

İki Farklı *Spirulina platensis* Suşunun Büyüme Özelliklerinin Karşılaştırılması

Çenker Kılıç¹, *Tolga Gökşan¹, İlkur Ak¹, Şevket Gökşınar²

¹ Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, Çanakkale, Türkiye

² Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, İzmir, Türkiye

*E mail: tolga_goksan@yahoo.com

Abstract: Comparison of the growth characteristics in two different *Spirulina platensis* strains. The cultivation of *Spirulina platensis*, which is often used in microalgal biotechnology, has successfully been carried out in our country as well. In this study, the growth characteristics of two *Spirulina* strains in straight and spiral forms were investigated. In addition, spectrophotometric measurements, which make the measurements of chlorophyll and dry weight more practical, were studied. It was found that all the parameters except the cell count were similar during the experiment. While the spiral/straight form ratio was 2.43 at the beginning of the experiment, it increased up to 5.53 at the end. Spectrophotometric measurements are of importance in terms of practicality in the monitoring of the growth in the cultures. In this respect, a strong correlation was determined between the absorbance values at 680 nm and the amounts of dry weight and chlorophyll ($p < 0.05$). As a result, though there was not a significant difference between the growth parameters of the both forms, the use of straight one would be better due to the problems encountered during harvesting.

Key Words: *Spirulina*, strain, straight form, spiral form, growth.

Özet: Mikroalgal biyoteknoloji kapsamında sıklıkla kullanılan türlerden *Spirulina platensis*'in üretimi son yıllarda ülkemizde de başarıyla gerçekleştirilmektedir. Bu çalışmada, düz ve spiral formda olan iki farklı *Spirulina* suşunun büyüme karakteristikleri incelendi. Ayrıca, klorofil ve kuru ağırlık ölçümlerinde pratiklik sağlayacak spektrofotometrik ölçümler çalışıldı. Deneme süresince, hücre sayıları haricinde tüm parametrelerin birbirine benzerlik gösterdiği saptandı. Denemenin başında spiral/düz form oranı 2.43 iken bu oran deneme sonunda 5.53'e yükseldi. Spektrofotometrik ölçümler, kültürlerde büyümenin izlenmesinde pratiklik sağlaması bakımından önemlidir. Bu kapsamda, 680 nm'de ölçülen absorpsiyon değeri ile kuru ağırlık ve klorofil *a* miktarları arasında önemli bir ilişki olduğu saptandı ($p < 0.05$). Sonuç olarak, her iki formun büyüme parametreleri arasında önemli bir fark olmasa da spiral formun hasadında yaşanan problemlerden dolayı düz formun kullanılmasının daha uygun olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Spirulina*, suş, düz form, spiral form, büyüme.

Giriş

Mikroalgler protein, yağ asitleri, vitaminler, mineraller, pigmentler ve daha pek çok değerli hücre metabolitler bakımından zengin bir içeriğe sahip olmaları nedeniyle son yıllarda üzerinde en çok çalışılan organizmalardan biri durumuna gelmiştir. Ülkemizde de mikroalgal biyoteknoloji üzerine gerçekleştirilen çalışmalarda artış gözlenmektedir. Bu çalışmalar kapsamında özellikle üretiminin ve hasadının kolay olması nedeniyle mavi-yeşil alglerden *Spirulina platensis* türünün üretimi popüler hale gelmiştir.

Spirulina platensis içerdiği yüksek miktarda protein, pigmentler ve GLA (gamma linolenik asit) gibi ürünler bakımından öneme sahip olan bir siyanobakteri türüdür (Cirik, 1989, Chen ve diğ., 1996; Glazer, 1999). Bu özelliklerinden ötürü *S. platensis*'in bir besin desteği olarak ticari yığın kültürleri 1970'lerin sonunda başlamıştır (Ciferri, 1983). Yüksek protein içeriğinden dolayı insanlar için bir besin desteği olarak kullanımının yanında, hayvan yemi olarak akuakültürde ve kanatlı hayvan endüstrisinde yoğun şekilde kullanımı mevcuttur (Belay ve diğ., 1996; Wikdors ve Ohno, 2001).

Spirulina üretiminde kültürün büyüme parametrelerini izlemek ve bunları yorumlayıp kültürün gidişine yön vermek üretim verimliliği açısından önemlidir. Ancak büyüme parametrelerinin izlenmesi zaman alıcı işlemleri gerektirir. Rutin kültür çalışmalarında parametrelerin pratik yöntemler ile izlenmesi, kültürlerde maliyetin düşürülmesi ve zamandan tasarruf sağlanması bakımından önemlidir. Bu çalışma ile *Spirulina* kültürlerinde spektrofotometrik ölçümler sayesinde büyümenin tespiti amaçlandı. Bu nedenle, *Spirulina platensis*'in M2 ve Parachas suşları ile gerçekleştirilen kültür denemelerinde kuru ağırlık ve klorofil *a* değerleri ölçülerek, optik yoğunluklarıyla aralarındaki ilişkiler saptandı.

Materyal ve Yöntem

Denemelerde kullanılan *Spirulina platensis*'in M2 (düz form) ve Parachas (spiral form) suşları G. Torzillo'dan sağlandı (Culture Collection of Centro Studio dei Microrganismi Autotrofi del CNR, İtalya). M2 suşu Mombolo Gölünden (Çad) izole edilmiştir. Denemelere başlamadan önce suşlar floresan lambalar ile 100 µmol foton m⁻² sn⁻¹'lik ışık şiddetine adapte edildi. Kültürler için 1 L'lik erlenler kullanıldı ve denemelere

eşit hücre yoğunlukları ile başlandı. Sürekli aydınlatma uygulanan deney grupları, içinde termostatlı bir ısıtıcısı bulunan ve kısmen su ile doldurulmuş 25 cm x 50 cm ebatlarındaki akvaryum içinde (Ben-Marie yöntemi) 25 ± 1 °C'ta sabit sıcaklıkta tutuldu. Zarrouk (1966) büyüme ortamı kullanılan kültürler sürekli havalandırma uygulandı.

Algal büyümeye ilişkin parametrelerden klorofil a, kuru ağırlık (DW), % geçirgenlik, optik yoğunluk ve filament sayıları izlendi. Optik yoğunluk değerleri spektrofotometrede 680 nm'de ölçüldü. Klorofil a tayini saf metil alkol ile Bennet ve Bogorad (1973)'a göre gerçekleştirildi. Spektrofotometrik ölçümler Jasco UV/VIS model 530 marka spektrofotometrede yapıldı. Kuru ağırlık tayinleri 20'şer ml örnek alınarak Torzillo ve diğ. (1993)'ne göre yapıldı.

Spesifik büyüme hızının (μ) tespiti kuru ağırlık değerleri baz alınarak gerçekleştirildi. μ (gün⁻¹) ve ikilenme hızı (*d.t.*) parametrelerinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanıldı (Vonshak 1997). Formülde X_2 ve X_1 , sırasıyla t_2 ve t_1 zamanlarında alınan kuru ağırlık örneklerini temsil eder;

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} \quad d.t. = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0.693}{\mu}$$

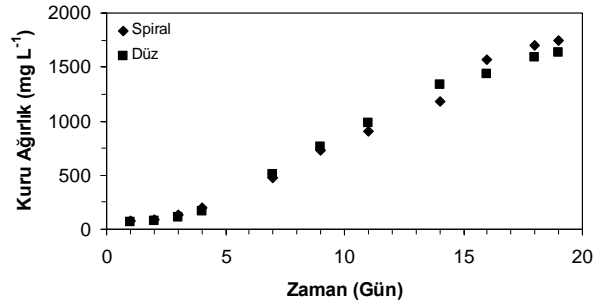
Filament sayısının hesaplanmasında tek damla yöntemi kullanıldı. Kültürün yoğunluğuna bağlı olarak sayılacak örnekler seyreltildi. Her örnek en az 5 tekrar ile sayıldıktan sonra 1 ml'deki ortalama filament sayısı hesaplandı.

Bulgular

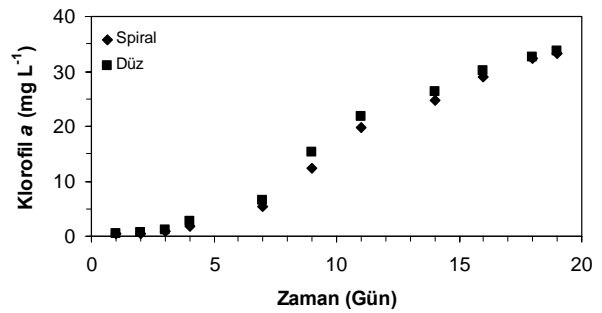
İki farklı *Spirulina* suşunun büyüme özelliklerinin karşılaştırıldığı bu denemede, kültürlerin gelişimi 19 gün boyunca gözlemlendi. Kültürlerde biyomas değişimleri Şekil 1'de verildi. Hücrelerin ortama adaptasyonları aşamasında, üç günlük bir gecikme fazi yaşandı. Deneme başında düz ve spiral formlar için sırasıyla 70 ve 80 mg L⁻¹ olarak bulunan değerler, deneme sonunda 1750 ve 1640 mg L⁻¹'lik değerlere ulaştı. Her iki denemede de kuru ağırlık değerlerindeki artış 16. günden itibaren yavaşlamaya başladı. Grafikten, hücrelerin 4. ve 15. günler arasında logaritmik büyüme fazında olduğu görüldü.

Klorofil a değerleri de kuru ağırlığa benzer bir şekilde ilk üç gün önemli bir değişim göstermedi. Klorofil miktarının 7-11. günler arası hızla arttığı, daha sonra bu artış hızının yavaşladığı gözlemlendi (Şekil 2). Yaklaşık 0.5 mg L⁻¹'lik bir konsantrasyon ile başlayan denemelerde klorofil a miktarları, deneme sonunda her iki suşta da 33.5 mg L⁻¹'lik bir değere ulaştı.

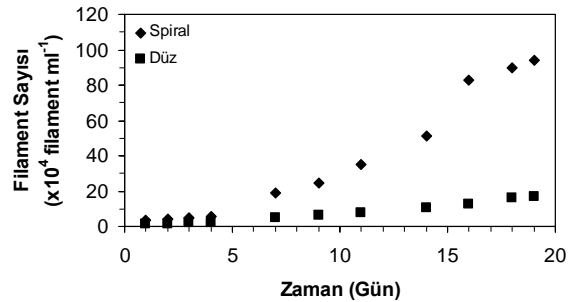
Denemelerde kullanılan iki suş morfolojik olarak birbirlerinden önemli farklılıklar göstermekteydi. Düz form spiral forma göre daha uzun idi. Hücrelerde görülen bu morfolojik değişiklik, başlangıç hücre sayılarının da farklı olmasına neden oldu. Denemelere spiral ve düz formlar için sırasıyla 3.40×10^4 ve 1.40×10^4 filament/ml hücre sayıları ile başlandı. Spiral/düz oranı başlangıçta 2.43 iken bu oran deneme sonunda tedrici olarak artarak 5.53 oldu. Deneme sonunda spiral ve düz formlar için ulaşılan filament sayıları sırasıyla 94×10^4 ve 17×10^4 olarak bulundu (Şekil 3).



Şekil 1. Spiral ve düz *Spirulina* suşlarının kuru ağırlıklarında meydana gelen değişimler.



Şekil 2. Spiral ve düz *Spirulina* suşlarının klorofil a miktarındaki değişimler.

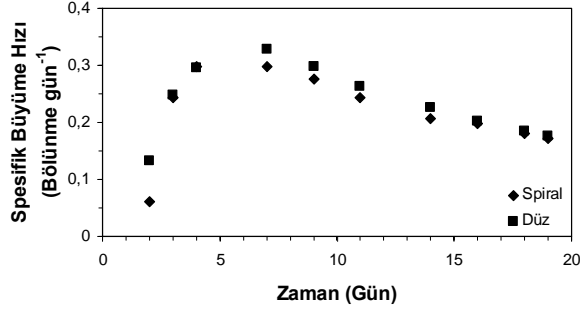


Şekil 3. Spiral ve düz *Spirulina* suşlarının filament sayısında meydana gelen değişimler.

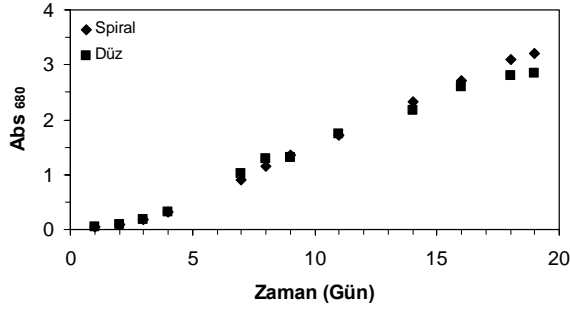
Her iki suşun da spesifik büyüme hızlarına (μ) bakıldığında aynı eğriyi verdikleri görüldü (Şekil 4). En yüksek büyüme hızlarına 4. ve 9. günler arası (7. günde en yüksek) ulaşıldı ve daha sonra düşmeye başladı. Spiral ve düz formlar için en yüksek μ değerleri 7. günde sırasıyla 0.30 ve 0.33 bölünme/gün, ikilenme zamanları ise 2.10 ve 2.31 gün⁻¹ olarak bulundu.

Kültürlerin doğrudan spektrofotometrede ölçülmesi ile bulunan değerler % Geçirgenlik ve Abs₆₈₀ değerlerinin eğrileri aşağıda Şekil 5 ve Şekil 6'da verildi. 680 nm'de ölçülen absorbans değerlerine bakıldığında her iki *Spirulina* formunun da benzer şekilde arttığı izlendi (Şekil 5). Deneme sonunda spiral ve düz formlar için ulaşılan değerler sırasıyla 3.20 ve 2.85 olarak bulundu. Örnekten geçen ışık miktarını belirten %

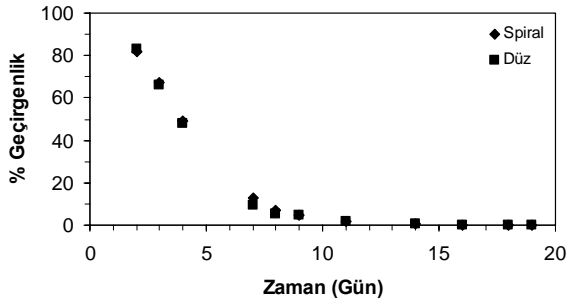
Geçirgenlik değerinde ise ışık geçirgenliğinin özellikle 505 mg L⁻¹'lik kuru ağırlık miktarına denk gelen 7. günden itibaren ani bir şekilde düştüğü görüldü (Şekil 6).



Şekil 4. Spiral ve düz *Spirulina* suşlarının spesifik büyüme hızlarının karşılaştırılması.



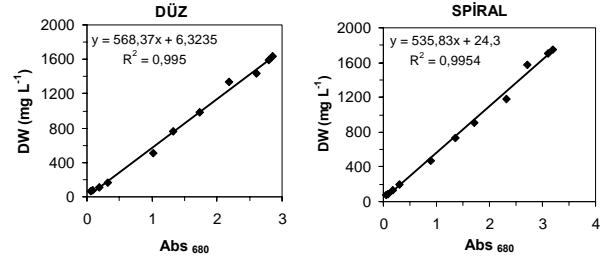
Şekil 5. Spiral ve düz *Spirulina* suşlarının Optik yoğunluk (680 nm) değişimleri.



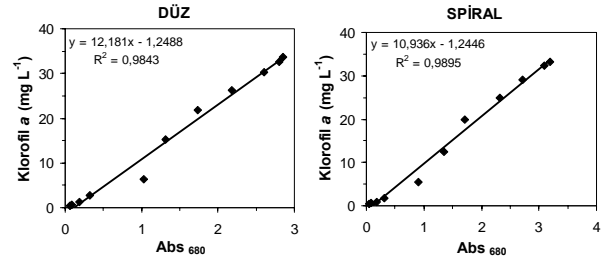
Şekil 6. Spiral ve düz *Spirulina* suşlarının % Geçirgenlik değerleri.

Rutin bir kültür sırasında zaman alıcı ve masraflı işlemlerden en önemlileri arasında kuru ağırlık ölçümü ve klorofil a tayinleri bulunmaktadır. Bu tip işlemlerde pratiklik sağlaması ve yaklaşık değer tahmin edilmesinde spektrofotometrik yöntem üzerinde çalışıldı. Bu yöntem sayesinde alg örneklerinin sadece spektrofotometrede okutulması ile yaklaşık sonuç tahmin edilebilecektir. Bu nedenle örneklerin her gün 680 nm'de absorbans değerleri okunarak, kuru ağırlık ve klorofil a arasındaki ilişki saptanmaya çalışıldı. Abs₆₈₀ ile kuru ağırlık ve klorofil a

arasındaki ilişkiler sırasıyla Şekil 7 ve Şekil 8'de gösterildi. Buna göre, spektrofotometrede okunan Abs₆₈₀ değeri ile kuru ağırlık ve klorofil a miktarları arasında önemli bir ilişki olduğu saptandı (p<0.05).



Şekil 7. Spiral ve düz *Spirulina* suşlarında DW ile Abs₆₈₀ arasındaki ilişki.



Şekil 8. Spiral ve düz *Spirulina* suşlarında Klorofil a ile Abs₆₈₀ arasındaki ilişki.

Tartışma ve Sonuç

Laboratuvar koşullarında iki farklı *Spirulina platensis* suşunun büyüme özelliklerini karşılaştırmayı ve spektrofotometrik ölçümlerle pratik bazı sonuçlara ulaşmayı amaçlayan bu denemede, kuru ağırlık (Şekil 1), klorofil a (Şekil 2), spesifik büyüme hızı (Şekil 4), Abs₆₈₀ (Şekil 5) ve % Geçirgenlik (Şekil 6) değerlerinin birbirine çok yakın olduğu görüldü. Tüm bu parametreler doğrultusunda, iki suşun büyümeleri arasında herhangi bir fark olmadığı söylenebilir.

Spesifik büyüme hızının (μ) en yüksek olduğu 4. ve 9. günler arasında düz *Spirulina* formunda μ 'nın daha yüksek olduğu görüldü. Hem düz hem de spiral suşlarda en yüksek büyüme hızı 7. günde ulaşılırken, düz formda μ (0,33 bölünme gün⁻¹), spiral forma nazaran (0,30 bölünme gün⁻¹) daha yüksek idi. Benzer şekilde, büyümenin en hızlı olduğu bu periyotta düz formda ulaşılan kuru ağırlık ve klorofil a miktarları da spiral forma göre nispeten daha yüksekti (Şekil 1 ve Şekil 2). Fakat elde edilen sonuçlara göre iki suş arasındaki farkın önemsiz olduğu tek yönlü ANOVA ile gösterildi (p<0.05).

Denemenin sonuçlarına göre, ticari üretimde kullanılabilen bu iki *Spirulina* suşu arasındaki tek önemli fark birim hacimdeki hücre sayısından kaynaklanmaktadır. Genel olarak bakıldığında, büyümeleri arasında biyomas miktarı bakımından fark olmamasına rağmen, birim hacimdeki hücre sayısı spiral formda önemli derecede daha fazla idi. Denemenin başında spiral/düz form oranı 2.43 iken bu oran

deneme sonunda 5.53'e yükseldi. Bunun nedeni, spiral formun kültür sırasında uzun trikomal oluşturmamasına bağlandı. Denemenin başından sonuna kadar düz formun uzunluğu önemli derecede değişim göstermedi ($341 \pm 28 \mu\text{m}$). Spiral formun uzunluğu ise denemenin başında $149 \pm 21 \mu\text{m}$ 'den deneme sonunda $120 \pm 18 \mu\text{m}$ 'ye düştü.

Mikroalg üretimi genelde maliyetli bir işlemdir ve mikroalglerin hasadı toplam üretim maliyetinin % 20-30 gibi kısmını oluşturabilir (Gudin ve Therpenier, 1986). Fakat *Spirulina* için durum farklı olup, sahip olduğu filament yapısı nedeniyle rahatlıkla süzülüp hasat edilebilir. *Spirulina*'nın hasadında genelde 50-100 μm arası göz açıklığına sahip plankton bezleri kullanılmaktadır (Duerr ve diğ., 1996; Vonshak, 1997). Fakat üretim hacmi arttıkça, birim zamanda süzülmesi gereken biyomas miktarı da artacağından, filtrelerin süzme verimliliği belli bir süre sonra düşmeye başlayacak ve tıkanmalar meydana gelecektir. Bunun önüne geçmek amacıyla, *Spirulina*'nın süzülebileceği sınırlar içindeki en büyük göz açıklığının kullanılması avantaj sağlayacaktır. Bu nedenle denememizde 100 μm 'lik plankton bezi kullanıldı. Süzme işlemi sonucunda, düz form olan M2 suşunun tamamına yakın kısmının hasat edilebildiği, spiral form olan Parachas suşunun ise ancak yarıya yakın (% 45) kısmının süzülebildiği görüldü. Bu durum spiral form açısından biyomas üretiminde problem teşkil etmese de hasat işlemi sırasında güçlük çıkaracaktır. Dalay ve diğ. (2001) tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise *S. platensis*'in M2, Parachas ve Tulear suşları çalışılmış ve süzme verimliliğinde tam tersi bir sonuca ulaşılmıştır. Hem 30 μm hem de 150 μm göz açıklığına sahip plankton bezleri ile gerçekleştirilen denemede düz form olan M2'nin en az, spiral form olan Parachas'ın ise en fazla süzülen suş olduğu belirtilmiştir. Düz filamentlerin V şeklinde kıvrılarak 30 ve 150 μm 'lik gözlerden geçtiği belirtilse de yaklaşık 300 μm uzunluğa sahip düz filamentlerin bu şekilde kıvrılması zor görünmektedir. Deneysel ölçekte laboratuvar koşullarında gerçekleştirilen denememizde bulduğumuz sonuç, üzeri sera ile kaplı ve bir çark yardımıyla döndürülen havuz kültürlerinde de değişmemiştir. İki çalışma arasındaki bu farklılığın, kültürlerin fizyolojik durumundan dolayı kaynaklandığı düşünülmektedir. Sağlıklı bir *Spirulina* kültüründe pH değerinin, herhangi bir müdahalede bulunulmadığında (CO_2 ilavesi gibi) yüksek fotosentez hızı nedeniyle 10'un üzerine çıkması normaldir. Ayrıca pH'nin 9.5'in altına inmemesi *Chlorella* kontaminasyonunu önlemek açısından bir zorunluluktur (Belay, 1997). Dalay ve diğ. (2001)'nin çalışmalarına bakıldığında ise pH değerinin beş aylık deneme sürecinde 9.3'ün üzerine çıkmadığı görülmektedir. Bunun yanında, M2 ve Parachas suşlarında pH değerinin Haziran ayından başlayarak, sıcakların en şiddetli olduğu Ağustos ayına kadar tedrici olarak düştüğü görülmektedir. Bu da kültürlerin büyümesinin ışık ve sıcaklık gibi bir takım faktörler tarafından sınırlandırıldığını düşündürmektedir. Bu olumsuz koşulların düz filamentlerin boyunda bir kısalmaya veya kırılmalara neden olabileceği, bu

nedenle de süzme verimliliğini etkileyebileceği düşünülmektedir. Ayrıca yüksek sıcaklıklara daha dirençli olan M2 suşunda en yüksek büyüme elde edilmesine rağmen en düşük pH değerine ulaşılması da bu görüşümüze desteklemektedir.

Bu çalışmada, ticari olarak en çok üretime alınan türlerden *Spirulina platensis*'in iki farklı suşu, laboratuvar koşullarında büyüme özellikleri bakımından karşılaştırılmış ve büyüme parametreleri arasında çok önemli bir fark görülmemiştir. Bu yüzden her iki suşun da laboratuvar koşullarında üretime uygun olduğu bulunmuştur. Ancak süzme çalışmalarında denememizde kullandığımız spiral formun (Parachas) hasat verimliliğinin yüksek olmaması nedeniyle, düz formun (M2) kullanılmasının daha uygun olacağı düşünülmektedir.

Kaynakça

- Belay, A., T. Kato, and Y. Ota, 1996. *Spirulina* (*Arthrospira*): potential application as an animal feed supplement. *J.Appl.Phycol.* 8: 303-311.
- Belay, A., 1997. Mass culture of *Spirulina* outdoors-the Earthrise Farms Experience. In: *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): Physiology, Cell biology and Biotechnology, Vonshak, A. (Ed.), Taylor and Franchis, London, pp. 43-65.
- Bennet, A. and L. Bogorad, 1973. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *Journal of Cell Biology* 58: 419-435.
- Chen, F., Y. Zhang and S. Guo, 1996. Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture. *Biotechnol. Lett.*, 18: 603-608.
- Ciferri, O., 1983. *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbiol. Rev.* 47: 551-578.
- Cirik, S., 1989. *Spirulina*, a rich vegetable food (in Turkish). *TÜBİTAK The Science and Technique* 22 (257): 19-20.
- Dalay, M.C., S. Cirik and E. Koru, 2001. Determining the most available *Spirulina platensis* (Stiz.) Geitl, strain for outdoor cultures in the climatic conditions of the Aegean Region of Turkey (in Turkish). *E.U. Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 18 (3-4): 523-528.
- Duerr, E.O., M.R. Edralin and N.M. Price, 1996. Facilities requirements and procedures for the laboratory and outdoor raceway culture of *Spirulina* spp. *J.Mar.Biotechnol.* 5: 1-11.
- Glazer, A., 1999. Phycobiliproteins. In: *Chemicals from Microalgae*, Z. Cohen (Ed.), Taylor and Franchis Ltd., Philadelphia, PA, pp. 261-276.
- Gudin, C. and C. Therpenier, 1986. Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae. *Adv.Botechnol.Proc.* 6: 73-110.
- Torzillo, G., P. Carozzi, B. Pushparaj, E. Montaini and R. Materassi, 1993. A two-plane photobioreactor for outdoor culture of *Spirulina*. *Biotechnol.Bioeng.* 42: 891-898.
- Vonshak, A., 1997. *Spirulina*: growth, physiology and biochemistry, in: *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): Physiology, Cell biology and Biotechnology, Vonshak, A. (Ed.), Taylor and Franchis, London, pp. 43-65.
- Vonshak, A., 1997. Outdoor mass production of *Spirulina*: the basic concept, in: *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): Physiology, Cell biology and Biotechnology, Vonshak, A. (Ed.), Taylor and Franchis, London, pp. 79-99.
- Wikdors, G.H. and M. Ohno, 2001. Impact of algal research in aquaculture. *J.Phycol.* 37: 968-974.
- Zarrouk, C., 1966. Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Setch. et Gardner) Geitler. Ph. D. Thesis, University of Paris, France.