richmond, 1996). Yüksek yoğunluklara ulaşan kültürlerde büyüme, hücrelerin ışığı yeterince kullanamaması ve ortamda zamanla biriken hücre dışı salgılar nedeniyle bir platoya ulaşır. Bu neden ile mikroalg kültürlerinde yüksek hücre yoğunluklarına ulaşabilmek için, hücrelerin ışık kullanımını optimize etmenin yolları aranmalıdır. Örneğin, fototrofik mikroorganizmaların yoğun kültürlerinde, ince ışık yoluna sahip biyoreaktörler kullanılmazsa ışık, kültür yüzeyinin sadece çok sınırlı bir kısmına nüfuz edebilir (Richmond ve Zou, 1999) ve sadece yüzeye yakın kısımdaki fotik zon içinde bulunan hücreler ışıktan yararlanabilir. Bir kültürde büyüme ve buna bağlı olarak alansal (*Pa*) ya da hacimsal (*Pv*) çıkış hızları, hücrelerin optimal şekilde ışıktan yararlanmasını etkileyen ışık yolu uzunluğu, yüksek ışık şiddeti nedeni ile oluşan fotoinhibisyon veya artan biyomas konsantrasyonlarına bağlı olarak oluşan ışık sınırlanması gibi faktörlere bağlı olabilir (Göksan ve diğ., 2003)

Diatomlar, zooplankterler (Ahlgren ve diğ., 1990), larval ve post larval safhadaki karidesler (Chu, 1989), kopepodlar (Bourdier ve Amblard, 1989), ve juvenil istridyelerin (Tsitsa-Tzardis ve diğ., 1993) kültürlerinde yararlı lipit kaynakları olarak görülür. Diatomlara verilen bu önem karakteristik olan yüksek lipit ve yağ asit kompozisyonundan, aynı zamanda bazı çok doymamış yağ asitlerinin (PUFAs) bol bulunmasından dolayıdır (Renaud ve Parry, 1994). Diatomların aynı zamanda bir PUFA olan ve çoğu denizel hayvan tarafından sentez edilemeyen eicosapentaenoic acid (EPA)'i bol olarak biriktirdikleri bilinir (Sicko-Goad ve Andresen, 1991; Dunstan ve diğ., 1993).

Denemede kullanılan *Chaetoceros muelleri* Lemmermann, 1898

akuakültürde bazı ticari balık türleri ve özellikle de *Peneaus* sp. gibi krustaseler ile istridye ve tarak gibi bivalv türlerinin gelişimi için çok önemli bir besin kaynağıdır. *C. muelleri*, yukarıda belirtilen türlerin gelişimi için sahip olduğu yağ asitleri profilinden ötürü özel öneme sahiptir [EPA (%5-20), DHA (%0.2-1), ARA (<0.2)]. Ayrıca larvaların beslenmesinde sahip olduğu uygun büyüklük (5-8 µm) de bu türün tercih edilmesinde diğer bir önemli faktördür (Brown ve diğ., 1997).

Bu çalışmada, doğal deniz suyu ve tuzla tuzu ile hazırlanan ortamlarda yapılan kültürlerde, büyüme hızları her iki tipteki ortam bakımından karşılaştırıldı. Ayrıca deney gruplarına, durgunluk safhasına ulaşıldığında zenginleştirilmiş taze ortam ilavesi yapılarak ve bunu takiben ışık şiddeti artırılarak deneme gruplarının büyüme hızlarındaki artışlar izlendi. Bu şekilde nutrient ve ışık faktörlerinden hangisinin *C. muelleri*'nin büyümesi üzerinde daha fazla etkiye sahip olduğu belirlenmeye çalışıldı.

Materyal ve Yöntem

Bu çalışmada, Mikroalgal Biyoteknoloji Laboratuvarındaki (Ben-Gurion University of the Negev-İsrail) kültür koleksiyonundan elde edilen bir deniz diyatomu *C. muelleri* kullanıldı. 500 mL'lik erlenmeyerlerde yürütülen kültür denemeleri, 300 mL ortam ile dolduruldu ve F/2 ile zenginleştirildi.

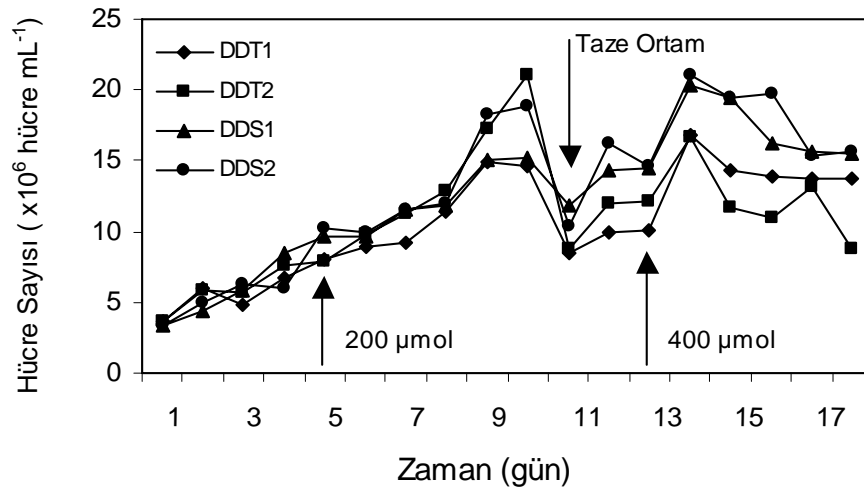
Deney grupları, ikişer adet olmak üzere doğal deniz suyu ve doğal deniz tuzu eklenmiş saf sudan oluşup, her iki tip büyüme ortamı %36 tuzluluğa ayarlandı. Tuzla tuzu olarak Red Sea Salt pHarm ticari isimli, Kızıl Denizden elde edilen doğal bir tuz kullanıldı. Deney gruplarının karıştırılması, %2 oranında CO₂ ile zenginleştirilen hava-CO₂ karışımı ile sağlanıp, ortam sıcaklığı 23±1 °C'de

tutuldu. Aydınlatma, sırasıyla tek taraflı ve her iki taraftan olmak üzere 200 ve 400 μmol foton $\text{m}^{-2}\text{sn}^{-1}$ 'lik şiddetlerde soğuk floresan lambalar ile sağlanmıştır. Deney gruplarındaki gelişimi izlemek için hücreler, Neubauer tip hemasitometre ile ışık mikroskopunda 250x büyütmede rutin olarak sayıldı. Kültürlerde klorofil *a* miktarları HP 845 2A UV Diode Array spektrofotometrede 666 nm dalga boyunda tespit edildi (Hu ve diğ., 1996c).

Bulgular

Eşit miktarda aşılama ile başlatılan deney gruplarında, başlangıç hücre konsantrasyonları yaklaşık olarak aynı idi. Başlangıçta kültürler 200 μmol foton $\text{m}^{-2}\text{sn}^{-1}$ 'lik bir ışık şiddetine maruz bırakıldı ve hücre sayıları deney süresince (9 gün) birbirlerine paralel bir artış gösterdi. 9. günde durgunluk safhasına ulaşan grupların hücre sayıları 10. günden itibaren düşüş gösterdi. Bunun üzerine

her bir kültür grubuna, kültür edildiği zenginleştirilmiş doğal deniz suyu veya tuzla tuzu ortamları eklendi. Ortam ilavesini izleyen gün hücre sayılarında hafif bir artış görülmesine rağmen, 2. günün sonunda bu artışın tekrar durduğu gözlemlendi. Bunun üzerine 13. günde ışık şiddeti 200 μmol foton $\text{m}^{-2}\text{sn}^{-1}$ 'den 400 μmol foton $\text{m}^{-2}\text{sn}^{-1}$ 'ye çıkarıldı. Işık şiddetindeki artışı takiben, hücre sayısında belirgin bir artış gözlemlendi. 14. günde başlayan hücre sayılarındaki düşüş denemenin sonuna kadar devam etti. Fakat burada ortaya çıkan önemli nokta, hücre sayılarının deneme süresince birbirine paralel artmalarının yanında, doğal deniz suyu ile yapılan deneme gruplarındaki hücre sayılarının, tuzla tuzundan oluşan ortamlarla karşılaştırıldığında hafifçe daha yüksek olmalarıydı (Şekil 1). Fakat uygulanan tek yönlü ANOVA bu farkın önemsiz olduğunu gösterdi ($F=0.85 < F_{\text{tablo}}=2.76, P<0.05$).

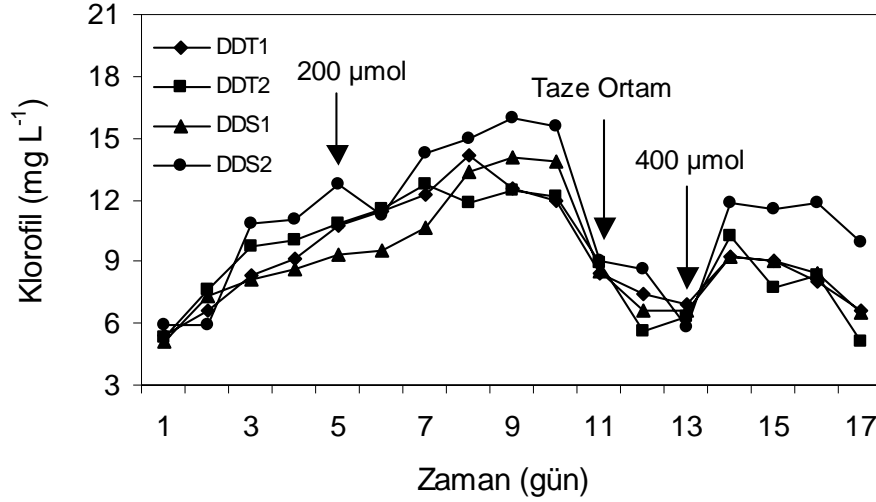


Şekil 1. Doğal deniz suyu ve doğal deniz tuzundan oluşan büyüme ortamlarında 200 ve 400 μmol foton $\text{m}^{-2}\text{sn}^{-1}$ 'lik ışık şiddetleri ve taze ortam eklenmesinin hücre sayısı üzerine etkileri. (DDT: Doğal Deniz Tuzu, DDS: Doğal Deniz Suyu; oklar nütriyent ve ışık ilavelerini gösterir).

Deney gruplarının klorofil *a* incelendiğinde, ilk 8 gün boyunca miktarlarındaki değişimleri gruplardaki klorofil içeriklerinin birbirine

paralel olarak arttığı görüldü. Bu süre sonunda durgunluk safhasına ulaşan kültürlerde iki gün süresince klorofil a miktarları değişmedi ve 10. günden başlayıp, 400 μmol foton m^{-2} sn^{-1} 'lik ışık şiddetinin uygulanmaya başlandığı 13.

güne kadar klorofil a miktarlarında hızlı bir düşüş izlendi. Işık şiddetinin artırılmasıyla klorofil miktarında bir artış görüldü ve hemen bunu bir durgunluk safhası izledi (Şekil 2).



Şekil 2. Doğal deniz suyu ve doğal deniz tuzundan oluşan büyüme ortamlarında 200 ve 400 μmol foton m^{-2} sn^{-1} 'lik ışık şiddetleri ve taze ortam eklenmesinin klorofil içeriği üzerine etkileri. (DDT: Doğal Deniz Tuzu, DDS: Doğal Deniz Suyu; oklar nütriyent ve ışık ilavelerini gösterir).

Deney gruplarında klorofil a miktarlarındaki değişimler ile hücre sayılarındaki değişimler birbirine paralellik gösterdi. Genelde doğal deniz suyu ile yapılan kültür denemelerinde klorofil a miktarları, tuzla tuzu konulan ortamlardakinden daha yüksek olup, bu farkın yapılan tek yönlü ANOVA ile önemsiz olduğu bulundu ($F=1.34 < F_{\text{tablo}}=2.78$, $P<0.05$).

Tartışma ve Sonuç

Deniz suyu her ne kadar alg hücreleri için mükemmel bir büyüme ortamı olarak tanımlansa da bu çalışmada yapılan denemelerin sonuçlarına göre, deniz suyu teminin zor olduğu bölgelerde veya deniz suyundan gelebilecek kontaminasyon

riskinin azaltılmak istendiği akselik kültürler için, doğal deniz tuzu ile hazırlanan ortamların doğal deniz suyunun yerini alabileceği görüldü.

200 μmol foton m^{-2} sn^{-1} 'lik bir ışık şiddetiyle başlatılan deney gruplarında hücre sayısındaki artış 9. güne kadar devam etti ve yüksek hücre yoğunluğuna ulaşan kültürde ortaya çıkan ışığın sınırlayıcı etkisinin bir sonucu olarak, durgunluk safhasına girdi. Bu faktörleri göz önünde bulundurarak ilk olarak kültüre taze ortam ilavesi yapıldı, fakat hücre sayılarında önemli bir artış gözlenmedi (Şekil 1). Bunun üzerine mevcut ışık şiddeti iki katına çıkarılarak, ışığın gelişim üzerindeki etkisi bulunmaya çalışıldı. Şekil 1'den de görülebileceği gibi ışık şiddetinin

arttırılması, hücrelerin gelişimi üzerinde taze ortam ilavesine göre çok daha etkili olmuştur.

Arttırılan ışık şiddetinin kültürler üzerindeki etkisi klorofil/zaman grafiğinde daha açık olarak görülebilmektedir. 11. günde taze ortam ilavesine rağmen hücrelerdeki klorofil içeriğinin, ışık şiddetinin 400 μmol foton m^{-2} sn^{-1} 'ye çıkarılmasına kadar hızla düştüğü görülmektedir. Buna göre *C. muelleri* kültürlerinde ışık tarafından sınırlandırmanın, nütriyent düzeylerinin arttırılmasına göre çok daha önemli olduğu söylenebilir (Şekil 2). Bunun yanında, doğal deniz tuzu ile hazırlanan kültür ortamlarının denizel mikroalglerin üretiminde herhangi bir olumsuzluğa neden olmaksızın (doğal deniz suyuyla karşılaştırıldığında kültürlerde büyümeyi yavaşlatıcı bir etki) başarıyla kullanılabilceği görülmüştür.

Kaynakça

- Ahlgren, G., Lunstedt, L., Brett, M., Forsberg, C., 1990. Lipid composition and food quality of some freshwater phytoplankton for some cladoceran zooplankters. J. Plankton Res. 12: 809-818.
- Bourdier, G.G., Amblard, C.A., 1989. Lipids in *Acanthodiptomus denticornis* during starvation and fed on three different algae. J. Plankton Res. 11: 1201-1212.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K., Dunstan, G.A., 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. Aquaculture 151: 315-331.
- Chu, K.H., 1989. *Chaetoceros gracilis* as the exclusive feed for the larvae and post larvae of the shrimp *Metapenaeus ensis*. Aquaculture 83: 281-287.
- Dunstan, G.A., Volkman, J.K., Barret, S.M., Garland, C.D., 1993. Changes in the lipid composition and maximisation of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. J. Appl. Phycol. 5: 71-83.
- Göksan, T., Durmaz, Y., Gökpinar, Ş. 2003. Effects of light path lengths and initial culture density on the cultivation of *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann, 1898). Aquaculture 217:431-436
- Hu, Q., Guterman, H., Richmond, A., 1996c; Physiological characteristics of *Spirulina platensis* (Cyanobacteria) cultured at ultrahigh cell densities. J. Phycol., 32: 1066-1010.
- Neehan, B., Feinberg, D., Hill, A., McIntosh, R., Terry, K., 1986. Fuels from microalgae: Technology status, potential, and research requirements. Publ. No. SERI/SP-231-2550, Solar Energy Research Institute, Golden, CO, 149 pp.
- Renaud, S.M., Parry, D.I., 1994. Microalgae for use in tropical aquaculture II: Effect of salinity on growth, gross chemical composition and fatty acid composition of three species of marine microalgae. J. Appl. Phycol. 6: 347-356.
- Richmond, A., 1996; Efficient utilization of high irradiance for production of photoautotrophic cell mass: A survey. J. appl. Phycol. 8: 381-387.
- Richmond, A., Zou, N., 1999; Efficient utilisation of high photon irradiance for mass production of photoautotrophic micro-organisms. J. appl. Phycol. 11:123-127.
- Sicko-Goad, I., Andresen, N.A., 1991. Effect of growth and light/dark cycles on diatom lipid content and composition. J. Phycol. 27: 710-718.
- Tsitsa-Tzardis, E., Patterson, G.W., Wikfors, G.H., Gladu, P.K., Harrison, D., 1993. Sterols of *Chaetoceros* and *Skeletonema*. Lipids 28: 465-467.