

**Karadeniz'de Chroococcoid Cyanobakteri *Synechococcus* spp; dağılımı, hücre boyu, pigment yapısı, büyümeye ve gün boyu değişimler**

Zahit UYSAL

Deniz Bilimleri Enstitüsü, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, P.K. 28 33731 Erdemli

**ÖZET**

Bu çalışmada, spektrometre, epifluoresan mikroskop ve flow-sitometre kullanılarak batı ve güney Karadeniz'de ilk kez, fikoeritrin içeren tek hücreli cyanobakteri *Synechococcus* spp.'nın pigment yapısı, hücre boyu, bolluk dağılımı ve büyümeye hızları saptanmıştır. Çalışılan her istasyon ve derinlikte hücreler farklı bolluluklarda bulunmuşlardır. Nisan-Mayıs 1994'te batı Karadeniz'de, yüzey karışım tabakasında, hücreler, direkt Tuna nehri etkisi altındaki kıyı bölgelerde oranla açık sularda daha bol olarak gözlemlenmişlerdir. Bu dönemde en düşük ve en yüksek hücre sayımları yüzeyde  $9 \times 10^2$  ve  $1.45 \times 10^3$  hücre/ml, klorofil alt maksimum tabakasında  $2 \times 10^3$  ve  $1.2 \times 10^5$  hücre/ml, ve nitrit maksimum tabakasında  $1.3 \times 10^2$  ve  $3.5 \times 10^2$  hücre/ml düzeylerinde bulunmuştur. Buna karşın Eylül-Ekim 1996 döneminde Türkiye münhasır ekonomik alan sularında yapılan araştırmalarda hücrelerin açık sulara oranla kıyılarda daha bol olduğu saptanmıştır. En düşük ve en yüksek hücre sayımları yüzeyde  $3.7 \times 10^4$  ve  $2.1 \times 10^5$  hücre/ml, klorofil alt maksimum tabakasında  $3.6 \times 10^4$  ve  $5.2 \times 10^5$  hücre/ml, ve klorofil minimum tabakasında  $1.97 \times 10^3$  ve  $3.25 \times 10^4$  hücre/ml düzeylerinde bulunmuştur. Hücre bolluğu ile ortam fiziko-kımyasal parametreleri arasında yüksek korelasyon bulunmuştur. Epifluoresan mikroskop altında yapılan hücre sayımları ve gözlemlerinde alt klorofil maksimum tabakasında (in-situ fluorometre verilerine dayanarak) hücrelerin yüzey ve daha derinliklerde oranla daha parlak ve uzun süreli fluoresans özellikleri gösterdikleri saptanmıştır. Karadeniz su örneklerinden izole edilen toplam 64 klon üzerinde yapılan spektral çalışmada tamamının fikorobilin içermemeyen ve buna karşın tip 2 fikoeritobilin içeren türlerden oluştuğu saptanmıştır. Bütün klonlarda fikoeritobilin'in in vivo fluoresans emisyon maksimaları benzer olup yaklaşık 578 nm civarında bulunmaktadır. Bütün klonlar, içerdikleri Chl-a nedeni ile 435 ve 442 nm ile 681 nm'de in vivo absorbsiyon maksima göstermişlerdir. Hücre boyu dağılımı için flow-sitometre ortalama ileri ışık yayını verilerinden (mean forward light scatter data) yüzey karışım tabakasındaki (0-10 m) hücrelerin daha derinliklerde (20-60 m) oranla daha büyük oldukları anlaşılmıştır. In vivo fluoresans ölçümlerine dayalı büyümeye hızı çalışmalarında farklı derinliklerden elde edilen klonlar arasında farklılıklar gözlenmiştir. Sahada hücre sayımlarının zaman içinde dağılımları incelendiğinde Karadeniz *Synechococcus* spp. populasyonunun gece yarısından öğlene deşin süreçte otlanma baskısı altında olduğu, öğleden sonra akşam boyunca baltınerek çoğaldığı görülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Synechococcus* spp, Karadeniz, pigment, boy, dağılım, büyümeye, otlanma, flow-sitometri, epifluoresans mikroskopi, spektrometri,

**Chroococcoid Cyanobacteria *Synechococcus* spp. in the Black Sea:  
pigments, size, distribution, growth and diurnal variability**

**ABSTRACT**

Phycerythrin-containing unicellular cyanobacteria *Synechococcus* spp. were studied for the first time during April-May, 1994 and September-October, 1996 in the western and southern Black Sea for its pigments, size and abundance distribution via spectrometry, epifluorescence microscopy and flow-cytometry. Abundance distribution at surface mixed layer in April-May 1994 revealed that cells were more concentrated in offshore waters than the coastal regions under direct influence of Danube river. However, in the south, higher surface cell concentrations were characteristic of the nearshore areas in September-October 1996. Highly significant correlation was observed between cell abundance and ambient physico-chemical parameters with depth. Visual inspection of the individual cells under epifluorescent microscope revealed that cells at subsurface chlorophyll-a maximum layer (SCML - based on in-situ fluorometer readings) reflect brighter and longer fluorescence than the ones at surface and at lower depths. Spectral properties of total 64 *Synechococcus* spp. clonal isolates from different depths within the euphotic layer (about top 60 m) in the southern Black Sea coast showed that, all

have type 2 Phycoerythobilin in common, lacking phycourobilin. In vivo fluorescence emission maxima for the phycoerythobilin were about the same (~578 nm) for all isolates. All isolates had in vivo absorption maxima at between 435 and 442 nm and at about 681 nm due to Chl-a. It was shown from the flow cytometer mean forward light scatter data for size distribution that cells at surface mixed layer (0-10 m) were larger in size than the cells at lower depths (20-60 m). Based on in vivo fluorescence measurements, significant differences in the acclimated growth rates of clones from different depths are observed. Time versus cell count plots have shown that cells of cyanobacterium *Synechococcus* spp. are under grazing pressure starting from midnight till noon and begin slowly to rebuild its population in the afternoon via dividing throughout the evening.

**Key Words:** *Synechococcus* spp, Black Sea, pigments, size, distribution, growth, grazing, flow-cytometry, epifluorescence microscopy, spectrometry.

**GİRİŞ**

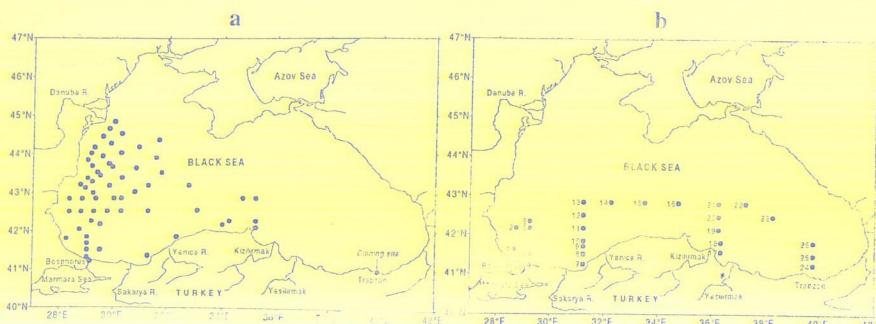
Pikoplanktonik cyanobakteri *Synechococcus* spp. okyanus sularında, özellikle de Akdeniz gibi oligotrofik denizlerde (Li ve ark., 1993; Magazzu ve Decembrini, 1995; Agawin ve Agusti, 1997) toplam fotosentetik biyokütlenin oluşumunda önemli katkılar yapmaktadır (Berman, 1975; Waterbury ve ark., 1979; Johnson ve Sieburth, 1979; Li ve ark., 1983; Platt ve ark., 1983; Takahashi ve Bienfang, 1983; Iturriaga ve Mitchell, 1986; Glover ve ark., 1986; Booth, 1988; Li ve ark., 1992). Bu grup aynı zamanda hızlı büyümeye özelliğine sahiptir (Bienfang ve Takahashi, 1983; Douglas, 1984; Landry ve ark., 1984). Pikoplankton grubu içinde ilk olarak fikoeritrin içeren tek hücreli cyanobakteri *Synechococcus* bulunmuştur (Waterbury ve ark., 1979; Johnson ve Sieburth, 1979). Bu grup fotosentez yapmakta olup kamçı içermemekte ve fizyolojik ve ekolojik açıdan ökaryotik, sitolojik açıdan prokaryotik özelliklere sahiptir. Oligotrofik okyanus sularında bu grup fotosentetik karbon fiksasyonunun yaklaşık %25'ini (Waterbury ve ark., 1986) ve Kuzey Pasifik Okyanusunda toplam fotosentezin %64'ünü gerçekleştirmektedir (Iturriaga and Mitchell, 1986). Denizel *Synechococcus*'ların in vivo spektral özellikleri 3 major pigment grubunun; fikoeritrin içermeyen, fikoeritinde hem fikoeritobilin hem de fikorobilin içeren ve fikoeritinde sadece fikoeritobilin içeren grubun varlığını göstermiştir (Wood ve ark., 1985)..

**MATERIAL ve METODLAR**

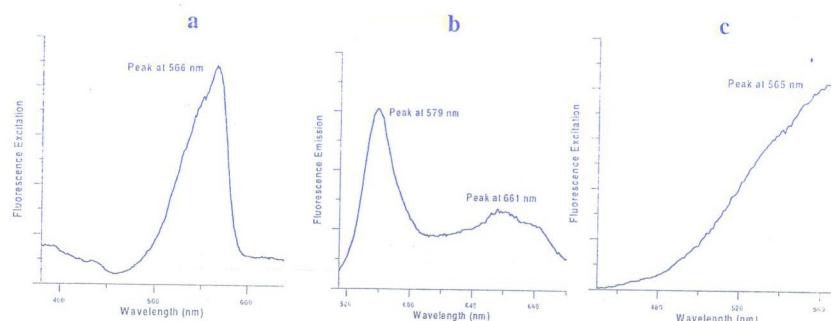
Bu çalışmanın özünü oluşturan örnekler Batı ve Güney Karadeniz'den Nisan-Mayıs 1994 (Şekil 1a) ve Eylül-Ekim 1996 (Şekil 1b) dönenlerinde ODTÜ-Deniz Bilimleri Enstitüsüne ait R/V Bilim gemisi ile toplanmıştır. Cyanobakteri örnekleri yüzey karışım, alt klorofil maksimum, klorofil minimum ve nitrit maksimum derinliklerinden CTD probuna bağlı kapama şişeleri aracılığı ile toplanmıştır. Örnekler 100 ml'lik şişeler içinde yüzde 4'lük formalin ile saklanmış ve daha sonra laboratuvara 25 mm çaplı, siyah, polikarbonat, 0,2 µm göz açıklıklı nucleopore membran filtreler üzerine süzülmüştür (10 ml). Filtreler daha sonra lam lamel arasına immersiyon yağı ile sabitleştirilerek epifluoresans mikroskopu altında 1000X büyütmede hücre sayımları yapılmıştır. Klonlaştırma işlemleri için canlı örnekler ayrıca Trabzon açıklarından toplanmıştır. Bu çalışmada hücre boyları FACSort Becton Dickinson flow-cytometer, pigment yapısına ait in vivo fluoresans emisyon and eksitasyon spektraları SLM Aminco Bowman Series 2 Luminesans Spektrometresi ile ve in vivo absorbsiyon spektraları Beckman DU 640 Spektrofotometre ile ölçülmüştür.

**SONUÇLAR ve TARTIŞMA**

Karadeniz'den elde edilen eksponentiyel büyümeye fazındaki *Synechococcus* klonu BS021 için fluoresans emisyon ve eksitasyon spektralleri şekil 2'de verilmektedir. Tüm Karadeniz klon-larına (64 adet) ait spektral özellikler Tablo 1'de verilmiştir. Bütün klonlarda fikoeritobilin kromoforlarında maksimum absorbsiyon olduğu 545 nm'de eksitasyonda, fluoresans emisyon maksimumu 578±1 nm'de bulunmaktadır. 578 nm'de fikoeritrin emisyonunda eksitasyon maksimumu 566±1 nm dolayında bulunmaktadır.



Şekil 1a,b. Kardeniz'de Nisan-Mayıs 1994 (a) ve Eylül-Ekim 1996 örnekleme istasyonları.

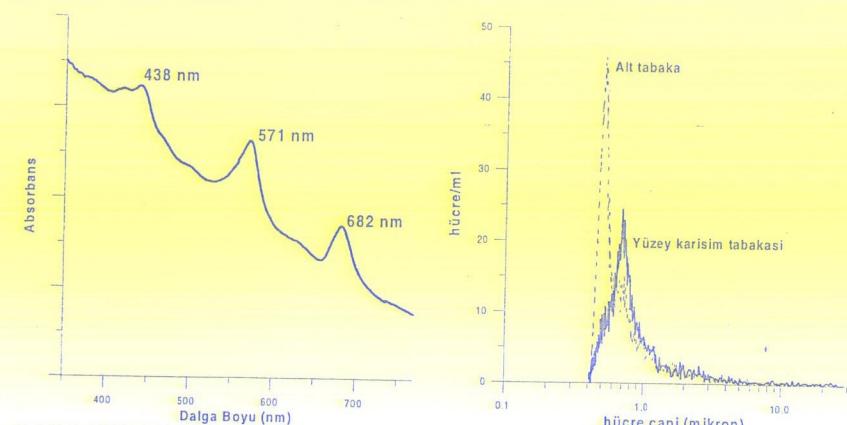


Şekil 2. 680 nm'de Chl-a emisyonu için enerji-düzeltilmiş fluoresans eksitasyon spektrumu (a) 545 nm eksitasyonda fluoresans emisyon spektrumu (b) 578 nm'de fikoeritrin emisyonu için eksitasyon spektrumu (c).

*Synechococcus* klonu BS021 için in vivo absorbşyon spektrumu Şekil 3'de verilmektedir. Araştırılan tüm klonlar klorofil-a içerikleri nedeni ile 435-442 nm arası ile 681 nm'de absorbşyon maksima vermişlerdir. Karadeniz klonlarında mevcut fikoeritrobilin için in vivo absorbşyon maksima  $570 \pm 1$  nm civarında bulunmuştur.

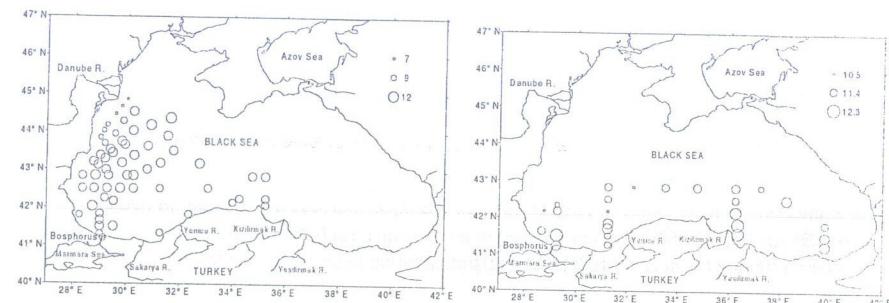
Tablo 1. Karadeniz *Synechococcus* spp. spektral karakteristikleri.

Ana fikobiliprotein	Fikoeritrobilin
In vivo fluoresans emisyon maksimum (tüm derinliklerin ortalaması)	
0 - 60 m	$578 \pm 1$ ( $n = 64$ )
578 nm'de in vivo fluoresans emisyonu için eksitasyon maksimumu	
0 - 60 m	$566 \pm 1$ ( $n = 64$ )
In vivo absorbşyon maksimumu	
0 - 30 m	$570 \pm 1$ ( $n = 31$ )



Şekil 3. BS021 klonuna ait in vivo absorbşyon spektrumu

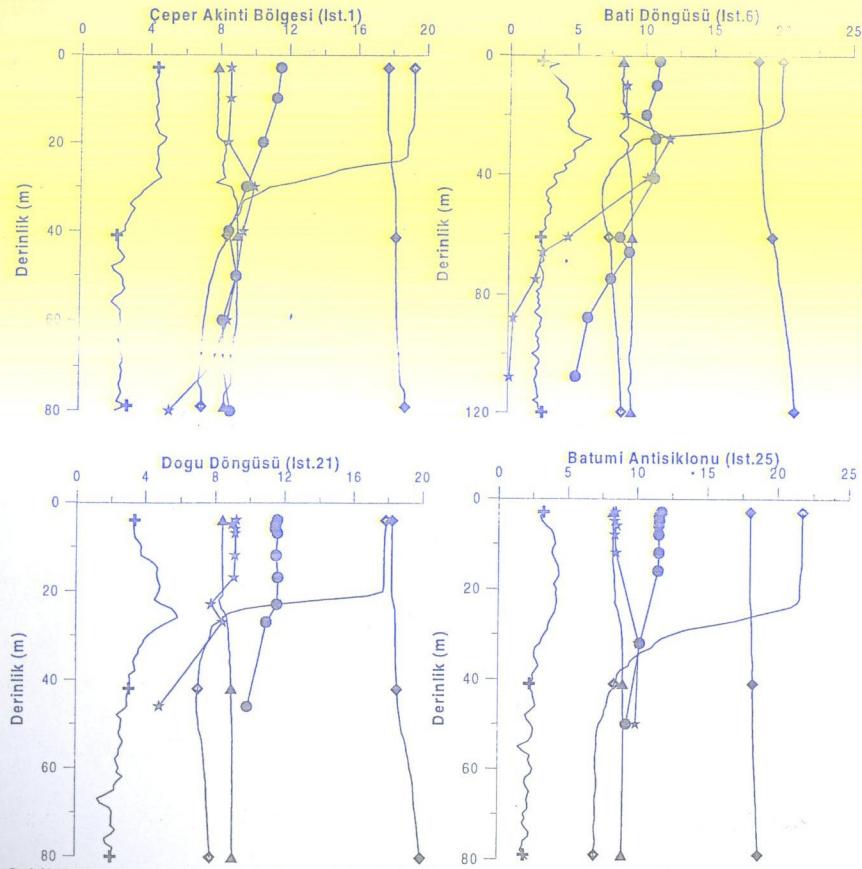
Flow sitometre analizleri hücre boyalarının derinlikle net bir şekilde değiştigini ve yüzey karışım tabakasındaki hücrelerin alt derinliklere oranla daha büyük olduğunu göstermiştir (Şekil 4). Nisan-Mayıs 1994 döneminde Batı Karadeniz'de farklı derinliklerden toplam 101 örnekte yapılan hücre sayımlarında en küçük ve en yüksek hücre sayımları yüzeyde  $9 \times 10^2$  -  $1.45 \times 10^3$  hücre/ml, klorofil alt maksimum derinliğinde  $2 \times 10^3$  -  $1.23 \times 10^5$  hücre/ml ve nitrit maksimum derinliğinde  $1.3 \times 10^2$  -  $3.5 \times 10^2$  hücre/ml düzeylerinde bulunmuştur. Bu dönemde direkt Tuna Nehri etkisi altındaki bölgelerde hücreler daha seyrek ve açıklara doğru merkez döngüde daha yoğun olarak bulunmuştur (Şekil 5).



Şekil 4. Yüzey karışım tabakası ve alt derinliklerde hücre boyaları dağılımı

Eylül-Ekim 1996 döneminde Güney Karadeniz'de yapılan hücre sayımlarında en küçük ve en yüksek hücre sayımları yüzeyde  $3.73 \times 10^4$  -  $2.11 \times 10^5$  hücre/ml, klorofil alt maksimum derinliğinde  $3.63 \times 10^4$  -  $5.19 \times 10^5$  hücre/ml ve klorofil minimum derinliğinde  $1.97 \times 10^3$  -  $3.25 \times 10^4$  hücre/ml düzeylerinde bulunmuştur.

Farklı bölgeler için derinlikle *Synechococcus* spp. sıklığında görülen değişimler Şekil 6'da verilmektedir.



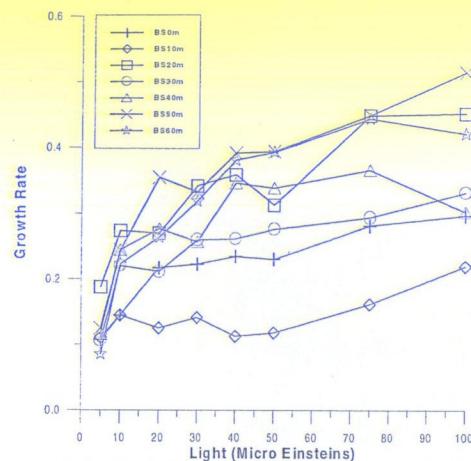
Şekil 6. Karadeniz'de farklı bölgeler için derinlikle *Synechococcus* spp. bolluğu (In hücre sayısı/ml) (●) sıcaklık °C (◇), tuzluluk (◆), çözünmüş oksijen ml/l (★), yerinde fluoresans (+), ve ışık geçirgenliğinde (% değerin 10%) (▲) değişimler.

Tablo 2. Hücre sayımları ile fiziksel ve kimyasal parametreler arasındaki ilişki (Spearman'ın Rank Korelasyon Katsayıları kullanılmıştır).

	Sıcaklık	Tuzluluk	Çöz. Oksijen	Derinlik	Zaman
Hücre Bolluğu	.6695 117 .0000	-.6298 117 .0000	.3307 117 .0004	-.7164 117 .0000	.0548 117 .5552
	Fosfor	Azot	Silik	Fluoresans	Chl-a
Hücre bolluğu	-.2980 * 117 ** .0013 ***	-.6761 117 .0000	-.5947 117 .0000	.7132 117 .0000	.6880 46 .0000
*Korelasyon Katsayısı	** Örnek Sayısı	*** Hassasiyet Derecesi			

Ortam fiziko-kimyasal parametreleri ile hücre sayımları arasında yüksek korelasyon ( $r>P_{0.01}$ ) bulunmaktadır (Tablo 2). Hücre sayımları ile tuzluluk, derinlik ve besin tuzları (fosfat, nitrat ve silikat) arasında eksik bir ilişki görülmüştür, yani hücre sayımları derinlikle azalırken diğerleri artmıştır. Hücre sayımları ile sıcaklık, çözünmüş oksijen, yerinde fluoresans ve klorofil-a arasında artı bir ilişki saptanmıştır, kısaca derinlikle hepsi bir harmoni içinde azalma göstermektedir.

Farklı derinliklerden elde edilen saf kültürler (klonlar) arasında büyümeye hızlarında önemli farklılıklar (student's t test) gözlenmiştir (Şekil 7).



Şekil 7. Farklı derinliklere ait *Synechococcus* klonlarının artan ışıkla ( $\mu\text{Einst m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) büyümeye hızları.

Sahada hücre sayımlarının zaman içinde dağılımları incelendiğinde Karadeniz *Synechococcus* spp. populasyonunun gece yarısından öğlene deşin süreçte otlanma baskısı altında olduğu, öğleden sonra akşam boyunca bölünerek çoğaldığı görülmektedir.

**TEŞEKKÜR:** Bu çalışmada teorik ve teknik açıdan yardımlarını esirgemeyen Dr. Michelle Wood'a (Oregon Üniversitesi, USA), Dr. W. K. W. Li'ye (Bedford Oşinografi Enstitüsü) içtenlikle teşekkür ederim. Çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (YDABCAG-352).

**NOT:** Referanslar gerektiginde yazdan istenebilir