

Dunaliella salina (Dunal) Teodoresco (Chlorophyceae) Büyümesi Üzerine Tuz Derişimlerinin Etkileri

*Yaşar Durmaz, Şevket Gökçınar

Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, 35100, İzmir, Türkiye
*E mail: yasar.durmaz@ege.edu.tr

Abstract: Effects of salinity concentrations on growth *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco (Chlorophyceae). *Dunaliella salina* is able to accumulate high concentration of β -carotene when it is cultured under certain stress condition such as high salinity, light illumination and nitrogen starvation. Since *D. salina* can tolerate high salinity concentrations, they are able to adapt to extremely saline environments such as salt lakes. In this study, water samples were collected from reddish areas at Konya Salt Lake. *Dunaliella salina* cells were recognized under the microscope. After isolation of the cells by using dilution technique, cells were cultured at the laboratory conditions. By addition of NaCl, 0.62M, 0.85M, 1.28M ve 1.71M salinity levels were obtained. The algal cells were cultured in AS100 medium in 500 ml erlenmeyer flasks at $20 \pm 1^\circ\text{C}$ and under continuous illumination at $100 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$. During the experiment, it was observed that *D. salina* grows very well even at the high salinity levels. For example, density of alga cells reached up to 5.87×10^6 cells ml^{-1} at 1.71 M salinity level where total β -carotene was calculated as $9.80 \pm 0.25 \text{ mg g}^{-1}$ of total dry weight. From the results of this study, it was concluded that *D. salina* isolated from Konya Salt Lake, able to tolerate high salinity levels and it can continue to grow well even at very high salinity concentrations.

Key Words: *Dunaliella salina*, salinity, nutrient medium, NaCl concentration.

Özet: *Dunaliella salina*, yüksek tuzluluk, yüksek ışık şiddeti ve azot eksikliği gibi bazı stres koşulları altında kültüre edildiğinde hücre içinde β -karoten biriktirebilen Chlorophyceae sınıfına ait bir alg türüdür. Yüksek tuzlulukları tolere edebilen *D. salina* gibi türler belli bir bölgeye ve çevre koşullarına adapte olmuş halde yaşar. Bu araştırma kapsamında Konya Tuz Gölü'nde yapılan incelemelerde, tuz parsellerinde kırmızılıklar şeklinde görülen alanlardan alınan örneklerdeki alg hücrelerinin mikroskopta tür tanımları yapıldıktan sonra *D. salina* olarak tanımlanan hücreler seyreltme yöntemi ile izole edilerek kültüre alınmıştır. Laboratuvarında NaCl ilave edilerek, 0.62M, 0.85M, 1.28M ve 1.71M tuz derişimleri hazırlanmış, 500 ml'lik erlenmeyer flaklarında, AS100 ortamında, $100 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde sürekli aydınlatma ile $20 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklıkta kültürleri yapıldı. *D. salina*'nın yüksek tuzluluk konsantrasyonlarında gelişimini sürdürdüğü gözlemlendi. En yüksek hücre konsantrasyonu 1.71 M NaCl'de 5.87×10^6 hücre ml^{-1} ulaştı. 1.71M NaCl konsantrasyonunda yapılan kültürlerden alınan örneklerde toplam karoten $9.80 \pm 0.25 \text{ mg g}^{-1}$ kuru ağırlık tespit edildi. Bu çalışmada Tuz Gölünden izole edilen *D. salina* türünün yüksek tuzluluk konsantrasyonlarına dayanıklı olduğu ve hatta gelişimini sürdürdüğü tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: *Dunaliella salina*, tuzluluk, besin ortamı, NaCl konsantrasyonu.

Giriş

Mikroskobik algler akuatik ekosistemde biyolojik ve ekolojik rollerinin yanı sıra gerek insan sağlığı gerekse akuakültürde yetiştiriciliği yapılan canlıların beslenmesi açısından önemli maddeler içerir. Kontrollü koşullar altında alglerin yoğun üretimi yapılarak, içerdikleri pigmentler, proteinler, vitaminler ve minerallerden ötürü karasal ve sucul canlıların beslenmesinde (Koray, 2002), toz yem ve canlı yem üretiminde, suların arıtılmasında, gıda endüstrisinde ve gübre kaynağı olarak faydalanılır (Borowitzka ve Borowitzka 1992). *D. salina* ekstraselüler gliserol salgılaması, hücre içinde beta-karoten biriktirmesi ve yüksek protein içeriği bakımından önemli bir organizmadır. Salgılanan gliserol düzeyi ortamdaki tuz konsantrasyonu ile ilgilidir. 3 M NaCl gibi yüksek tuz konsantrasyonunda % 40 oranında gliserol bulunur (Ben-Amotz ve Avron, 1980).

D. salina (Chlorophyceae) hücreler $9-16 \times 5-9 \mu\text{m}$ büyüklüğünde, dairesel ve elipsoid yapıda lateralden ve dipten basılmış hücreler görünümündedir. İki adet kamçıya

sahiptir, kamçı ya hücre uzunluğu kadar ya da daha kısadır (Koray, 2002). *Dunaliella*, Chlorophyta'nın diğer üyelerinin tersine kalın bir hücre duvarına sahip değildir. Hücre ince bir elastik membran ile çevrilidir. Bu ince membran, ortamdaki ozmotik değişikliklere tepki olarak hücre şekli ve hacminde hızlı değişimlere izin verir ve hücrelerin ozmotik baskı nedeni ile patlamasına engel olur (Ben-Amotz ve Avron, 1981).

Günümüzde *Dunaliella*'nın ticari üretimi ya sonsuz akışlı açık kanallarda ya da doğal lagüner alanlarda yapılır. *Dunaliella*'nın heterotrofik büyüme yeteneği olmayıp, bu türü karanlık bir ortamda asetat veya glikozda büyütme teşebbüsleri başarısız olmuştur (Ben-Amotz, 1987; Borowitzka ve diğ., 1992). Bu alg türü zorunlu fototroftur. Dışarıda yapılan kültürlerinde *Dunaliella* 7.0-9.0 arasında geniş bir pH aralığına uyum sağlayabilir (Ben-Amotz, 1987; Ben-Amotz ve Avron, 1983).

Dunaliella donma noktasının altındaki sıcaklık derecelerinden 45°C 'ye kadar olan geniş bir aralıktaki sıcaklıklara tolerans gösterme yeteneğindedir (Gordillo ve diğ., 2001). Bakteriyal ve filamentli mantar kontaminasyonları,

Dunaliella havuzlarında sıcaklık 36 °C'yi aştığında, tuzluluk ise 2.5 M'in altında tutulduğunda ortaya çıkar (Ben-Amotz ve Avron 1989). *Dunaliella*'nın büyümesi için en uygun alanların sıcak iklim koşullarının hakim olduğu, önemli bir miktarda buharlaşmanın görüldüğü ve bundan dolayı havuz sıcaklığının düşük olduğu çorak alanlarda bulunduğu belirlenmiştir.

Dunaliella 1-2 M NaCl içeren ortamlarda optimal büyüme gösterir (Ben-Amotz ve Avron, 1981). Ayrıca uygunluk sınırına kadar olan yüksek tuz konsantrasyonlarında da iyi büyüme gösterir. Halofilik ve halotolerant bakteriler, birkaç siliat türü, *Artemia salina*, birkaç Amoeba ve bazı mantarlar dışında çoğu organizma 2 M'i geçen tuz konsantrasyonlarını tolere edemez (Borowitzka ve Borowitzka, 1988). Çoğu ticari *Dunaliella* havuzlarında, ortamda arzu edilen tuz konsantrasyonlarına ulaşmak için içinde ticari tuz kullanılmış deniz suyu veya tatlı su kullanılır (Schlipalius, 1991).

Üretimi amaçlanan mikroalg türleri çeşitli ülkelerde bulunan protist kültür koleksiyonlarından sağlanabilse de, belli bir bölgeye ve çevre koşullarına adapte olmuş lokal türlerin yığın kültürlerdeki üstünlükleri daha çoktur. Bu nedenle ülkemizdeki canlı kaynaklarının araştırılması, türlerin varlığı ve çeşitliliğinin ortaya konması, hem insanlar hem de hayvanlar için doğal besin kaynaklarının bulunması açısından yararlı olacaktır. Bu çalışmada Konya Tuz Gölü'nden izole ettiğimiz *D. salina* türünün yaşadığı çevresel koşulların tespiti ve kültür koşullarından tuzluluğun büyüme etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Konya tuz gölü Türkiye'nin büyüklük bakımından ikinci (1500 km²), tuzluluk bakımından ise birinci büyük gölüdür. İnceleme yapılan bölge Konya ili Cihanbeyli ilçesi sınırlarında Tekel' e ait Yavşan Tuz İşletmesi sınırlarıdır. Bölge yazları kurak ve sıcak, kışları soğuk geçen karasal bir iklime sahiptir. Yazın su sıcaklığı gölün derin bölgelerinde 20-30 °C iken yüzeyde 40°C'ye ulaşmaktadır. Kışın ise su sıcaklığı 0°C ye kadar düşmektedir. Yaz aylarında gölün suyunun büyük bir kısmı yüksek sıcaklığın etkisi ile buharlaşmaktadır.

Gölün tuzluluğu yağış rejimine bağlı olarak %6 ile %23 arasında değişmektedir. Konya tuz gölü esas olarak yeraltı suları yanısıra yağışlarla gelen suların desteği ile beslenmektedir. Bu ortamda tuzluluğa toleransı olan canlılar yaşamalarını sürdürürken yüksek tuzluluğu tolere edemeyen türler ortadan kalkarlar.

Dunaliella salina (Dunal, 1905) Teodoresco cinsi Chlorophyceae sınıfına ve Volvocales ordosuna aittir (Koray, 2002).

Tuz gölünün Cihanbeyli ilçesi Yavşan Tuzla işletmesi kıyılarından 0,45 µm göz açıklığına sahip plankton kepeği ile çekimler yapılmıştır. Çeşitli bölgelerden alınan örnekler farklı steril cam kaplara konulduktan sonra Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Ural laboratuvarında Nikon (Japan) ışık mikroskobunda incelendi ve seyreltme yöntemi ile izole edildi.

Laboratuvarda sıcaklık 20±1°C sabit tutuldu ve aydınlatma kaynağı olarak 2 adet florasan lamba (40W/m³)

kullanıldı. Besin ortam olarak AS100 ortamı kullanıldı (Tablo 1). 5 farklı NaCl konsantrasyonunda AS100 besin ortamları hazırlandı. 1. denemde 4 farklı NaCl konsantrasyonunda (0.62M (%3.6), 0.85M (%5), 1.28M (%7.5), 1.71M (%10)) hazırlanan besin ortamlarında *D. salina* kültürü yapıldı. İkinci denemde ise 1.71M (%10) ve 2.56M (%15)) NaCl konsantrasyonlarında hazırlanan besin ortamlarında kültürler yapıldı. Denemeler için 500 ml'lik erlenlere 250 ml kültür ortamları hazırlandı ve 1.2 x10⁵ hücre ml⁻¹ hücre sayısı olacak şekilde aşlamalar yapıldı. Kültürler steril pastör pipetler ile havalandırıldı ve havalandırmada ilave CO₂ verilmedi.

Tablo 1. *Dunaliella salina* besin ortamı (AS100 –Medrec).

mL	Stok solusyon	g/100 mL H ₂ O
10	MgSO ₄ .7H ₂ O	24.4
10	KCl	6.0
10	NaNO ₃	10.0
10	CaCl ₂ .2H ₂ O	3.0
10	KH ₂ PO ₄	0.5
10	Tris buffer (Sigma Co.)	10.0
1	NH ₄ Cl	2.67
10	PI metal solusyonu	

PI metal solusyonu

Stok solusyon	
H ₃ BO ₃	3.426 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	1.215 mg
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.432 mg
ZnCl ₂	31.5 mg
H ₂ SO ₄	1.0 mL
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	31.19 mg

Büyüme ölçümlerinde hücre sayımları alınan kültür örneklerinin Naubaer (0,1 mm) hemositometresi ile 2 tekrarlı olarak yapılmıştır. Spesifik büyüme hızları (µ) aşağıdaki formüllere göre hesaplandı;

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$$

Formülde X₂ ve X₁, sırasıyla t₂ ve t₁ zamanlarındaki hücre konsantrasyonlarını belirtir.

Toplam karoten miktarının tespiti spektrofotometrik yöntemle göre aşağıda belirtildiği şekilde yapıldı. Örnekler 10 dakika 3500 rpm de santrifüjde çöktürüldükten sonra 60°C'de 5 saat bekletilerek kurutuldu. Kurutulmuş örnekten 5 mg alınarak 5 ml aseton (Merck %100, Germany) ile muamele edildi. Daha sonra Ika (Ultra Turrax T25) marka homojenitör ile 5 dakika süre ile homojenize edildikten sonra 10 dakika 70°C'de banyoya tabi tutuldu. Elde edilen ekstrakt madde 3500 rpm'de santrifüj ile ayrıldı. Örnekler spektrofotometrede (Hitachi U-2001, Japan) 475 nm dalga boyundaki değer okundu. Hazırlanan standart eğri yardımı ile toplam karoten miktarları tespit edildi. Pigment standartları olarak β-karoten (Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)) kullanıldı.

Bulgular

Konya Tuz Gölü'nden başarılı bir şekilde izole edilen *D. salina*'nın kültürleri farklı tuz konsantrasyonlarında yürütüldü. Mikroskobik gözlemlere göre 8-12 x 7-8 µm büyüklüğündeki

dairesel hücreler iki adet kamçıya sahiptir (Resim 1). Hücreler içerdikleri β -karoten miktarlarına bağlı olarak sarı-yeşil ve sarı-turuncu renklere gözlenebilirler. Mikroskopik gözlemlerde hücreler kamçıları ile hızlı hareket halinde görüldü.



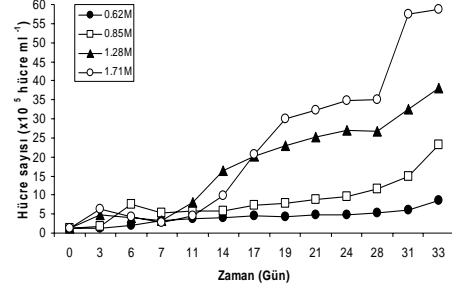
Resim 1. Işık mikroskopunda çekilmiş *Dunaliella salina*'nın fotoğrafı

Birinci denemede tüm NaCl konsantrasyonlarında hazırlanan besin ortamları gruplarında eşit hücre sayısı ile başlatıldı (Şekil 1). Denemeler 33 gün sürdürüldü. 1.71M NaCl konsantrasyonunda maksimal hücre sayısı 5.87×10^6 hücre ml^{-1} , 0.62M NaCl konsantrasyonunda 0.85×10^6 hücre ml^{-1} , 0.85 M NaCl konsantrasyonunda 2.3×10^6 hücre ml^{-1} ve 1.28 M NaCl konsantrasyonunda 3.8×10^6 hücre ml^{-1} olarak saptandı. Birinci denemede 1.28M ve 1.71M NaCl konsantrasyonlarında yürütülen kültürlerde 11. güne kadar lag faz gözlemlendi. 11. günden sonra başlayan logaritmik bir artış 33. güne kadar devam etti. Spesifik büyüme hızları bakımından 0.62M, 0.85M, 1.28M, ve 1.71M NaCl konsantrasyonunda hazırlanan besin ortamlarında 11. güne kadar hücre sayısında durgunluk tespit edildi. 11. günden sonra hücrelerin ortama adapte olarak zamana bağlı olarak yavaş bir büyüme tespit edildi (Şekil 2).

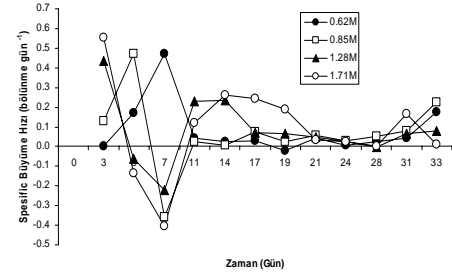
İkinci denemede ilk denemeye göre yaklaşık 8 kat fazla hücre sayısı ile başlandı (Şekil 3). 21 gün süren deneme boyunca maksimum hücre sayısı 3.72×10^6 hücre ml^{-1} ile 1.71M NaCl konsantrasyonunda elde edildi. Tuzluluk konsantrasyonunun artırılmasıyla hücre sayısında bir azalma olduğu tespit edildi (maksimum 2.28×10^6 hücre ml^{-1}). 1.71M ve 2.56M NaCl konsantrasyonlarında hazırlanan besin ortamları ile yapılan kültürlerde log faz kaydedilmedi. 7 günlük logaritmik artış fazından sonra durgunluk fazı başladı. Spesifik büyüme hızları bakımından 1.71M ve 2.56M NaCl konsantrasyonunda hazırlanan besin ortamlarında 11. güne kadar hücre sayısındaki artış tespit edildi (Şekil 4).

İkinci denemede 1.71M ve 2.56M NaCl konsantrasyonlarında hazırlanan besin ortamlarında yapılan kültürlerden erken durgunluk fazında %10 hasat edilerek örnek alındı. Örneklerde yapılan toplam karoten analizlerinde 1.71M ve 2.56M NaCl konsantrasyonlarında sırasıyla

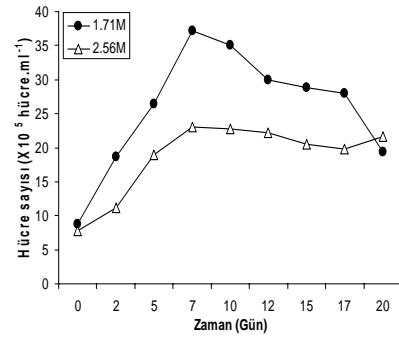
$9.80 \pm 0.25 \text{ mg g}^{-1}$ kuru ağırlık ve $6.93 \pm 0.96 \text{ mg g}^{-1}$ kuru ağırlık değerleri elde edildi.



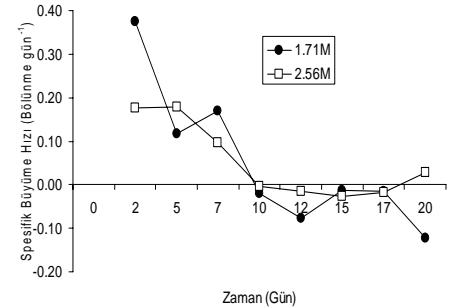
Şekil 1. Farklı NaCl konsantrasyonlarında (0.62M, 0.85M, 1.28M, ve 1.71M) hücre sayılarında meydana gelen zamana bağlı değişimler



Şekil 2. Farklı NaCl konsantrasyonlarında (0.62M, 0.85M, 1.28M, ve 1.71M) hücre sayılarına göre spesifik büyüme hızlarının zaman bağlı değişimleri



Şekil 3. Farklı NaCl konsantrasyonlarında (1.71M ve 2.56M) hücre sayılarında meydana gelen zamana bağlı değişimler



Şekil 4. Farklı NaCl konsantrasyonlarında (1.71M ve 2.56M) hücre sayılarına göre spesifik büyüme hızlarının zaman bağlı değişimleri

Tartışma ve Sonuç

D. salina yüksek tuzluluklarda hücre içinde önemli miktarda β -karoten biriktirebilen ve bu nedenle ekonomik değer kazanan bir klorofittir. Bu çalışmada *D. salina*'nın farklı tuz konsantrasyonlarında kültürleri yapıldı ve yüksek tuzluluklarda *D. salina* yüksek hücre konsantrasyonlarına ulaştı, yanı sıra hücrelerin önemli ölçüde β -karoten biriktirdikleri gözlemlendi.

Çelekli ve Dönmez (2001) ve Dudu Evren ve diğ. (2001) aynı şekilde Tuz Gölünden izole ettikleri *Dunaliella sp.* türünü başarılı bir şekilde izole edip Johansen besin ortamında kültürünü yapmayı başardıklarını bildirmektedirler.

Bir çok canlı hücre % 15 i aşan tuz konsantrasyonlarını tolere edemez. Böyle ortamlara ancak bir osmotik regülasyon mekanizması geliştirmiş organizmalar uyum sağlayabilir. Fotosentetik *Dunaliella salina* böyle organizmalardan biridir ve çok geniş (%5-%35) NaCl konsantrasyonlarında canlılığını sürdürebilir (Ben-Amotz & Avron, 1983; Borowitzka ve Borowitzka, 1992).

Bu çalışmada *D. salina* için en uygun tuz derişiminin 1.71M NaCl olduğu gözlemlendi. 1.71M NaCl'de daha yüksek bir hücre sayısı (5.87×10^6 hücre ml^{-1}) ve daha yüksek β -karoten değerleri elde edildi (9.80 ± 0.25 mg g^{-1} kuru ağırlık).

Dunaliella sp. ile farklı NaCl (%10, %15 ve %20) konsantrasyonlarında yapılan bir diğ. çalışmada %10 NaCl konsantrasyonunda en iyi büyüme elde ettiklerini bildirmişlerdir. (Dudu Evren ve diğ., 2001). Yine aynı alg türü ile yapılan bir başka çalışmada en yüksek β -karoten miktarının 3.42 M NaCl'de elde edildiği bildirilmektedir Çelekli ve Dönmez, (2001).

Ülkemiz iç su kaynaklarında mevcut canlı kaynaklarının değerlendirilmesi ve ekonomiye kazandırılması ancak üzerinde yapılacak araştırmalarla mümkündür. Mikroalgler hücre içinde biriktirdikleri metabolitler bakımından önemli canlı

gruplarındandır. Bu bakımdan sucul ortamlarda dağılım gösteren mikroalglerin tanımı, izolasyonu ve yığın (mass) üretimleri yapılması ülkemiz canlı kaynaklarının değerlendirilmesi açısından son derece önemlidir.

Kaynakça

- Ben-Amotz A, M. Avron 1990. The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella*. Trends Biotechnol 8:121-128.
- Ben-Amotz A., M. Avron 1983. On the factors which determine massive β -carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. Plant Physiol. 72: 593-597.
- Ben-Amotz, A., M. Avron, 1981. Glycerol and β -carotene metabolism in the halotolerant alga *Dunaliella*: a model system for biosolar energy conversion. Trends Biochem. Sci.6: 297-9.
- Ben-Amotz A., M. Avron 1989. The wavelength dependence of massive carotene synthesis in *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). J. Phycology 25, 175,178.
- Ben-Amotz A. 1987. Effect of irradiance and nutrient deficiency on the chemical composition of *Dunaliella bardawil* Ben-Amotz and Avron (Volvocales, Chlorophyta). J Plant Physiol 131:479-487
- Borowitzka, M. A., L. J. Borowitzka, 1988 (Eds). *Dunaliella*. In Microalgal Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 27-58.
- Çelekli, A., G.Dönmez, 2001. Bir *Dunaliella* türünün gelişimine ve beta karoten üretimine pH ve tuz konsantrasyonlarının etkisi. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi, 1. Alg Teknoloji Sempozyumu p, 79-86 (In Turkish).
- Dudu Evren, Ü., Ç. Kanlıtepe, C. Çıracı, G. Dönmez, 2001. Tuz Gölü'nden (Konya-Türkiye) izole edilen *Dunaliella* türlerinin gliserol üretim kapasitesinin belirlenmesi. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi, 1. Alg Teknoloji Sempozyumu p, 225-232 (In Turkish).
- Gordillo F.J.L, C. Jimenez, J. Chavarria, F.X. Niell 2001. Photosynthetic acclimation to photon irradiance and its relation to chlorophyll fluorescence and carbon assimilation in the halotolerant green alga *Dunaliella viridis* Photosynthesis Research 68: 225-235
- Koray, T. 2002. Denizel fitoplankton (Ders kitabı), Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları No 32, p 147-148 (In Turkish).
- Schlipalius, L. 1991. The extensive commercial cultivation of *Dunaliella salina*. Bioresource Technol. 38: 241-243
- <http://www.bio.utexas.edu/research/utex/media/media.html> Copyright 2005 UTEX and University of Texas at LAST UPDATED MAY 13, 2005.