

Diyatom Früstül'lerinin Taramalı (Scanning) Elektron Mikroskobu İçin Hazırlanmasında Alternatif Metod

Sibel Bargu

Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 31024, Antakya, Hatay, Türkiye.

Abstract: *An alternative preparation method for studying diatom frustules using scanning electron microscopy (SEM).* The structure of silica cell wall is an important taxonomic criterion in describing and classification of diatoms. In this study, because organic material in cells can block seeing the valve structures of diatom cell walls, an alternative preparation method was suggested using scanning electron microscopy to identify diatom fragments by cleaning diatom frustules from organic material using an oxidation method. Also some suggestions were given on which modifications can be applied when the source of the samples are collected from different medium such as water, gut contents and fecal samples.

Key Words: *Pseudo-nitzschia*, diatom, cell wall, scanning electron microscopy, food chain

Özet: Diyatomların tanımlanması ve sınıflandırılmasında, silis içeren hücre duvarı yapıları önemli bir taksonomik kriterdir. Bu makalede, organik materyalin valv yapısının incelenmesini zorlaştırması nedeni ile diyatom früstüllerinden oksidasyon yöntemi ile uzaklaştırılması için bilinenlere alternatif bir yöntem önerilmiştir. Bu yöntemle çalışılacak örneklerin, farklı ortamlardan (su, mide ve dışkı gibi) toplanması halinde hangi modifikasyonların uygulanabileceği konusunda önerilerde bulunulmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Pseudo-nitzschia*, diyatom, hücre duvarı, taramalı elektron mikroskobu, besin zinciri.

Giriş

1960'lı yılların ortalarında ilk ticari mikroskobun çıkarılması ile kullanımı yaygınlaşmaya başlayan Scanning (taramalı) Elektron Mikroskobu (SEM), organizmaların 3 boyutlu ve daha detaylı bir şekilde incelenmesine olanak vermiş, zamanla mikroskobik canlıların sistematüğinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. SEM'in sistematikte en yaygın kullanım alanlarından biri tuzlu ve tatlı sularda sıkça rastlanan diyatomların silis içeren hücre çeperlerinin (früstül) şekilsel ve boyutsal farklılıkları göz önüne alınarak incelenmesi ile yapılan tür tayinleridir. Kromatoforların şekli ve sayısı, kolonilerin şekli ve tipi gibi çeşitli morfolojik karakterler diyatomların

sınıflandırılmasında önceden beri kullanılmaktadır. Fakat çalışılacak materyallerin çoğu fikse edilmiş olduğundan, bu karakterler organizmanın tanımlanmasında yetersiz kalabilmektedir.

Diyatomların SEM ile incelenmesi sadece sistematik amaçlı değildir. Diyatomların hücre çeperinde (früstül) bulunan silis suda erimeden kalabildiğinden, hücreyi şeklini bozmadan koruyarak çok uzun süre suda bırakabilmektedir. Bu şekilde sudaki ölü diyatomlar yıllar boyunca birikime uğrayarak ayırımı kolaylıkla yapılabilen sediment tabakaları oluşturmaktadırlar. Bu sediment tabakalarının yapısı ve içeriği ile ilgili ayrıntılı bilgi edinebilmek için de SEM yaygın olarak kullanılmaktadır.

Son zamanlarda bu teknik, besin zincirinde organizmalar arası bağlantıları kurmakta da etkili bir yöntem olarak kullanılmaya başlanmış ve bilimsel makalelerde yetkin bir metot olarak kabul edilmiştir. Diyatomlar, tatlı ve deniz suyu ortamlarında besin zincirinin ilk halkasını oluşturan önemli bir fitoplankton grubu olduklarından, tüm filtre eden tüketici organizmalar için direk, bu organizmaları tüketen karnivor canlılar için de dolaylı olarak çok önemli bir besin kaynağıdır. Diyatomların tespiti, bunları tüketen organizmaların mide ve dışkı içeriklerinin analizleri ile mümkün olabilir ve organizmalar arası besin ilişkilerini açıklamada kullanılabilir. Besin zincirindeki organizmalar arası etkileşimler, zincirdeki karbon akışı veya zararlı herhangi bir maddenin besin zincirine bağlı olarak nasıl ilerleyebileceği konuları ekolojik açıdan çözülmesi gereken önemli konulardır. Örneğin diyatomlardan *Pseudo-nitzschia*'nın bazı türleri, domoic asit (DA) olarak adlandırılan ve yüksek organizmalarda merkezi sinir sistemine zarar vererek organizmayı komaya sokan ve hatta ölümüne yol açabilen bir toksik amino asit üretmektedirler (Quilliam ve Wright, 1989). Üretilen bu toksin, besin zincirinde diyatomları direkt olarak tüketebilen herbivor canlıların vektör oluşturması ile hızla ilerleyebilmekte ve yüksek seviyeli organizmaların ölümüne sebep olabilmektedir. 1987 yılında 3 kişinin, 1991 yılında 200 pelikanın ve 1998 yılında 50'den fazla deniz aslanının ölümüne yol açan DA zehirlenmesinde canlıları öldüren toksin kaynağının diyatomlarla direkt beslenen midye ve hamsi balığı olduğu ortaya çıkmıştır. Bu vektör organizmalarda belirlenen toksinin ise, filtre edilerek midelerinde biriktirdikleri *Pseudo-nitzschia*'dan geçtiği tespit edilmiştir (Bates ve diğ. 1989; Work ve diğ. 1993; Lefebvre ve diğ. 1999; Scholin ve diğ. 2000). Bu bulgular, hem ölen canlıların hem de vektör

organizmanın mide içeriklerinden ve sudan alınan örneklerde yapılan LM ve SEM çalışmaları sonucu ortaya çıkarılabildiği ve bu olayın toksini üreten *Pseudo-nitzschia* yolu ile besin zincirine geçtiği ve bu hayvanları tehdit ettiği belirlenmiştir.

Bu makale, çeşitli ekolojik çalışmalarda yada sistematikte kullanılmak üzere, suda, tüketicilerin mide ve dışkı içeriklerinde gözlenen diyatome früstüllerinin SEM yolu ile tanımlanabilmesi için örneklerin nasıl hazırlanacağı konusunda alternatif bir metodu açıklamaktadır.

Materyal ve Yöntem

Alternatif metodu uygulamak üzere su, mide ve dışkı olmak üzere üç örnek belirlenmiştir. Bu örneklerden su örneği, Pasifik Okyanusu Monterey Körfezi'nde neritik bölgeden yüzeysel plankton çekimleri ile standart 0.60 µm göz açıklığı olan plankton kepçesi kullanılarak, *Pseudo-nitzschia*'nın aşırı üreme olayının gerçekleştiği sırada toplanılmıştır. Mide örneği, aynı ortamdaki 333 µm göz açıklığı olan, 0.7 m BONGO net ile yakalanmış krill örneklerinin midesinden ve dışkı örnekleri de aynı ortamdaki kepçe ile mavi balina (*Balaenoptera musculus*) dışkısından elde edilmiştir. Toplanan örnekler fikse edilmiş, temizlenmiş ve Miller ve Scholin (1998)'in KMnO₄ / HCl oksidasyon metodu değiştirilerek bir seri işlemde geçirilip SEM'de incelenmek üzere hazırlanmıştır. Daha sonra SEM'de izlenen örneklerin fotoğrafları çekilmiştir.

Bulgular

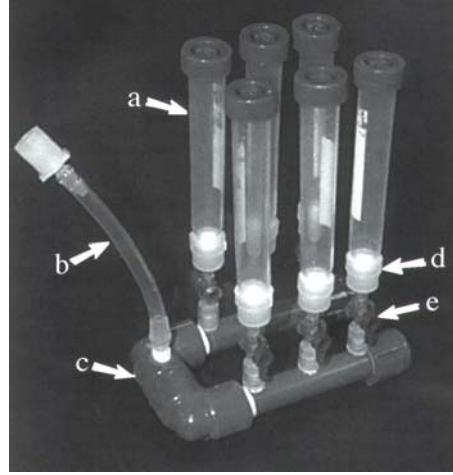
Diyatom früstülleri içeren su, mide ve dışkı örnekleri, SEM'de fotoğraflarının çekilmesine kadar sırasıyla aşağıda açıklanan işlemlerden geçirilmiştir.

Su örneklerinin % 10'luk Lugol (100 ml saf su içinde % 10 KI, % 5 I₂ ve % 10 glacial asetik asit eklenmesi ile

hazırlanır), mide ve dışkı örneklerinin de %5'lik sodyum borat ilave edilmiş %4'lük formaldehit ile fikse edilmiştir.

Örneklerin tuz ya da organik madde gibi 1 yapısının incelenmesini bloke edebilecek maddelerden temizlenmesi işlemi, laboratuarda dizayn edilen Şekil 1'de gösterilen bir filtrasyon aleti ile kolayca yapılmıştır. Örneklerin temizlenme işlemleri sırasıyla aşağıdaki gibi yapılmıştır: a) 1.2 µm göz açıklığı ve 13 mm çapında olan polikarbonat filtreler (Millipore) filtrasyon tüplerine yerleştirilmiş, incelenecek olan deniz suyu veya tatlı su (10 ml), yada sulandırılmış mide ve dışkı örnekleri her bir tüpe eklenip filtre edilerek, örneklerin filtre üzerine konsantre edilmesi sağlanmıştır. Tüm filtrasyon işlemleri alçak vakum basıncında gerçekleştirilmelidir (~150 mm Hg), b) Örnekler 3 kere distile su ile yıkanarak tuzlarından arındırılmıştır, c) Tuzlarından arındırılmış örneklerin organik materyalden de temizlenebilmesi için filtrenin üstünü kaplayacak şekilde 1-2 damla doymuş KMnO₄ eklenmiş, oksidasyon işleminin başlaması için su örnekleri 5, mide örnekleri 20 ve dışkı örnekleri 30 dk bu çözelti içinde bekletilmiştir. Örneklerdeki organik madde miktarları farklı olduğu için çözeltideki bekleme süreleri içerdikleri organik madde miktarı ile orantılı olarak artmaktadır. İncelenen mide ve dışkı örneklerinde daha fazla organik madde içeriği bulunduğundan, oksidasyon işleminin süresi de göreceli olarak değiştirilmiştir, d) Oksidasyon işlemi örneklerin 12 N konsantre HCl ile muamele edilmesi ile tamamlanmıştır. Su örnekleri 3 ml HCl ile, solüsyonun rengi saydamlaşmaya kadar 1-2 kere yıkanmıştır. Mide ve dışkı örnekleri için ise 30 (mide) ve 60 (dışkı) dk bekletilmiş ve tüm örnekler bu işlemin sonunda vakumdan geçirilerek oksidasyon işlemi tamamlanmıştır, e) Oksidasyonun ardından tüm örnekler son bir kez 3 kere

distile edilmiş su ile yıkanmıştır, f) Örnekler tüm organik maddelerden tamamen arındırılmak isteniyorsa, 3. ve 4. basamaklar bu aşamada tekrarlanabilir.

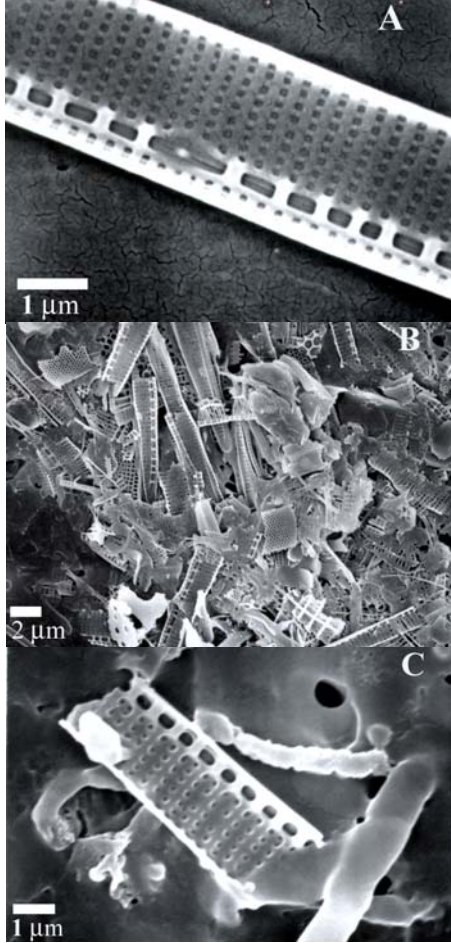


Şekil 1. Elektron mikroskopunda incelenecek örneklerin hazırlanmasında kullanılan filtrasyon aleti. a. Santrifüj tüpleri, b. Vakum bağlantı hortumu, c. PVC Vakum manifoldu, d. Filtre sistemine bağlantı aparatı, e. Tüplere giden havayı kontrol eden valf.

Takiben filtreler tüplerden ayrılarak alüminyum ya da bakırdan yapılmış, üstüne 2 tarafı yapışkanlı bakır elektrotlar konulmuş ve altına örnek bilgileri suda çıkmayan bir kalemle yazılmış yuvarlak tablalara yerleştirilmiştir. Açık havaya maruz bırakılarak veya bir desikatör içinde 24 saat boyunca bekletilerek kurumaya bırakılmıştır. Kurutma işlemini hızlandırmak için örnekler düşük ısıli fırına da konulabilir.

Alüminyum tablalara fikse edilmiş örnekler SEM ile incelemeye hazır hale gelmiştir ancak tabladaki yüzey kontrastını arttırmak için örnekler genelde altın palladium ile de kaplanır. Bu kaliteli bir görüntü almak için dikkatli yapılması gereken önemli bir basamaktır. Şekil 2 A, B, ve C sırası ile suda, krill midesinde ve balina dışkısında incelenmek istenen

Pseudo-nitzschia türlerinin SEM’de çekilmiş fotoğraflarını göstermektedir.



Şekil 2. Suda (A), krill midesinde (B) ve balina dışkıında (C) bulunan *Pseudo-nitzschia* türlerinin SEM’de çekilmiş fotoğrafları. (A) *P. pseudodelicatissima* (B) parçalanmış *P. pseudodelicatissima* (C) parçalanmış *P. pungens*

Tartışma Sonuç

Çeşitli ortamlardan incelemeye aldığımız diyatome früstülleri bu yöntem ile rahatlıkla incelenebilir konuma gelmiştir (Şekil 2 A, B, C). İncelenen mide ve dışkı örnekleri su örneklerine oranla daha fazla

organik madde içerdiğinden, mide ve dışkı örneklerinin oksidasyon işlemi süresi de göreceli olarak modifiye edilmiştir.

Bu çalışma ile suda aşırı üremiş olan ve toksik olabilen *Pseudo-nitzschia*’nın onu tüketen *Euphausiid* (krill) grubuna ve bu vektör organizmadan da direkt olarak mavi balınaya nasıl ulaşabildiği yapılan analizlerle ispatlanabilmiştir. Scanning elektron mikroskobu ile diyatomların ortamlarda var olup olmadığı, çeşitliliği, sınıflandırılması, türler arasındaki farklılıkları ve besin ağındaki etkileşimleri hücre früstüllerinin bu şekilde incelenmesi ile gerçekleştirilebilir.

Teşekkür

Makalenin düzenlenmesinde yaptıkları yardımlardan dolayı Prof Dr. Tufan Koray, Yard. Doç. Dr. Şükran Yalçın ve Yard. Doç. Dr. M. Nisa Ünal’dı’ya teşekkür ederim.

Kaynaklar

- Bates, S. S., C. J. Bird, A. S. W. de Freitas, R. Foxall, M. Gilgan, L.A. Hanic, G.R. Johnson, A.W. McCulloch, P. Odense, R. Pocklington, M.A. Quilliam, P.G. Sim, J.C. Smith, D.V. Subba Rao, E.C.D. Todd, J.A. Walter, and J.L.C. Wright. 1989. Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from eastern Prince Edward Island, Canada. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46: 1203-1215.
- Lefebvre, K. A., C. L. Powell, G.J. Doucette, P.D.R. Moeller, J.B. Silver, P.E. Miller, M.P. Hughes, S. Singaram, M.W. Silver, and R.S. Tjeerdema. 1999. Detection of domoic acid in northern anchovies and California sea lions associated with an unusual mortality event. *Nat. Toxins* 7: 85-92.
- Miller, P., C. A. Scholin. 1998. Identification and enumeration of cultured *Pseudo-nitzschia* using species-specific LSU rRNA-targeted fluorescent probes and filter based whole cell hybridization. *J. Phycol.* 34: 371-382.
- Quilliam, M. A. , J.L.C. Wright. 1989. The

- amnesic shellfish poisoning mystery. *Anal. Chem.* 61 (18): 1053A-1060A.
- Scholin, C. A., F. Gulland, G. J. Doucette, S. Benson, M. Busman, F. P. Chavez, J. Cordaro, E. DeLong, A. DeVogelaere, M. Haulena, K. Lefebvre, T. Lipscomb, S. Loscutoff, L. J. Lowenstine, R. Marin III, P.E. Miller, W. A. McLelland, P.D.R. Moeller, C. L. Powell, T. Rowles, P. Silvagni, M. W. Silver, T. Spraker, V. Trainer, and F. M. VanDolah. 2000. Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. *Nature* 403: 80-84.
- Work, T. M., A. M. Beale, L. Fritz, M. A. Quilliam, M.W. Silver, K. Buck, J. L. C. Wright. 1993. Domoic acid intoxication of brown pelicans and cormorants in Santa Cruz, California, p. 643-649. In: T.J. Smayda and Y. Shimizu [eds.], *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, Amsterdam.