



**MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI**

***SPİRULİNA PLATENSİS* (CYANOPHYTA)'İN GELİŞİMİNE SUNİ LİGAND
EDTA (ETHYLENEDİAMİNETETRAACETATE) VE İKİ FARKLI FE
(FE⁺² VE FE⁺³) FORMUNUN ETKİSİ**

ŞUĞLE DOĞANAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Antakya/HATAY

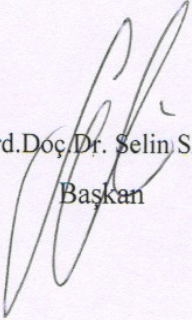
HAZİRAN-2009

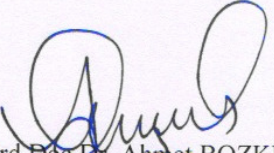
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

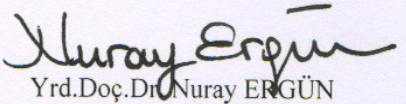
***SPIRULİNA PLATENSİS* (CYANOPHYTA)'İN GELİŞİMİNE SUNİ LİGAND
EDTA (ETHYLENEDİAMİNETETRAACETATE) VE İKİ FARKLI FE (FE⁺² VE
FE⁺³) FORMUNUN ETKİSİ**

ŞUĞLE DOĞANAY
YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

Yrd.Doç.Dr. Selin SAYIN danışmanlığında hazırlanan bu tez 17/06/2009 tarihinde
aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.


Yrd.Doç.Dr. Selin SAYIN
Başkan


Yrd.Doç.Dr. Ahmet BOZKURT
Üye


Yrd.Doç.Dr. Nuray ERGÜN
Üye

Bu tez Enstitümüz Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof.Dr.Bünyamin YILDIZ
Enstitü Müdürü V.

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak
gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	III
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
1. GİRİŞ.....	1
1.1. <i>Spirulina platensis</i> 'in Genel Özellikleri.....	2
1.2. Fikosiyanin ve Önemi.....	4
1.3. Demir ve EDTA.....	5
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	10
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	16
3.1. Materyal.....	16
3.1.1. <i>Spirulina platensis</i>	16
3.1.2. Araştırmada Kullanılan Kimyasallar.....	16
3.1.3. Araştırmada Kullanılan Ekipmanlar.....	18
3.2. Yöntem.....	18
3.2.1. Araştırmada Kullanılan Kapların Temizliği ve Sterilizasyonu.....	18
3.2.2. <i>Spirulina platensis</i> Stok Kültürleri.....	19
3.2.3. Deneme Ortamlarının hazırlanması.....	19
3.2.4. Denemenin Kurulması ve Yürütülmesi.....	19
3.2.5. Araştırma Süresince Takip Edilen Parametreler.....	21
3.2.5.1. pH Ölçümleri.....	21
3.2.5.2. Pigment Analizleri.....	21
3.2.5.2.1. Fikosiyanin Analizi.....	21
3.2.5.2.2. Klorofil-a Analizi.....	22
3.2.5.3. Yaş ve Kuru Madde Tayini.....	22
3.2.5.4. Optik Yoğunluk (OD).....	23
3.2.5.5. Spesifik Büyüme hızı (μ =bölünme gün ⁻¹).....	23

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	24
4.1. Araştırma Bulguları.....	24
4.1.1. Optik Yoğunluk Değerleri.....	24
4.1.2. Klorofil-a Miktarları ($\mu\text{g/ml}$).....	26
4.1.3. pH Değerleri.....	27
4.1.4. Fikosiyanin ($\mu\text{g/ml}$) Değerleri.....	28
4.1.5. Kuru madde (g/L) Değerleri.....	29
4.1.6. Büyüme hızı ($\mu=\text{bölünme gün}^{-1}$).....	30
4.2. Tartışma.....	30
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	35
KAYNAKLAR.....	36
TEŞEKKÜR.....	40
ÖZGEÇMİŞ.....	41

ÖZET

***SPİRULİNA PLATENSİS* (CYANOPHYTA)'İN GELİŞİMİNE SUNİ LİGAND EDTA (ETHYLENEDİAMİNETETRAACETATE) VE İKİ FARKLI FE (FE⁺² VE FE⁺³) FORMUNUN ETKİSİ**

Bu çalışmada, *Spirulina platensis* kültürlerinde iki farklı demir formu (Fe⁺² ve Fe⁺³) ile yapay ligand EDTA (Etilendiamin tetraasetikasit)'nin, optik yoğunluk (O.D), klorofil-a miktarı (µg/ml), kuru madde (g/L), pH değişimi, büyüme hızı (µ=bölünme/gün) ve fikosiyanın gibi büyüme parametrelerinin değişimine olan etkileri araştırılmıştır.

Çalışma süreci sonucunda deneme gruplarına ait elde edilen en yüksek değerler sırasıyla: optik yoğunluk; Fe⁺³ + EDTA'sız 2B grubu (1,901) ve Fe⁺² + EDTA'sız 2A (1,695), pH; 2A (10,03) ve 2B (10,00), kuru madde miktarı; 2B (2,733 g/L) ve 2A (2,600 g/L), klorofil-a miktarı; 2B (18,296 µg/ml) ve 2A (17,166 µg/ml), fikosiyanın miktarı; 2A (73,416 µg/ml), kontrol grubu (62,125 µg/ml) ve 2B (56,750 µg/ml) olarak belirlenmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen verilerden, *S.platensis*'in gelişimine, ortamda EDTA bulunmadığında, Fe⁺² ve Fe⁺³ formunun etkili olduğu belirlenmiştir.

2009, 50 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Spirulina platensis*, fikosiyanın, ligand, Fe⁺², Fe⁺³, EDTA

ABSTRACT**THE EFFECT OF TWO DIFFERENT FE FORMS (Fe⁺² AND Fe⁺³) AND ARTIFICIAL LIGAND EDTA (ETHYLENEDIAMINETETRAACETATE) ON THE GROWTH OF *SPIRULINA PLATENSIS* (CYANOPHYTA)**

This study aims to investigate the effect of two different Fe forms (Fe⁺² and Fe⁺³) and of artificial ligand, EDTA (Ethylenediaminetetraacetate) on the growth parameters of *Spirulina platensis* (Cyanophyta) including optical density (O.D), amount of chlorophyl-a (µg/ml), dry matter (g/L), pH value, growth rate (µ=division/day) and C-phycocyanin content (µg/ml).

Maximum values obtained from the experimental groups handled in the study for several parameters were as follows; optical density for Fe⁺³ + group 2B without EDTA and for Fe⁺² + group 2A without EDTA respectively 1,901 and 1,695; pH for group 2A and group 2B respectively 10,03 and 10,00; Dry matter for group 2B and grup 2A respectively 2,733 g/L and 2,600 g/L; The amount of chlorophyl-a for group 2B and group 2A respectively 18,296 µg/ml and 17,166 µg/ml; Phycocyanin amount for group 2A, control group and group 2B respectively 73,416 µg/ml, 62,125 µg/ml and 56,750 µg/ml. According to the results, Fe⁺² and Fe⁺³ forms were found to be more effective in absence of EDTA on the growth of *S.platensis*.

2009, 50 pages

Key Words: *Spirulina platensis*, phycocyanin, ligand, Fe⁺², Fe⁺³, EDTA

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

PC	Fikosiyenin
A-PC	Allofikosiyenin
R-PC	R- fikosiyenin
Fe	Demir
$Fe^{+2}[Fe(II)]$	Demir(II)
$Fe^{+3}[Fe(III)]$	Demir(III)
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
CTDA	Sikloheksalindiamin tetraasetikasit
DTPA	Dietilentriamin epantaasetikasit
NTA	Nitrilo triasetikasit
O.D	Işık geçirgenliği (optik yoğunluk)
RPM	Mekanik devir hızı
°C	Santigrad derece
%	Yüzde
s	Saniye
m	Metre
nm	Nanometre
μm	Mikrometre
M	Molar
μM	Mikromolar
nM	Nanomolar
nmol	Nanomol
μmol	Mikromol
μ	Büyüme hızı
g	Gram
mg	Miligram
μg	Mikrogram
kg	Kilogram
L	Litre
ml	Mililitre

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1.1. <i>Spirulina platensis</i> 'in Sistematikteki Yeri	3
Çizelge 3.1.2. Denemede Kullanılan <i>Spirulina</i> Ortamı (Zarrouk, 1966).....	17
Çizelge 3.2.3. Denemede kullanılan gruplar ve muameleleri.....	19
Çizelge 4.1.1. Denemede ölçülen parametrelere ait ölçüm ortalamaları.....	25
Çizelge 4.1.6. Deneme gruplarına ait büyüme hız (μ =bölünme gün ⁻¹) miktarları.....	30
Çizelge 4.2. Denemede uygulanan parametrelere göre grupların kodlaması.....	31

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1. <i>Spirulina platensis</i> (Cyanophyta) Görünümü (Entwisle ve ark., 1997).....	2
Şekil 1.1. <i>Spirulina</i> ' dan elde edilen fikosiyanın (orijinal).....	4
Şekil 3.1.1. <i>Spirulina</i> Flamentlerinin Görünümü (Anonim, 2009a).....	16
Şekil 3.2.4. Deneme düzeneği (orijinal)	20
Şekil 4.1.1. Deneme gruplarına ait Optik yoğunluk (O.D) değerleri.....	24
Şekil 4.1.2. Deneme gruplarına ait Klorofil-a ($\mu\text{g/ml}$) değerleri.....	26
Şekil 4.1.3. Deneme gruplarına ait pH değerleri.....	27
Şekil 4.1.4. Deneme gruplarına ait Fikosiyanın ($\mu\text{g/ml}$) değerleri.....	28
Şekil 4.1.5. Deneme gruplarına ait Kuru madde (g/L) değerleri.....	29

1. GİRİŞ

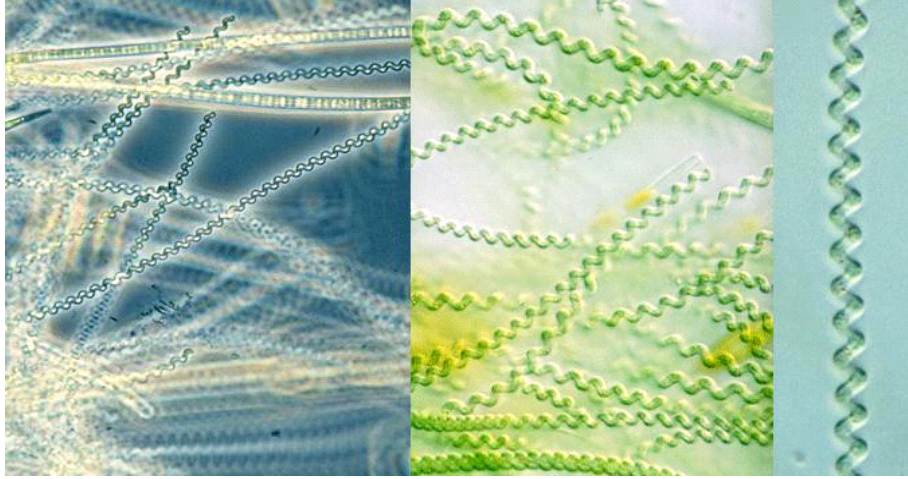
Günümüzde dünya nüfusu hızla artmakta, betonlaşma tarım alanlarını daraltmakta ve kişi başına düşen gıda miktarının gittikçe azaldığı gözlenmektedir. Diğer taraftan bu hızlı olumsuz değişimle doğal gıda kavramından uzaklaşmaktadır. Bu nedenle, ilerleyen teknoloji ve sanayileşme ile beraber gelen değişim, insanları alternatif sürdürülebilir yeni gıda ve enerji kaynakları arayışına yönlendirmektedir (Becker, 1994).

Alternatif doğal besinlerden biri olan algler, insanı da içine alan karasal ve sucul canlılarda tamamlayıcı gıda ve pigment kaynağı olarak kullanılabilirler.

Algler, fotosentez yapabilen gerçek anlamda kök, gövde, yaprak gibi organlardan yoksun olan ve damar sistemi bulunmayan bitkisel formlardır. Genellikle su içinde yetişmekle birlikte karada da görülmektedirler. Büyüklükleri birkaç mikron ile 60–65 metre (m) arasında değişen ve yaklaşık 25 bin türü olan klorofilli bitkilerdir.

Mikroalglerden elde edilen metabolitler mikrobiyal teknolojinin birincil çalışma alanını oluşturmaktadır. Mikroalgler hücre içinde biriktirdikleri pigment, protein, karbonhidrat, yağ, vitamin ve mineral maddeler nedeniyle birçok canlı grubu için esansiyeldirler. Bu maddeler; farmasotik ve nutrasotik olarak metabolitler ismi ile anılırlar (Becker, 1994). Algler yüksek protein ve yağ içerikleri ile biyoteknoloji çalışmalarında aranan değerli kültür organizmalarıdır. Yetiştiricilik için elverişli olmalarını sağlayan yüksek adaptasyon yeteneği gibi pek çok özelliğe sahiptirler. Bu özellikleri dikkate alınarak, yığın kültür çalışmalarında tercih edilen türler incelendiğinde, Cyanophyta üyesi *Spirulina platensis* dikkati çekmektedir (Şekil 1).

Zengin besin içeriği ile *Spirulina platensis* 1990'lı yılların süper besini olarak tanımlanmış, yüksek ticari değeri nedeniyle yoğun araştırmaların yapılmasına neden olmuştur (Richmond, 1986; Fox, 1996).



Şekil 1. *Spirulina platensis* (Cyanophyta) Görünümü (Entwisle ve ark., 1997)

Spirulina'nın yapısında bulunan fikosiyenin (PC) kuru ağırlığının yaklaşık %20'si kadardır. Fikosiyenin gıda ve kozmetik sanayilerinde doğal bir renk maddesi olarak kullanılmakta (Cohen, 1997; Sarada ve ark., 1998) aynı zamanda A vitamininin provitamini olan β -karoten de (yaklaşık 2000IU/g) içermektedir (Fox, 1983).

1.1. *Spirulina platensis*' in Genel Özellikleri

Spirulina platensis M2 suşu, Cyanophyta filumunun Nostocales takımı Oscillatoriaceae familyası içerisinde yer alır ve uzunluğu yaklaşık 110 mikrometre (μm) olan filamentlere sahiptir. Filamentler birbirinden bağımsız, serbest olarak bulunurlar ve kayma hareketi gösterirler (Vonshak, 1997). Düz ve spiral haldeki iplikçikler dallanmamış, silindirik hücrelerden oluşmuştur. Hücre çapları türlere göre değişmekte, küçük boyutlu türlerde 1–3 μm arasında, daha büyük türlerde ise 3–12 μm arasındadır. *Spirulina*, çok hücreli, ipliksi, prokaryotik bir mikroalgdir. Mavi-yeşil algler olarak tanınan *Spirulina*, mitokondri, çekirdek, golgi cisimciği, endoplazmik retikulum ve kofullarının olmaması nedeniyle prokaryotik olarak tanımlanmakta ve benzer hücre çeperine sahip olmaları nedeniyle bakterilere benzetilmektedir. *Spirulina platensis* türünde granüler bir sitoplazma ve gaz vakuelleri bulunmaktadır (Richmond, 1986), (Çizelge 1.1.).

Çizelge 1.1. *Spirulina platensis*'in Sistematikteki Yeri

Alem	Monera
Filum	Cyanophyta
Sınıf	Cyanophyceae
Takım	Nostocales
Familya	Oscillatoriaceae
Cins	<i>Spirulina</i> (Turpin, 1829)
Tür	<i>Spirulina platensis</i> (Geitler, 1925)

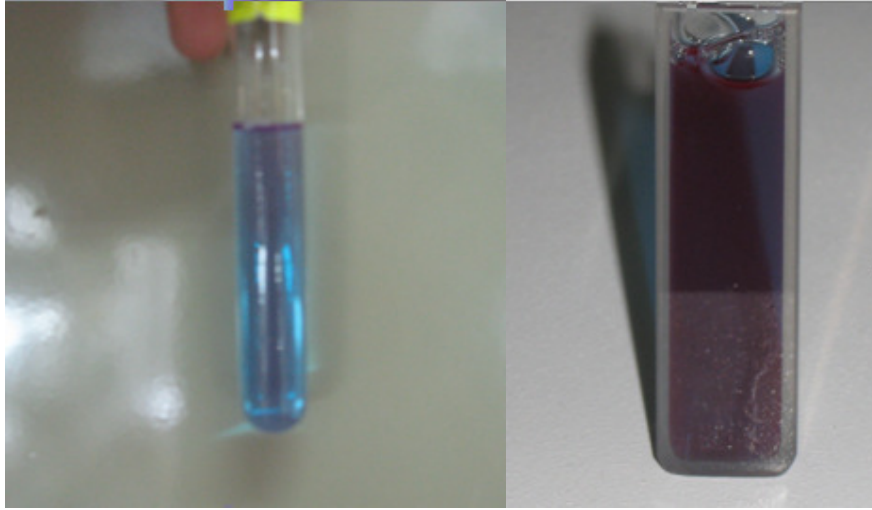
Spirulina'da hücre duvarı sellüloz içermeyen kolaylıkla sindirilebilen mukopolisakaritlerden meydana gelir ve bakterilerde olduğu gibi 4 katlı tabakadan oluşur. Müsilaj yapıdaki hücre duvarı çok ince olup yaklaşık 40-60 nm kalınlığında ve bu ince hücre duvarında % 20 oranında karbonhidrat ve şeker bulunmaktadır. Hücre duvarını oluşturan tabakaların başlıca yapısını peptidoglikan (mürein) tabakası oluşturur. Hücre duvarının en dış tarafı lipopolissakarit tabakadan oluşur. Hücre duvarının altında sitoplazmayı çevreleyen plasma membranı (plasmalemma) yer almaktadır. Hücrenin kenar bölgeleri çoğunlukla polyglukan ve gaz vakuollerinin yer aldığı, düşük elektron yoğunluğuna sahip sitoplazma ile karakteristiktir. Sitoplazmada glikojen granülleri, siyanofisin granülleri, fibriller ve yağ damlacıkları da bulunmaktadır. Tilakoidler sitoplazma merkezi ile kenarı arasında paralel dizilmiş ve fikobilizomlarla birleşmiş ve üzerlerinde fotosentetik aparatları içerirler. Düşük elektron yoğunluğuna sahip olan tilakoidlerin boş olanlarında ribosom, DNA fibrilleri ve küçük lipid damlacıkları yer almaktadır (Boussiba ve Richmond, 1979).

Spirulina'nın, % 60'ını bitkisel protein içermektedir ve ayrıca esansiyel vitaminler ve antioksidantlar, β -karoten, sülfolipitler, glikolipitler ve polisakaritler gibi besleyici maddeler yanında nadir bulunan esansiyel yağ asitlerinden biri olan gamalinoleikasiti (GLA) de içermektedir. Proteinleri genellikle tam olarak sindirilir ve asimile edilir. *Spirulina*; karotenoid (turuncu), fikosiyenin (mavi) ve klorofil (yeşil) pigmentlerini taşıyan mavi-yeşil algdir. Yeşil renkli klorofil ile yardımcı pigment olan mavi renkli fikosiyenin ve allofikosiyenin kırmızı renkli fikoeritrin tarafından maskelenmesiyle kırmızı olarak görülebilmektedir (Henrikson, 1993) .

1.2. Fikosiyanin ve Önemi

Spirulina'da fikosiyanin, klorofil ve karotenoidler gibi başlıca pigmentler bulunmakta ve bu pigmentler, canlı metabolizmasında çok sayıda enzimin sentezlenmesine yardımcıdırlar. (Boussiba ve Richmond, 1979).

Mavi - yeşil alglerde bulunan fikosiyanin fikobilinlerden meydana gelmektedir. Fikobilinler, fotosentezde görevlidir ve sadece alglerde bulunurlar. Kırmızı alglerde bulunan ve kırmızı renkli fikobiline "fikoeritrin"; mavi- yeşil su yosunlarında bulunan mavi-yeşil renkli fikobiline "fikosiyanin" denir. Fikosiyanin çeşitleri; fikoeritrin, fikosiyanin, allofikosiyanin, fikoeritrosiyenin'dir. Bu pigmentler fotosentezde kullanılan ışık enerjisinin soğurularak klorofile aktarılmasında rol oynarlar (Zhou ve ark., 2005), (Şekil 1.1.).



Şekil 1.1. *Spirulina*'dan elde edilen fikosiyanin (orijinal)

Spirulina'nın yapısında bulunan fikosiyanin, demir içeren en önemli pigmenttir. Fikosiyanin pigmenti, suda çözünen mavi renkte bir pigment olup, *Spirulina*'nın protein kompozisyonunun % 20'den fazlasını oluşturmaktadır. Ayrıca fikosiyanin, *Spirulina*'nın tüm ağırlığının % 14'ünü oluşturan ve en yüksek absorpsiyonu 620 nm olan bir pigmenttir (Ciferri, 1983; Cohen, 1997).

Boussiba ve Richmond (1980), fikosiyenin'in *Spirulina*'da depo besin maddesi olarak görev yaptığını belirtmişlerdir. Fikosiyenin dünyada çeşitli firmalar tarafından ticari olarak üretilmektedir. Kokusuz, toksik olmayan ve ticari adı 'Lina mavisi' olarak isimlendirilir (Dainippon Inc. & Chemicals ve Tokyo Kenkyukai, 1980).

Pigment kompozisyonu nedeniyle *Spirulina*, ilk defa 1970 yılında Koi sazanında renklerinin güzelleştirilmesi amacıyla kullanılmıştır. Daha sonraları balık ve karides yetiştiricileri *Spirulina*'nın balık ve karideslerde büyüme ve yaşama oranını ve renk verme özelliğini tespit etmişlerdir. Özellikle, süs balıklarının pigmentasyonu için yem katkı maddesi olarak kullanılmıştır (Miki ve ark., 1986). Ayrıca yumurta sarısını kuvvetlendirmek için kanatlı hayvanların yemleri içerisine de karıştırılmıştır (Anderson ve ark., 1991). Bugün *Spirulina*, akvaryum balığı besini katkı maddesi olarak birinci sırada yer almaktadır (Belay ve Ota, 1993).

Japonya, Tayland ve Çin'de kozmetik ürünlerinde (far, göz kalemi ve rujlarda) kullanılmaktadır. Ayrıca Japonya'da doğal renk maddesi olarak yemlerde de kullanılmakta ve 600 kg/ay oranında üretilmektedir. Fikosiyenin'in esas olarak kullanım alanı gıda boyasıdır. Şeker, dondurma, sakızlar, süt ürünleri, jöle vb. günlük ürünler ve içeceklerin renklendirilmesinde kullanılmaktadır (Cohen 1997; Sarada ve ark., 1998).

Fikosiyenin'in genel anlamda bağışıklık sistemini desteklemekte ve çeşitli hastalıklara karşı koruma sağlamaktadır. Bağışıklık ile ilgili denemelerde biyokimyasal izotop olarak da kullanılmaktadır. Bu pigmentin sahip olduğu flüoresan özelliğinden dolayı mikroskopi ve sitometri çalışmalarında yararlanılmaktadır (Boussiba ve Richmond, 1980).

Fikosiyenin'in, gıda, ilaç ve kozmetik sanayilerinde, doğal bir pigment olarak, karsinogen olduğundan şüphe edilen sentetik pigmentlerin yerini alabileceği bildirilmiştir (Cohen 1997; Sarada ve ark., 1998).

1.3. Demir ve EDTA

Demir (Fe) biyolojik aktiviteleri kontrol eden bitki metabolizmasında, fotosentezde, solunumda, elektron taşınmasında, klorofil sentezinde ve enzim sisteminde oynadığı hayati rollerinden dolayı bütün canlı sistemler için önemli bir eser metaldir (Sunda ve Huntsman, 1995). Yeryüzünün % 5-6 gibi yüksek bir oranını

oluşturmasına rağmen sucul sistemlerdeki Fe konsantrasyonu oldukça düşüktür (0.05-2 nM) (Taylor, 1964).

Bitkiler, fotosentez için gerekli olan klorofil pigmentini üretebilmek için demire gereksinim duyarlar. Doğrudan klorofilin yapısında yer almayan demir, klorofilin sentezlenmesi sırasında bir katalizator (kolaylaştırıcı, hızlandırıcı) işlevi görür. Demir eksikliğinde ve Fe'in alınabilir formunun dışındaki varlığında bitkiler yeterli klorofili üretemediği için yeterince fotosentez yapamazlar. Böyle bir durumda CO₂ ve mineraller gibi gerekli bütün diğer besin maddeleri suda bol bulunsa bile metabolik faaliyetler sınırlanır (Martin ve ark., 1989).

Demir sucul ortamlarda, farklı kimyasal ve fiziksel yapılara sahiptir. Partikül, kolloid ve çözülmüş halde olmak üzere üç farklı formda bulunur. Fe'in bulunduğu bütün bu formlar toplam Fe olarak nitelendirilir. Sucul sistemlerde fitoplankton gelişimi için toplam Fe varlığının aksine, ortamdaki Fe' in formu önemlidir. Çözülmüş Fe formları Fe (III) veya Fe (II) halinde, inorganik serbest halde veya farklı organik maddelerle bileşikler halinde bulunur. Bu komplekslerin kimisi büyük moleküller, kimisi küçük moleküller halindedir (Öztürk ve ark., 2002; Sayın ve ark., 2006).

Biyolojik olarak kullanılabilirliği açısından Fe' in formu (organik, inorganik) çok önemlidir (Öztürk ve ark., 2002). Demir' in biyolojik olarak kullanılabilir formu, yapılan pek çok çalışma sonucunda, Fe⁺² olarak belirlenmiştir. Fe (II)' in potansiyel kaynakları sırasıyla; yüzey sularındaki Fe (III)' ün fotoredaksiyonu (Miller ve ark., 1995) atmosferik girişler ve sedimentten difüzyonu olarak sıralanabilir (Zhuang ve ark., 1992). Denizlerdeki Fe dağılımları ise, taşınma, atmosferik girişler, fotokimyasal reaksiyonlar, fitoplanktonca alınımlar, biyolojik döngü, partikül olarak çökme ve denizel ortama çeşitli yollarla giren farklı bileşikler tarafından kontrol edilmektedir. Deniz suyundaki Fe konsantrasyonunun değişikliğine neden olan bu mekanizmaların, mevsimsel değişikliklerin sonucunda olduğu düşünülmektedir (Duce ve Tindale, 1991; Landing ve Bruland, 1987; Hutchins ve ark., 1993; Sayın, 2004; Sayın ve ark., 2006).

Tatlı sularda ise Fe, oksijen türlerinin detoksifikasyonu, nitrojen fiksasyonu, nitrat redüksiyonu, pigment (klorofil vb.) sentezi, fotosentez yapımı, metabolik ürünlerin eldesi gibi işlevsel görevlerinde önemli bir rol alan eser metaldir (Huebers, 1991). Özellikle Fe'in nehir ağızları (Zhang, 2000) ve göller (Knauer ve Buffle, 2001) gibi tatlı sularda fitoplankton üretimini sınırladığı bildirilmesine rağmen bu sularda çözünebilir

demir yoğunluğunun oldukça yüksek (0.01 ile 1.4 mg Fe L⁻¹) miktarlarda olduğu belirtilmiştir (Anonymous, 2009). Tatlı sulardaki Fe dağılımları da deniz sularındaki gibi taşınma, atmosferik girişler, biyolojik döngü, mevsim değişiklikleri ve su hareketlerine bağlı olarak değişmektedir (Gerhardt, 1993; Gerhardt, 1994).

Doğal sular çok farklı düzeylerde demir içeriklerine sahiptir. Havayla temas etmeyen yeraltı suları genelde diğer minerallerin yanında demir yönünden de zengindir; bu sularda demir konsantrasyonu birkaç mg/L'ye kadar çıkabilmektedir. Demirin suda hangi formda (+2 veya +3) bulunacağı ise suyun pH derecesine ve redoks potansiyeline bağlıdır. Akarsu ve göllerde oksijen düzeyi 1 mg/L'nin altındaysa, demir, suda çözünebilir Fe⁺² formunda bulunmakta ve konsantrasyonu birkaç mg/L'yi bulabilmektedir. Bu oksijen düzeyinin düşük olduğu sulara tipik örnek, yeraltı sularının yüzeye çıktığı kaynaklardır. Kaynak suları havayla temas edip oksijence zenginleştikçe Fe⁺² iyonları çok çabuk oksitlenerek Fe⁺³ formunda suda erimeyen fosfat, hidroksit veya karbonat bileşikleri oluşturarak çökelmektedir. Böylece kaynaktan uzaklaştıkça sudaki demir düzeyi, sudaki oksijen düzeyinin artmasına bağlı olarak çok çabuk azalmaktadır. Bu tip kaynakların çevresinde, çökelmiş Fe⁺³ bileşiklerinin oluşturduğu kırmızı-kahverengi çamur birikintileri görmek mümkündür (Anonim, 2009).

Hutchins ve ark. (1999)'un bildirdiğine göre, alınabilir formdaki Fe, prokaryot ve ökaryotik algler için çok farklı formlardadır ve Fe'in yapısına bağlı olarak alınımının değiştiğini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar siderophore ile çevrili Fe'in prokaryotik pikoplankton tarafından daha iyi alındığını, porfirin ile bileşik halindeki Fe'in ise ökaryotik fitoplankton tarafından kullanılabilirliğini ileri sürmüşlerdir. Ökaryotik fitoplankton etkin olarak porfirin ile kompleksleşmiş Fe' i asimile eder (Muggli ve Harrison, 1996).

Demirin fitoplanktonik organizmalarca alınabilir formda kalma süresi ve alınabilirliği, çelatlar ve ışık sayesinde sağlanabilir. Daha uzun süre alınabilir formlarda kalarak fitoplanktonik organizmaların verimliliği ve dolayısıyla üretecek olan metabolitlerin miktarlarının artması sağlanabilir. Işık ve çözülmüş organik ligandların varlığı, ısı, pH, oksijen miktarı gibi faktörler ile Fe formları değişebilir. Bu faktörler, demirin biyolojik olarak kullanılabilirliğini etkiler. Fe'in çözünürlüğünü etkileyen ve ligand olarak nitelendirilen organik maddelerin ortamdaki varlığı çok önemlidir. Ligandlar, ortamda bulunan metaller ile güçlü bağlar kurarak onların biyolojik olarak

kullanılabilir forma geçmesine yardımcı olurlar. Bu maddeler sulara demirin çözünürlüğünü etkileyen en önemli faktörlerden birini oluşturur. Ortamda doğal olarak bulunan başlıca ligandlar; sideroporlar, humik asitler, fulvik asitler ve hidrokarboksilik asitlerdir. Diğer yandan ligandlar; EDTA (Etilendiamin tetraasetikasit), NTA (Nitrilo triasetikasit), DTPA (Dietilentriamin epantaasetikasit), CDTA (Sikloheksalindiamin tetraasetikasit) gibi organik veya Cl, CO₃ gibi inorganik formlarında bulunabilirler. Fe ile bileşik yapabilen ve çözünürlüğünü etkileyen, ligand olarak adlandırılan organik maddelerin ortamdaki varlıkları çok önemlidir. Bu organik maddelerin yokluğu, sucul ortamda Fe konsantrasyonunun 10-12 M yani 1×10^{-15} nM düzeylerine düşmesini ve deniz suyundaki Fe konsantrasyonunu ise 0.01 nM düzeylerine düşmesine sebep olabilir (Sunda ve Huntsman, 1997).

Organik ligandların, metal alımına ve algler üzerindeki toksik etkileri azaltmadaki rolleri doğal sulara bulunan metal türlerine göre büyük farklılıklar göstermektedir. Organik ligandların güçlü birleşik oluşturduğu birçok eser elementin örneklendiği pek çok çalışma yapılmışken, okyanus sularındaki düşük konsantrasyonlarda bulunan (nM) organik ligandların kimyasal özellikleri ve kaynakları hakkında çok az şey bilinmekteydi. Son çalışmalar; fitoplankter tarafından üretilen bu organik maddelerin, eser elementlerle güçlü bağlar kurarak hücre içine alınmalarını sağlamalarındaki rolleri belirlenmiştir. Ayrıca bu organik maddeler fitoplankton hücrelerini eser metallerin toksik etkilerinden korudukları da artık bilinmektedir (Sayın, 2004; Sayın ve ark., 2006).

Laboratuvar çalışmalarında en yüksek hücre yoğunluğunu elde etmek, ortamda yüksek konsantrasyonda bulunduğu toksik etki gösterebilecek metallerin toksitesini engellemek veya yok etmek, metallerin özellikle Fe'in alınabilirliğini artırmak gibi amaçlarla suni ligandlar (EDTA, NTA, CDTA vs.) özellikle EDTA kullanılmaktadır. Geringa ve ark. (2000), EDTA'nın kullanışlı bir materyal olduğunu, Fe'in kolloidal ve partikül formlarının çözünürlüğünü dolayısıyla alınabilirliğini arttırdığını bildirmişlerdir. Özellikle düşük Fe düzeylerinde Fe sınırlanmasına karşı fitoplanktonun gelişimini sağlamak için en az 100 µM EDTA kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir (Sayın, 2004).

Pigment maddelerinin sentezlenmesi için iç (genetik faktörler) ve dış şartların [fiziksel (sıcaklık, ışık) ve kimyasal (pH, tuzluluk, besleyici element: Mg, Fe, Zn, v.b)] uygun olması gerekir (Anderson ve Morel, 1982).

Sonuç olarak sucul ortamdaki önemi her geçen gün daha iyi anlaşılan Fe formunun özellikle de her türe ait alınabilir formunun belirlenmesi, başarılı bir kültür ve metabolit eldesi için önemlidir. Anılan dış şartlar ile fitoplanktonik organizmaların içerdiği pigment, protein, vitamin v.s gibi metabolitlerin sentezi artırılabilir. *Spirulina platensis*'de konu ile ilgili bilimsel veri eksikliği tespit edildiğinden; Fe⁺² ve Fe⁺³ formlarının yapay ligand EDTA varlığı ve yokluğunda *Spirulina platensis*'in büyüme ve fikosiyanın sentezine etkisi çalışılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Spirulina içerdiği fikosiyanin (mavi) ve klorofil (yeşil) pigment maddeleri nedeniyle mavi-yeşil renkli görünüme sahip, ipliksi yapıda mikroskobik bir canlıdır. İçerdiği yüksek miktarda protein, pigment ve yağ asitleri bakımından özel bir yere sahip olan *Spirulina*, özellikle yurt dışında besin desteği olarak talep görmektedir. Bu nedenle içeriğinden daha iyi yararlanabilmek için pek çok çalışma mevcuttur. Çalışmalar türün sentezlediği metabolitleri etkileyerek artırmak amacıyla fiziksel ve kimyasal çevre koşullarının değiştirilmesi şeklinde yapılmaktadır. Yapılan çalışmalar aşağıdaki şekilde özetlenmiştir.

Anderson ve Morel (1982), kıyasal diatom *Thalassiosira weissflogii*'nin farklı ligand (EDTA, CTDA, DTPA, NTA) varlığında, ışıklı ($95 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ve ışısız şartlarda, 200 nM Fe içeren ortamda (Aquil), Fe alım oranlarını araştırmışlardır. Işıksız ortamda Fe alım oranının Fe^{+3} aktivitesinin bir fonksiyonu olduğunu belirlemişlerdir. Işıklı ortamda ise, Fe alım oranının EDTA ve CTDA varlığında Fe (III)'ün Fe (II)'ye indirgendiği fotoreaksiyon ile indirgenişin arttığını gözlemlemişlerdir. Çelatör (ligand) yokluğunda ise, Fe alım oranının ortama ilave edilen Fe (II) ve Fe (III)'ün konsantrasyonlarına bağlı olduğunu tespit etmişlerdir.

Harrison ve Morel (1986), *T.weissflogii* türünde Fe sınırlamasının etkilerini araştırmışlardır. 1-100 nM Fe ve 10 μM EDTA içeren ortamlarda Fe yoğunluğunun azalmasıyla büyüme hızının ve hücrel Fe miktarının azaldığını ve en yüksek büyüme hızının arttığını saptamışlardır. Hücrel Fe miktarının, Fe artışıyla birlikte $2-25 \times 10^{-5}$ mol Fe/L-hücre arasında değiştiğini, serbest Fe (III) iyon konsantrasyonunun azalmasıyla (10^{-20} nin altı) azaldığını bildirmişlerdir.

Martin ve Fitzwater (1988), Kuzey-Batı Pasifik'te ligand ilave edilmiş su örneklerine 0, 1, 5, 10 nmol/kg Fe ilave ederek klorofil-a miktarlarını belirlemişlerdir. Denemenin başlangıcından itibaren üç gün boyunca klorofil miktarlarında değişikliğin olmadığını ve 4. günden itibaren artışın başladığını ve artışların Fe ilavelerinin yapılmasından sonra olduğunu belirlemişlerdir. Eklenen 0, 1, 5 nmol/kg Fe miktarları için sırasıyla 1.07, 5.21 ve 7.91 $\mu\text{g/kg}$ klorofil değerlerini belirlerken en yüksek klorofil-a değerinin (10.16 $\mu\text{g/kg}$) 10 nmol/kg Fe ilavesi ile elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Morel ve ark. (1991), eser elementlerin denizdeki fitoplankton üretimi üzerine sınırlayıcı etkilerini araştırdıklarında, Fe ve Zn' nun fitoplankton üremesi üzerine önemli etkisinin olduğunu belirlemişlerdir.

Banse (1991), Fe ile zenginleştirilen kültürlerde fitoplankton hücre bölünme oranlarının üretimin ve NO₃ alımını arttığını bildirmişlerdir.

Zhuang ve ark. (1992), deniz suyu pH' ının düşük olmasının Fe' in çözünürlüğünü artıran faktörlerden biri olduğunu, pH' ı nötr olan (7) oksik sularda, Fe'in genellikle çözünmediğini ve bu durumda ortamda sınırlayıcı etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Çözünürlüğün özellikle organik ligandların yokluğunda daha da azaldığını ve deniz suyunun pH' ının nötr' den asidik yapıya doğru değiştikçe Fe' in çözünürlüğünün arttığını tespit etmişlerdir.

Kobayashi ve ark. (1993), çalışmalarında; yeşil alg *Haematococcus pluvialis*'in yeşil hücrelerinin kiste dönüşümünü, yeşil safhada asetatla birlikte Fe⁺² ilavesiyle teşvik etmeyi amaçlamışlardır. Astaksantin oluşumunda asetat ve Fe⁺²'nin birlikte ilavesinin, sadece asetat ilavesine oranla daha etkili olduğunu belirtmişlerdir. Kistleşmiş alg hücrelerindeki karotenoid sentezinin aktinomisin ya da sikloheksemid tarafından durdurulduğunu belirtmişlerdir. Ancak daha sonra kist oluşumunu, sadece asetat ilavesiyle teşvik etmişlerdir.

Sunda ve Huntsman (1997), büyüklükleri 3-5 µm ile 30-32 µm arasında değişen iki diatom türü olan *T.weissflogii* (11-12 µm) ve *T.pseudonana* (3.5 µm) ile iki dinoflagellat türü *Prorocentrum minimum* (12-13 µm) ve *P.micans* (28-32 µm)'in farklı Fe miktarı ve ışık yoğunluklarında Fe alım ve büyüme dinamiklerini araştırmışlardır. Işık yoğunluğunun azalması ile her bir hücredeki IUE (demirden yararlanma etkinliği)'den dolayı her hücre için Fe ihtiyacının arttığını, Fe konsantrasyonunun artmasıyla da hücrelerin spesifik büyüme oranının arttığını bildirmişlerdir.

Mckay ve ark. (1997), farklı FeCl₃ miktarlarında (10, 25, 50, 100 ve 1000 nM), 100 µM EDTA, 215 µmol foton m⁻² s⁻¹ aydınlanma ve 24 °C'de kültüre aldıkları *Thalassiosira weissflogii* ve *P.tricornutum* hücrelerinin büyüme oranlarını araştırmışlardır. *P.tricornutum*'da büyüme hızı (µ) değerlerinin Fe miktarlarının azalmasıyla yavaş yavaş azaldığını ve en yüksek büyüme değerinin 1.7 gün⁻¹ olduğunu tespit etmişlerdir. *T.weissflogii* için ise; 50, 100 ve 1000 nM Fe miktarlarında 1.64-

1.74 gün⁻¹ arasında, 25 nM Fe miktarında ise 1.21 gün⁻¹ olarak oldukça düşük olduğunu tespit etmişlerdir. *T.weissflogii*'de 10 nM Fe içeren kültür ortamında büyüme oranının belirlenemediğini ve bu koşulların altında gelişim gözlenmediğini belirtmişlerdir.

Van Leeuwe ve ark. (1998), Pasifik Bölgesi ve Güney Okyanusu'nda doğal fitoplankton komüniteleri ile pigment adaptasyonu üzerine demir stresinin etkilerini incelemişlerdir. Çalışma; beyaz, mavi ve yeşil ışığın kullanıldığı, 8 ile 72 saatlik deneme sürelerinin uygulandığı ve 2 nM Fe eklemesi yapılan ve yapılmayan kültür ortamlarında yürütülmüştür. Işık uygulanan denemelerde, pigment kompozisyonunun Fe ilavesi yapılan ve yapılmayan kültürlerde benzer olduğunu belirlemiştir.

Hyenstrand ve ark. (2000), çalışmalarında yazın durgun period sırasında düşük epilimnetik demirin kullanılabilirliğinin Erken Gölü'ndeki Cyanobakteriler'in gelişimleri için sınırlayıcı bir faktör olduğunu belirtmişlerdir. Ön denemelerinde çözülebilir demir eklenen ve eklenmeyen ortamlara fosfat, nitrat ve amonyum eklemeleri yaparak test etmişlerdir. Denemelerinde demir alımı olmayan ortamlarda *G. echinulata* hücrelerinin azaldığını belirtmişlerdir. Ayrıca bu ortamlara demir eklemesi yapıldığında bu türlerde artışın meydana geldiğini belirtmişlerdir.

Marquez ve Lamela (2000), kontrol grubu olarak Zarrouk ve üç deniz suyu ortamı kullanarak *Spirulina maxima*'nın biyomas ve fikosiyanın üretimini incelemiştir. Deniz suyu ortamlarında sırasıyla 0.1 (SWM), 0.1 (SWMAB) ve 0.2 (SWMX2) g/L NaHCO₃; 0.008 (SWM), 0.008 (SWMAB) ve 0.016 (SWMX2) g/L K₂HPO₄; 1 (SWM), 1 (SWMAB) ve 2 (SWMX2) g/L NaNO₃; 0.005 (SWM), 0.005 (SWMAB) ve 0.01 (SWMX2) g/L Fe-EDTA kullanmıştır. *Spirulina maxima*'nın standart ortamında biyomas konsantrasyonu 27 g/L iken deniz suyu ortamında ise <1.2 g/L olarak tespit etmiştir. Deniz suyunda üretimi yapılan hücrelerdeki pigment konsantrasyonu sırasıyla klorofil-a <2.78mg/g hücre, fikosiyanın <19.83 mg/g hücre, karoten <1.85 mg/g hücre olarak elde ettiğinin bildirmiştir. Deneme 6 gün sürmüştür ve sonunda en fazla biyomas (2.7 g/L), fikosiyanın (45.34 mg/g), karotenoid (2.18 mg/g), klorofil-a (6.1 mg/g) ve büyüme oranı (0.48 gün⁻¹) nın Zarrouk ortamından elde ettiğini belirtmiştir.

Öztürk ve ark. (2002), çalışmalarında, artan tatlı su girişinin başladığı bahar aylarının başlangıcından önce fiyord sularında bile geçici bir Fe sınırlamasının olduğunu tespit etmişlerdir. Irmak ağızlarından uzak kıyı suları, deniz ve nehir geçişlerinin olduğu bölgelerin Fe'in hızla uzaklaşmasından dolayı şiddetli Fe

sınırlamalarına uğrayabildiğini ve beklentilerin aksine acı sulu Baltik Denizi'nde bile kıyasal bloomlar boyunca Fe sınırlaması belirtilerinin görüldüğünü ileri sürmüşlerdir.

Deein ve ark. (2002), Ohno Shukunohe ve Japonya'nın Kunebetsu nehrinin beş farklı merkezinden alınan su örneklerinden filtre edilebilir demiri (<0.45 m) ve koloidal demiri (0.45–0.025 m) kullanarak deneme ortamı hazırlamışlardır. Yürüttükleri çalışmada *Melosira granulata* ve *Angustissima f. spiralis* tatlısı alglerini kolloid demir içeren ortamda kültüre alarak en yüksek ~250 000 hücre ml⁻¹ ve ~60g klorofil-a L⁻¹ elde ettiklerini bildirmişlerdir Bununla birlikte ~0.1 M çözünebilir Fe içeren örneklerde ise gelişim görülmediğini tespit etmişlerdir. Denemenin sonunda, tatlı su alglerinin koloidal Fe'i kullanabildiklerini ve koloidal Fe'in tatlı su algleri için gerekli olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Abd El-Baky (2003), fikosiyenin pigmentinin üretimi ile ilgili çalışmasında farklı nitrojen ve tuz miktarını içeren besin ortamlarında *S.platensis* ve *S.maxima* türlerini kültüre almıştır. Azotlu ortamda kültüre alınan iki türde de fikosiyenin üretimi sırasıyla % 12.08 ve % 22.3 olarak elde edilmiştir. Ayrıca *Spirulina* tuz stresi ve azot içeriklerinin değişimi sonucunda fikosiyenin pigmentinin kompozisyonunda büyük değişimler olduğunu, C-fikosiyenin (C-PC) % 1.65-4.02, allofikosiyenin (A-PC) % 2.53-6.11, R- fikosiyenin (R-PC) % 5.75-12.3 'e yükseldiğini bildirmiştir. İki tür arasında yapılan karşılaştırmada, *S.platensis*'in yüksek azot ortamında toplam fikosiyenin miktarının en yüksek oranı % 9.92 ve R-PC % 5.75 olarak elde edilmiştir. *Spirulina maxima* ve *Spirulina platensis*'de protein ve fikosiyenin içeriklerinin önemli derecede besi ortamındaki NaCl düzeylerinden etkilendiğini ve her iki alg türünde de NaCl ve azot eksikliğinde fikosiyenin en yüksek miktarlarda üretildiği belirlenmiştir. Ayrıca çalışmasında, % kuru maddedeki fikosiyenin içeriğini ekstrakte etmiş, *S.platensis* ve *S.maxima* toplam fikosiyenin içerik değerlerinin sırasıyla % 22.3 ve % 18.88 olduğunu belirlemiştir. Hücre miktarlarında ise, % 26.6'dan % 23.6 azalma meydana geldiğini tespit etmiştir.

Sayın (2004), çalışmasında laboratuvar koşullarında suni ligand EDTA'nın farklı Fe konsantrasyonlarında (10-100nM) *Emiliania huxleyi* ve *Thalassiosira weissflogii* türlerinin büyümesine etkisini çalışmıştır. Bu amaçla her iki türünde 10 ve 100 nM Fe içeren EDTA'lı ve EDTA'sız ortam koşullarında hücre yoğunluğu, klorofil-a miktarı, klorofil-a miktarı, büyüme hızı, hücresel Fe miktarı ve pH değişimi gibi parametreleri

tespit etmiştir. Belirlediği parametrelere ait veriler sonucunda; *E.huxleyi* kültürlerinde EDTA'nın büyüme hızını etkilemediği, klorofil-a miktarını düşük Fe (10 nM) dozunda etkilediği, büyüme hızını etkilemediği, hücresel Fe miktarını düşük Fe dozunda azalttığı sonuçlarını elde etmiştir. Aynı ortamlarda *T.weissflogii* kültürlerine EDTA'nın, yüksek Fe dozunda (100 nM) hem hücre yoğunluğunu hem de klorofil-a miktarını belirgin bir şekilde etkilediği, büyüme hızını etkilemediği, hücresel Fe miktarını hem yüksek hem de düşük Fe dozunda azalttığı sonuçlarını elde etmiştir. 10 ve 100 nM Fe dozlarının EDTA'lı ve EDTA'sız koşullarında *E.huxleyi*'de ve *T.weissflogii*'de hücre yoğunluğunun artması ile ortamın pH'ının da arttığını belirlemiştir.

Sayın ve ark. (2006), Fe'in biyolojik olaylarda hala tam olarak bilinmeyen işlevleri, sudaki kullanılabilir formları ve alımını etkileyen faktörlerin belirlenmesi konularına katkıda bulunmak amacıyla yürüttükleri çalışmada, 10 nM demir içeren modifiye F/2 ortamında, suni çelat EDTA (Ethylenediaminetetraacetate -100 μ M)'nin, *Thalassiosira weissflogii*'nin büyümesine etkilerini araştırmışlardır. Denemenin yürütüldüğü ortamda, 18 \pm 2 °C sıcaklık ve 80 μ mol m⁻² s⁻¹ aydınlanma şiddeti sürekli olacak şekilde sağlanmıştır. Denemenin sonunda, EDTA'nın, *T. weissflogii* kültürlerinde, hücre yoğunluğu, klorofil-a miktarı, büyüme hızı ve büyüme paralel olarak artan pH değerlerini etkilemediği (p>0.05) saptanırken, hücresel Fe miktarları arasında farklılık olduğunu (p<0.05) belirtmişlerdir.

Madhyastha ve Vatsala (2007), çalışmalarında farklı fotofiziksel koşullarda *Spirulina fusciformis*'in içerdiği pigmentler üzerine ışık kaynağının etkilerini araştırmışlardır. Çalışma 0.2 g/L (kuru ağırlık) aşı miktarı kullanılarak, farklı ışık reaktörleriyle sağlanan ışık kaynakları ile Zarrouk ortamlarında başlatılmıştır. Günlük elde ettikleri en yüksek biyomas üretimi beyaz ışık, mavi ışık ve yeşil ışıkta sırasıyla 0.8 g/L, 0.75 g/L ve 0.69 g/L olarak belirlemişlerdir. Pigment içeriği beyaz ışıkta 5.5 μ g/mL ile klorofil-a üretiminin en yüksek olduğunu ve diğer pigmentlerin aşağı yukarı çok fazla değişmediğini ve beyaz ışıkta klorofil sentezinin daha iyi olduğunu belirtmişlerdir. Ancak klorofil-a ve fikosiyanin içerikleri mavi ışık yoğunluğunda sırasıyla, 7 μ g/ml ve 2 mg/ml'ye yükseldiğini belirtmişlerdir. Fikosiyanin miktarının ise 18 gün boyunca en yüksek değerinin 2.5 mg/ml olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca en iyi fikosiyanin ve fikoeritrin üretiminin *Spirulina*'da olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Oğuz (2008), Çukurova bölgesinde *Spirulina platensis* kültürlerinde mevsime bağlı sıcaklık ve aydınlanma şiddetinin, mavi renkli pigment C-fikosiyanin içeriğine ve protein miktarına etkisini belirlemek amacıyla bir çalışma yapmıştır. Çalışma dışarı koşullarında, sera içerisinde fiber-glass havuzlarda nisan, temmuz ve eylül aylarında yapılmış, C-fikosiyanin miktarları sırasıyla $329,91 \pm 0,029$, $326,75 \pm 0,016$ ve $332,71 \pm 0,021$ $\mu\text{g/ml}$ olarak saptanmıştır. İlkbahar, yaz ve sonbahar, koşullarında protein oranları sırasıyla, % 68, % 68 ve % 72 olarak belirlenmiştir. Deneme sonunda elde ettiği verilere göre Nisan, Temmuz ve Eylül aylarında, *Spirulina platensis* kültürlerinde fikosiyanin ve protein içeriklerinde farklılık olmadığı bildirilmiştir.

Pandey ve Pandey (2008), çalışmalarında bir diazotrofik cyanobakteri *Nostochopsis lobatus*'un antioksidant kapasitesi biyomas üretimin geliştirmek ve pigmentleri için incelemiştir. Ortamlara antioksidant kapasitesi, pigmentleri, besin önemi ve biyoması artırmak için pH 7.8'de P (Fosfor) ve Fe ilave etmişlerdir. P'un karotenoidler, klorofil ve biyomasın üretimi için Fe'den daha iyi bir destekleyici olabileceğini düşünmüşlerdir. Demirin fikosiyanin, fikoeritrin, besinsel önemi ve antioksidant kapasitesi açısından P'dan daha etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar Fe ve P'ın ticari açıdan yapılan çalışmalar için etkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Bermejo ve ark. (2008), çalışmalarında Fe^{+2} ve Fe^{+3} iyonlarının ortamda artması sonucunda, Fe^{+3} iyonlarının Fe^{+2} iyonlarına oranla yaptığı etkinin daha güçlü olduğunu belirlemişlerdir. *S.platensis*'in fikosiyanin miktarlarının 200 $\mu\text{g/ml}$ 'de EDTA'lı ortamda % 44.4 ± 1.86 , EDTA'sız ortamlarda ise % 39.5 ± 0.87 olarak tespit etmişlerdir.

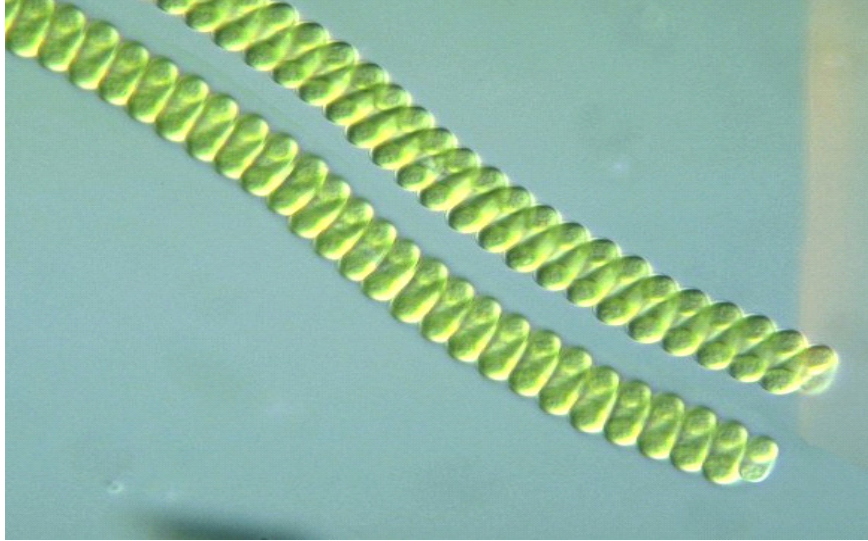
Singh ve ark. (2009), *Phormidium ceylanicum*'dan fikosiyanin üretimini artırmak için optimum koşullardaki ortam bileşenlerini incelemiştir. Bunun için ortamdaki sodyum nitrat, kalsiyum klorid, eser metal karışımı sitrik asit stoklarını gözden geçirmişlerdir. *Phormidium ceylanicum* optimum ortam koşulları altında 32 günde BG-11 ortamı kullanılarak kültüre alındığında, fikosiyanin üretiminin 2.3 kat arttığını gözlemlemiştir. Ham ekstraktan elde edilen C-fikosiyaninin verimliliğinin % 63.50 olduğunu belirtmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. *Spirulina platensis*

Denemede kullanılan fitoplankton türü *Spirulina platensis* (Cyanophyta) M2 suşu, Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Plankton Ünitesi'nden sağlanmıştır. (Şekil 3.1.1.).



Şekil 3.1.1. *Spirulina* Flamentlerinin Görünümü (Anonim, 2009a)

3.1.2. Araştırmada Kullanılan Kimyasallar

Spirulina platensis'in kültüre alınmasında Zarrouk ortamı kullanılmıştır. Bu ortamın hazırlanmasında kullanılan kimyasal (Merck) ve miktarları Çizelge 3.1.2.'de verilmiştir. Deneme süresince kullanılan bütün kimyasallar analitik düzeydedir.

Kültür ortamı pH'nın ayarlanmasında kullanılan kimyasallar:

HCl (Hidroklorik asit)

NaOH (Sodyum hidroksit)

Pigment analizleri yapılırken kullanılan kimyasallar:

CH₃OH (Metanol)

K₂HPO₄ (Di potasyum hidrojen fosfat)

KH₂PO₄ (Potasyum di hidrojen fosfat)

Çizelge 3.1.2. Denemede Kullanılan *Spirulina* Ortamı (Zarrouk, 1966).

Ortamlar	Madde	Miktar
PART 1	NaHCO ₃ (Sodyumbikarbonat)	18,6 g
	Na ₂ CO ₃ (Sodyum karbonat)	8,06 g
	K ₂ HPO ₄ (Potasyum fosfat)	1,00 g
	Distile su (Saf su)	500,0 ml
PART 2	NaNO ₃ (Sodyum nitrat)	5,00 g
	K ₂ SO ₄ (Potasyum sülfat)	2,00 g
	NaCl (Sodyum klorür)	2,00 g
	MgSO ₄ .7H ₂ O (Mağnezyum sülfat 7.mol su)	0,40 g
	CaCl ₂ .2H ₂ O (Kalsiyum klorür 2.mol su)	0,02 g
	FeSO ₄ .7H ₂ O (Demir sülfat 7.mol su)	0,02 g
	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ .2H ₂ (EDTA)	0,16 g
	Mikro Element Solüsyonu	10,0 ml
	Vitamin Solüsyonu	5,00 ml
	Distile su (Saf su)	500,0 ml
MİKROELEMENT SOLÜSYONU	ZnSO ₄ .7H ₂ O (Çinko sülfat 7.mol su)	0,001 g
	MnSO ₄ .7H ₂ O (Mangan II sülfat 7.mol su)	0,002 g
	H ₃ BO ₃ (Borik asit)	0,01 g
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O (Sodyum molübdat 2.mol su)	0,001 g
	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O (Kobalt II nitrat 6. mol su)	0,001 g
	CuSO ₄ .5H ₂ O (Bakır II sülfat 5.mol su)	0,00005 g
	FeSO ₄ .7H ₂ O (Demir II sülfat 7.mol su)	0,7 g
	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ .2H ₂ (EDTA)	0,8 g
	Distile su (Saf su)	1,0 L

3.1.3. Araştırmada Kullanılan Ekipmanlar

Araştırmamızda, kültür ortamlarının pH ayarları ve lmeleri için WTW pH 330i model pH metre kullanılmıştır. Tartım işlemleri AND GF-600 marka ve dört hassaslı terazi ile yapılmış UV-160 1 PC, Shimadzu visible model spektrofotometre kullanarak Klorofil-a, Fikosiyenin tayini ve Optik Yoğunluk yapılmış, örneklerin yoğun hale getirilmesi için SM 16 510 model filtre mekanizması, GF6 Glasfaser Rundfilter marka filtre kağıdından kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan tüm cam malzemelerin sterilizasyonu için FN 500 model etüv, kültür ortamlarının sterilizasyonu için Hırayama HA-300M IV model elektrikli otoklav, çökeltme işlemleri NF 800 model soğutmalı santrifüj cihazı ile yapılmış, laboratuvarın sıcaklık ayarı Arçelik marka klima ile sağlanmıştır.

Araştırmada kurulan deney setlerinin havalandırılması için Brand Risheng marka hava motoru, çalışma sırasında şimşek Liborteknik marka su banyosu cihazı ve Sunny markalı ısı ve derece ayarlı mikrodalga fırın kullanılmıştır. Deneme süresince örneklerin dondurulması işlemi için Arçelik marka derin dondurucu, eritme işleminde ise Profilo marka buzdolabı kullanılmıştır.

Spirulina platensis kültür ortamları 10 L'lik polietilen plastik kaplara konulmuş, kapaklarına açılan akvaryum hortumu girişi ile kültürün havalandırılması sağlanmış ve örneklerin alınması için üç çıkışlı musluklara 10 ml'lik polietilen şırıngalar monte edilerek bir deney seti oluşturulmuştur.

3.2. Yöntem

3.2.1. Araştırmada Kullanılan Kapların Temizliği ve Sterilizasyonu

Cam ve plastik malzemelerin temizliği, alg kültürlerinin başarısı için dikkatle yapılması gereken bir konudur. Bütün malzemelerin HCl (6 M) zeltisi içerisinde 48 saat bekletilerek metallere arınması sağlanmış ve ardından 5 kez saf su ile durulanmıştır. Temizlenmiş tüm cam malzemeler saman kağıtları ile paketlenmiş ve 172 °C' de 3,5 saat süre ile etüvde steril edilmiştir. Steril hale getirilen tüm malzemeler

poşetlenerek saklanmıştır. Araştırmada kullanılan tüm kültür ortamları otoklav'da 121 °C' de 30-35 dakika steril edilmiş ve +4 °C' de depolanmıştır.

3.2.2. *Spirulina platensis* Stok Kültürleri

Mustafa Kemal Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Plankton Laboratuvarı'nda, iklimlendirme cihazı kullanılarak 26±1 °C'de sabitlenmiş oda sıcaklığında, 1000 lux ışık şiddetinde sürekli aydınlanma ve havalandırmanın sağlandığı laboratuvar koşullarında *S. platensis* (Cyanophyta) 5 L'lik plastik kaplarda kültüre alınmıştır. Kültürlere haftada iki defa *Spirulina* ortamı verilerek kültürlerin devamlılığı sağlanmıştır.

3.2.3. Deneme Ortamlarının Hazırlanması

Deneme Zarrouk ortamı (kontrol grubu) ve farklı değişimlerin yapıldığı toplam 7 ortamdan oluşmuştur. Deneme grupları aşağıdaki şekilde kodlanmıştır. Çizelge 3.2.3'de deneme ortamında uygulanan değişimler belirtilmiştir.

Çizelge 3.2.3. Denemede kullanılan gruplar ve muameleleri

Gruplar	Fe ⁺² (mM)	Fe ⁺³ (mM)	EDTA(µM)
1A	0,3		902,6
2A	0,3		-
3A	0,3		1353,9
1B		0,3	902,6
2B		0,3	-
3B		0,3	1353,9
K	0,1		451,3

3.2.4. Denemenin Kurulması ve Yürütülmesi

Sterilizasyonun sağlandığı ortamda, denemenin kurulacağı 10 L kapasiteli plastik kaplara 7 L kültür ortamı ilave edilmiştir. Deneme 3 tekrarlı olarak toplam 21 adet kültür kabı ile kurulmuştur. Deneme gruplarında uygulanacak olan muameleler Çizelge

(3.2.3)'de verilmiştir. Deneme Kontrol ve farklı uygulamaların yapıldığı toplam 7 gruptan oluşmuştur. Deneme kaplarına yapılan ilavelerin ardından aşı olarak 1 L'lik *Spirulina platensis* ilaveleri yapılmış ve toplam 8 L'lik hacim ile deneme başlatılmıştır (Şekil 3.2.4.).

Denemenin başlatıldığı günden itibaren 15 gün süre ile günlük olarak pH, optik yoğunluk, pigment analizleri (klorofil-a ve fikosiyanın), yaş ve kuru madde takibi yapılmıştır. Deneme kurulduktan sonra metodlarda belirtilen hacimlerde örnekler günlük alınarak ölçümler yapılmıştır.



Şekil 3.2.4. Deneme düzeneği (orijinal)

3.2.5. Araştırma Süresince Takip Edilen Parametreler

3.2.5.1. pH Ölçümleri

Denemenin başlangıcından itibaren 15 gün boyunca günlük pH ölçümleri, pH metre ile takip edilmiştir. Her dört okuma işleminden sonra pH metre kalibre edilmiştir.

3.2.5.2. Pigment Analizleri

3.2.5.2.1. Fikosiyanin Analizi

Deneme boyunca fikosiyanin analizi için her deneme kabından 30 ml örnek alınmıştır. *Spirulina platensis* gaz vakuelleri olan bir Cyanobakteri olduğu için santrifüj işlemi ile tüm filamentlerin çökmesi mümkün değildir (Becker, 1994). Bu nedenle alınan örnekler bir şırınga içerisinde basınca maruz bırakılmış ve gaz vakuollerinin patlaması sağlanmıştır (Gomez-Lojero, 1997). Gaz vakuelleri patlayan örnekler 25 °C'de 9000 RPM'de 10 dakika boyunca santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. İlk santrifüj işleminde filamentlerin çökmesinden sonra üstte kalan kültür ortamı atılarak, santrifüj tüplerine saf su ilave edilmiş ve tüpler vortexle karıştırılarak filamentlerin saf suyla yıkanması sağlanmıştır. Bu işleminden sonra alg solüsyonları tekrar 25 °C'de 9000 RPM'de 10 dakika boyunca santrifüj işlemi yapılmış ve üstte kalan sıvı atılmıştır. Daha sonra yoğunlaştırılmış filament kütlesi üzerine 10ml sodyumfosfat tamponu ilave edilerek örnekler vortex ile karıştırılmış ve derin dondurucuda -25 °de bekletilmiştir. Bu sıcaklıkta 8 saat bırakılan örnekler +4 °C'de çözdürülmüştür. Bu işlem üç kez tekrarlanarak *Spirulina* filamentlerinin parçalanması sağlanmıştır. Son çözdürme işleminden sonra solüsyonlar +4 °C'de 9000 RPM'de 30 dakika süre ile santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Üstte kalan mavi solüsyon fikosiyanin tayini, çöken filament kütlesi ise klorofil tayini için ayrılmıştır (Vonshak, 1997, sözlü görüşme; Yılmaz, 2001).

Santrifüj işleminden sonra üstte kalan 10 ml'lik fikosiyanin solüsyonları ayrılmış, buradan alınan 1 ml'lik örnek sodyum fosfat pH 7 tamponu ile 3 ml'ye tamamlanmıştır.

Örnekler 620 nm'deki absorbans değeri ile tespit edilmiştir. Örneklerdeki C-fikosiyanin miktarı aşağıdaki formül yardımı ile bulunmuştur:

$$\text{CPC} = \text{OD } 620 \text{ nm} \times 125^1 = \mu\text{g.ml}^{-1} \text{ (Vonshak, 1997, sözlü görüşme)} \quad (3.2.5.2.1.)$$

3.2.5.2.2. Klorofil-a Analizi

Santrifüjlemelerden ve fikosiyanin solusyonları ayrıldıktan sonra kalan presipitat üzerine 10 ml saf metanol ilave edilmiştir. Santrifüj tüplerinin üzeri ışığı almayacak şekilde kapatıldıktan sonra, vorteks ile karıştırılmış ve 70 °C'deki su banyosunda iki dakika bekletilmiştir. Daha sonra 9000 RPM'de 20 dakika santrifüjlenen örneklerden üstte kalan sıvıdan 10 ml alınmış, geriye kalan presipitatlar atılmıştır. Fikosiyanin tayininde olduğu gibi alınan 1ml'lik örnekler saf metanol ile 3 ml'ye tamamlanmıştır. Örnekler 665 nm'deki absorbans değeri tespit edilmiştir. Örneklerdeki klorofil-a miktarı aşağıdaki formül yardımı ile bulunmuştur:

$$\text{Chl a} = \text{OD } 665 \text{ nm} \times 13.9^2 = \mu\text{g.ml}^{-1} \text{ (Vonshak, 1997)} \quad (3.2.5.2.2.)$$

3.2.5.3. Yaş ve Kuru Madde Tayini

Yaş ve kuru madde miktarlarının saptanması için deneme kaplarından alınan (10 ml) örnekler, 0,45 µm göz açıklığındaki filtre kâğıtları, süzme düzeneği ve bir su trombu kullanılarak süzülmüştür. Süzme işleminden sonra filtre kâğıtları terazide tekrardan tartılmış ve bu iki tartım arasındaki fark yaş madde ağırlığını vermiştir. Tartımdan sonra, filtre kâğıtları 105 °C'de 8 dakika mikrodalga fırında kurutulmuştur. Bu süre sonunda filtre kâğıtları bir desikatöre konularak oda sıcaklığına kadar soğumaları sağlanmış ve daha sonra terazide tekrar tartımları yapılmıştır. Yaş ağırlığından kuru ağırlıklar çıkarılarak kuru madde miktarı elde edilmiştir (Boussiba ve Vonshak, 1992).

¹ 125, *Spirulina* için belirlenen absorpsiyon katsayısından belirlenen faktördür.

² 13.9, *Spirulina* için belirlenen absorpsiyon katsayısından belirlenen faktördür.

$$\frac{(\text{filtre ağırlığı} + \text{alg}) - (\text{filtre ağırlığı}) \times 1000\text{ml}}{(\text{ml'deki alg hacmi})} = \text{algin kuru ağırlığı (mg/L)}$$

(3.2.5.3.)

3.2.5.4. Optik Yoğunluk (OD)

Optik yoğunluk spektrofotometre yardımı ile yapılmıştır. Kültürlerden alınan alg örnekleri spektro kuvvetlerine konular, hızlıca karıştırılır ve üç kez 680 nm absorbans değerinde okuma yapılır (Boussiba ve Vonshak, 1992).

3.2.5.5. Spesifik Büyüme hızı (μ =bölünme gün⁻¹)

Spesifik Büyüme hızı (μ) aşağıdaki formüle göre bulunmuştur (Guillard, 1973).

$$\mu = \log(N_1^3/N_0^4) \times (3.322/t^5) \quad (3.2.5.5)$$

Araştırma verilerinin değerlendirilmesinde, tek yönlü varyans analizleri ve bu analizlerin sonuçlarına bağlı olarak ortalamaların karşılaştırılmasında Duncan, Tukey, SNK çoklu karşılaştırma testleri SPSSX 10.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır.

² 13.9, *Spirulina* için belirlenen absorpsiyon katsayısından belirlenen faktördür.

³ N_0 : başlangıç kuru madde miktarıdır.

⁴ N_1 : t zamandaki kuru madde miktarıdır.

⁵ t: zaman

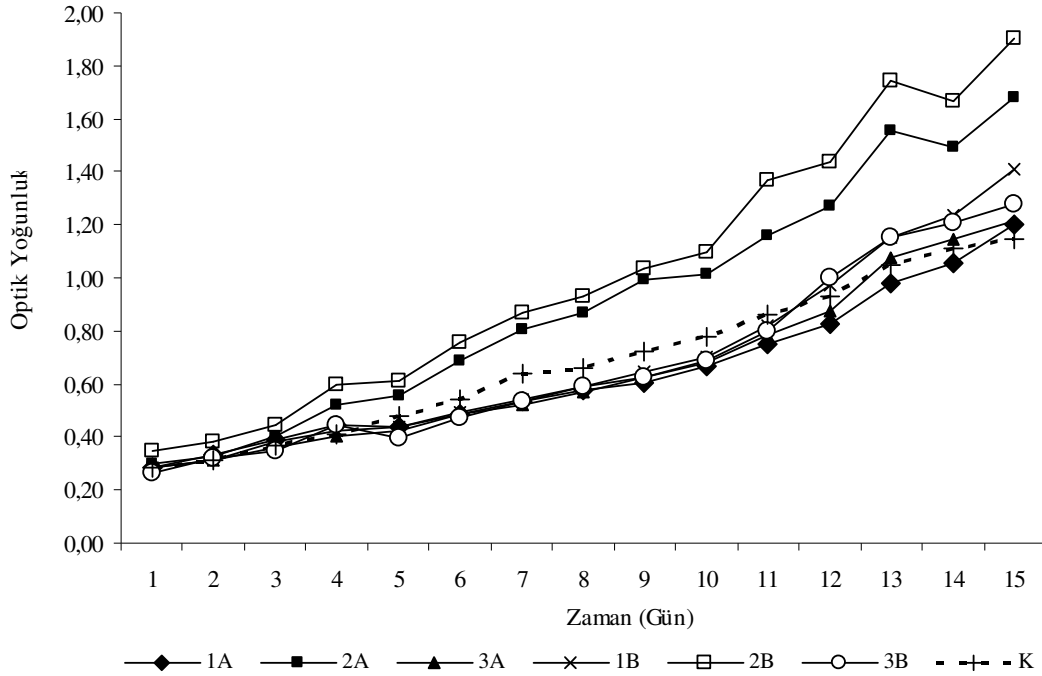
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Araştırma Bulgular

İki farklı demir formu olan Fe^{+2} ve Fe^{+3} 'ün yapay ligand EDTA varlığında ve yokluğunda *Spirulina platensis* kültürlerinde; optik yoğunluk (O.D= ışık geçirgenliği), klorofil-a miktarı ($\mu\text{g/ml}$), kuru madde (g/L), pH değişimi, büyüme hızı (μ =bölünme/gün) ve fikosiyanın miktarlarının değişimine olan etkileri yetiştiricilik çalışmaları için uygun bir süre olarak kabul edilen 15 günlük süreçte belirlenmiştir.

4.1.1 Optik Yoğunluk Değerleri

Spirulina platensis'in Fe^{+2} , Fe^{+3} ve EDTA varlığında ve yokluğunda kültürlerin optik yoğunluğun zamanla değişimi Şekil 4.1.1.'de verilmiştir.



Şekil 4.1.1. Deneme gruplarına ait Optik yoğunluk (O.D) değerleri

Denemenin başlangıcından itibaren tüm grupların optik yoğunluklarında düzenli bir artış gözlenmiştir. Deneme süresince en yüksek optik yoğunluk değerinin 2B grubunda (1,901) tespit edildiği, en düşük optik yoğunluk değerinin ise kontrol grubunda (1,219) olduğu tespit edilmiştir. Bütün grupların en yüksek optik yoğunluk değerlerine 15. günde ulaştıkları belirlenmiştir. Belirlenen en yüksek optik yoğunluk değerlerinin sırasıyla; 1,901 (2B), 1,695 (2A), 1,501 (1B), 1,399 (3B), 1,258 (1A), 1,257 (3A) ve 1,219 (K) olduğu saptanmıştır.

Elde edilen en yüksek değerler karşılaştırıldığında; kontrol grubu ile 1A, 3A ve 3B aralarındaki farkın önemli olmadığı ($p>0.05$), 2A, 1B, 2B arasındaki farkın ise önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$), (Çizelge 4.1.1.).

Çizelge 4.1.1. Denemede ölçülen parametrelere ait ölçüm ortalamaları

PARAMETRELER					
GRUPLAR	Optik Yoğunluk	pH	Kuru Madde (g/L)	Klorofil-a ($\mu\text{g/ml}$)	Fikosiyanin ($\mu\text{g/ml}$)
1A	1,258 \pm 0,070 ^{ab}	9,933 \pm 0,008 ^{ab}	2,166 \pm 0,202 ^a	7,954 \pm 0,735 ^a	19,583 \pm 5,917 ^a
1B	1,501 \pm 0,055 ^{bc}	9,920 \pm 0,100 ^a	2,300 \pm 0,057 ^{ab}	7,566 \pm 0,157 ^a	18,666 \pm 1,299 ^a
2A	1,695 \pm 0,073 ^{cd}	10,030 \pm 0,015 ^c	2,600 \pm 0,057 ^{bc}	17,166 \pm 0,884 ^c	73,416 \pm 8,982 ^c
2B	1,901 \pm 0,090 ^d	10 \pm 0,011 ^c	2,733 \pm 0,120 ^c	18,296 \pm 1,330 ^c	56,750 \pm 1,913 ^b
3A	1,257 \pm 0,120 ^{ab}	9,936 \pm 0,008 ^{ab}	2,266 \pm 0,145 ^{ab}	7,089 \pm 0,533 ^a	20,750 \pm 2,065 ^a
3B	1,399 \pm 0,026 ^{ab}	9,920 \pm 0,100 ^a	2,266 \pm 0,145 ^{ab}	7,381 \pm 0,282 ^a	24,791 \pm 2,545 ^a
K	1,219 \pm 0,054 ^a	9,956 \pm 0,006 ^b	2,566 \pm 0,088 ^{abc}	13,261 \pm 0,495 ^b	62,125 \pm 3,826 ^{bc}

1A: 0,3mM Fe⁺² + 902,6 μ M EDTA

2A: 0,3mM Fe⁺² + EDTA'sız

3A: 0,3mM Fe⁺² + 1353,9 μ M EDTA

1B: 0,3mM Fe⁺³ + 902,6 μ M EDTA

2B: 0,3mM Fe⁺³ + EDTA'sız

3B: 0,3mM Fe⁺³ + 1353,9 μ M EDTA

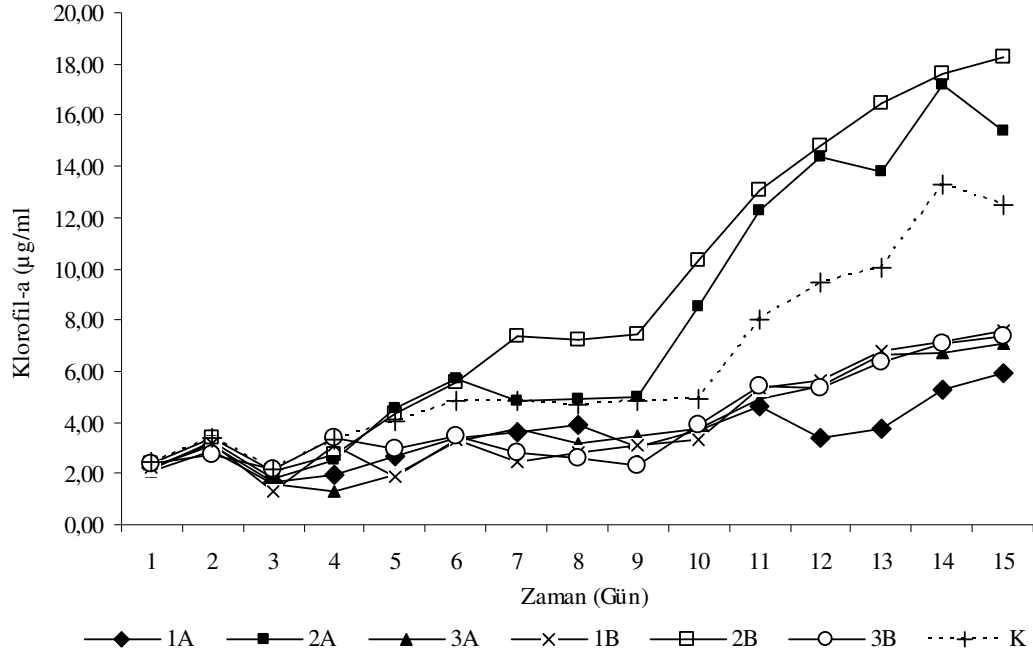
K: 0,1mM Fe⁺² + 451,3 μ M EDTA

$\bar{x} \pm S \bar{x}$ (aritmetik ortalama \pm standart hata)

Ortalamalar üç tekerrürlüdür (n=3). Aynı sütundaki farklı harfler farklılığın önemli olduğunu göstermektedir ($p<0,05$).

4.1.2. Klorofil-a Miktarları ($\mu\text{g/ml}$)

Spirulina platensis'in Fe^{+2} , Fe^{+3} ve EDTA içeren ve içermeyen ortamlarına göre klorofil-a değerlerinin zamanla değişimi Şekil 4.1.2.'de verilmiştir.



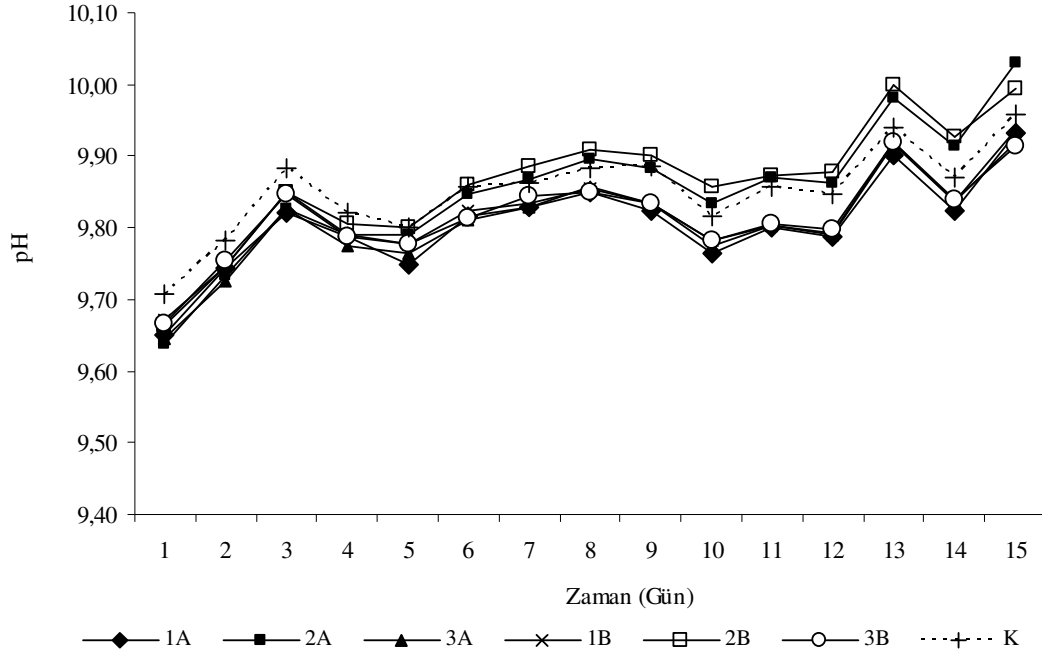
Şekil 4.1.2. Deneme gruplarına ait Klorofil-a ($\mu\text{g/ml}$) değerleri

Deneme süresince yapılan ölçümler değerlendirildiğinde; denemenin birinci gününden 9. gününe kadar bütün gruplarda yavaş bir klorofil miktarı artışı olduğu belirlenmiştir. Denemenin 9. ve 10. günlerinden itibaren kontrol grubu, 2A ve 2B gruplarına ait klorofil değerlerindeki artışın hızlandığı ve bu artışın denemenin 14. gününe kadar devam ettiği belirlenmiştir. Diğer gruplarda ise (1A, 3A, 1B, 2B) denemenin 11. günü başlayan artışın denemenin son gününe kadar devam ettiği tespit edilmiştir. Denemede belirlenen klorofil miktarları karşılaştırıldığında en yüksek değer 2B ($18,296 \mu\text{g/ml}$) grubuna ait olduğu belirlenmiştir.

Klorofil miktarlarına ait en yüksek değerler karşılaştırıldığında; 1B, 1A, 3A ve 3B gruplarına ait değerler arasında fark olmadığı ($p>0.05$), kontrol grubu ile 2A ve 2B grupları arasındaki farkın ise önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$) (Çizelge 4.1.1.).

4.1.3. pH Değerleri

Spirulina platensis'in Fe^{+2} , Fe^{+3} ve EDTA içeren ve içermeyen ortamlarına ait pH değerlerinin zamanla değişimi Şekil 4.1.3.'de verilmiştir.



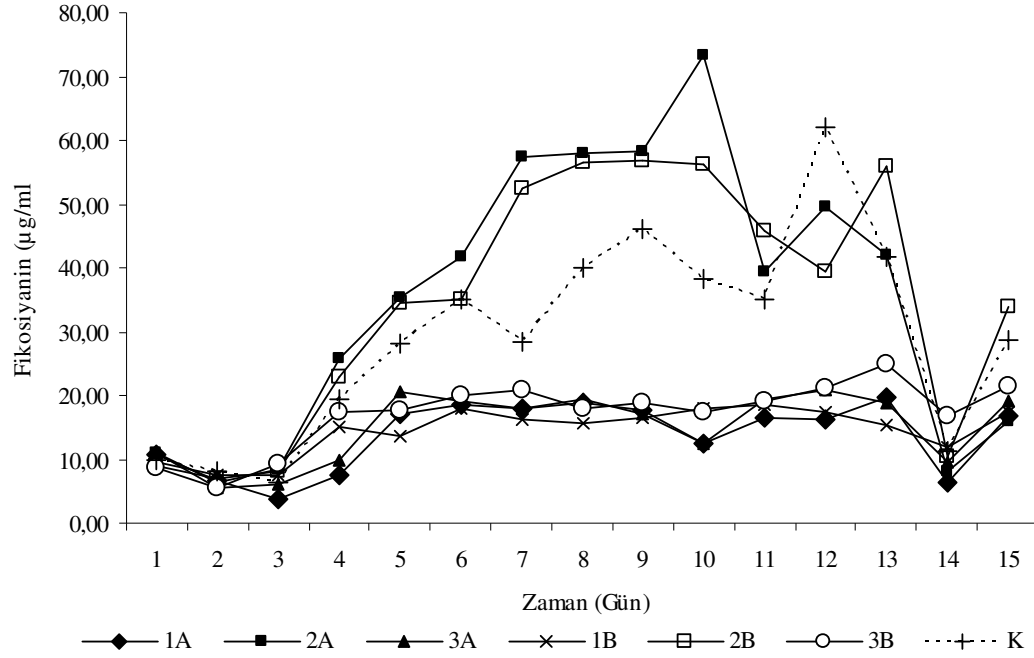
Şekil 4.1.3. Deneme gruplarına ait pH değerleri

Deneme gruplarına ait pH değerlerinin 3. güne kadar hızlı bir artış gösterdiği, ardından denemenin 6. gününe kadar bir azalma eğilimine girdiği ve denemenin son gününe kadar artışın devam ettiği belirlenmiştir. Denemede belirlenen en yüksek pH değerinin 2A (10,03) grubuna ait olduğu ve bu değere denemenin 15. gününde ulaşıldığı tespit edilmiştir.

Gruplara ait en yüksek pH değerleri karşılaştırıldığında; 1B ve 3B grupları arasında fark olmadığı ($p>0.05$), kontrol grubu ile 1A, 3A, 2A ve 2B arasındaki farkın ise önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$), (Çizelge 4.1.1.).

4.1.4. Fikosiyanin ($\mu\text{g/ml}$) Değerleri

Spirulina platensis'in Fe^{+2} , Fe^{+3} ile EDTA içeren ve içermeyen ortamlarına göre fikosiyanin ($\mu\text{g/ml}$) değerinin zamanla değişimi Şekil 4.1.4.'de verilmiştir.



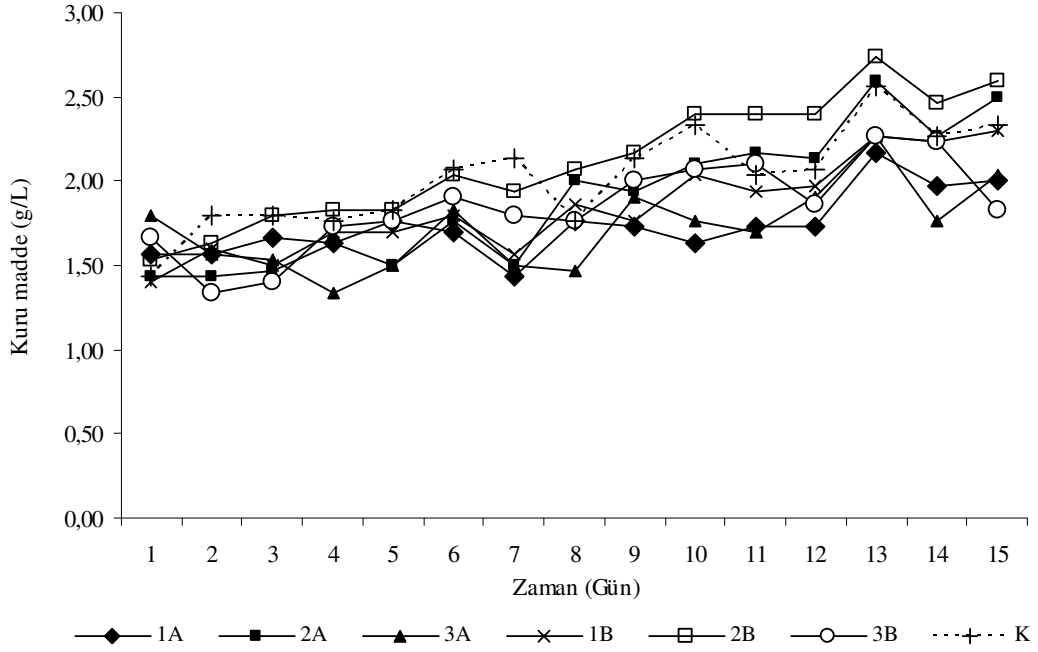
Şekil 4.1.4. Deneme gruplarına ait Fikosiyanin ($\mu\text{g/ml}$) değerleri

Denemede belirlenen fikosiyanin miktarları değerlendirildiğinde; ilk üç gün fikosiyanin miktarının başlangıç değerinde olduğu, dördüncü günden itibaren artışların başladığı belirlenmiştir. Deneme süresince kontrol grubu, 2A ve 2B gruplarında artışlarda denemenin belirli günlerinde hızlanmalar olduğu ve bu üç gruba ait değerlerin diğer dört gruba (1A, 3A, 1B, 3B) oranla nispeten iki üç kat arttığı belirlenmiştir. Denemenin 10. günü belirlenen 73,416 $\mu\text{g/ml}$ 'lik değer ile 2A grubu en yüksek değere ulaşırken, en düşük değere ise 11. günde 1B (18,666 $\mu\text{g/ml}$) grubunun ulaştığı saptanmıştır.

Deneme süresince elde edilen en yüksek değerler karşılaştırıldığında; 1A, 1B, 3A ve 3B aralarında fark olmadığı ($p>0.05$), kontrol grubu ile 2A ve 2B arasındaki farkın ise önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$), (Çizelge 4.1.1.).

4.1.5. Kuru madde (g/L) Değerleri

Spirulina platensis'in Fe^{+2} , Fe^{+3} ile EDTA içeren ve içermeyen ortamlardaki ait kuru madde (g/L) değerinin zamanla değişimi Şekil 4.1.5.'de verilmiştir.



Şekil 4.1.5. Deneme gruplarına ait Kuru madde (g/L) değerleri

Denemede belirlenen kuru madde miktarının en yüksek değerine denemenin 13. gününde ulaşıldığı belirlenmiştir. Denemenin diğer günlerine ait değerlerin hemen hemen birbirine yakın olduğu belirlenmiştir. Elde edilen en yüksek değerlerin sırasıyla 2B (2,733 g/L), 2A (2,600 g/L), kontrol grubu (2,566 g/L), 1B (2,300 g/L), 3B (2,266 g/L), 3A (2,266 g/L) ve 1A (2,166 g/L) gruplarına ait olduğu belirlenmiştir.

Gruplara ait en yüksek değerler karşılaştırıldığında; 1A, 1B, 3A ve 3B aralarında fark olmadığı ($p>0.05$), kontrol grubu ile 2A ve 2B arasındaki farkın ise önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$), (Çizelge 4.1.1.).

4.1.6. Büyüme hızı (μ =bölünme gün⁻¹)

Deneme süresince belirlenen kuru madde miktarları ile hesaplanan büyüme hızı değerleri gözden geçirildiğinde en yüksek büyüme hızı değerine $4,15 \cdot 10^{-1}$ böl. gün⁻¹ olarak sekizinci gün ulaşıldığı ve 2A grubuna ait olduğu belirlenmiştir. Diğer değerler ise sırasıyla; 9. günde $3,73 \cdot 10^{-1}$ böl. gün⁻¹ olarak 3A, 2. günde $3,29 \cdot 10^{-1}$ böl. gün⁻¹ olarak kontrol grubu, 13. günde $3,22 \cdot 10^{-1}$ böl. gün⁻¹ olarak 1A, 4. günde $3,08 \cdot 10^{-1}$ böl. gün⁻¹ olarak 3B, 8. günde $2,53 \cdot 10^{-1}$ böl. gün⁻¹ olarak 1B ve 13. günde $1,70 \cdot 10^{-1}$ böl. gün⁻¹ olarak 2B olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.1.6.).

Çizelge 4.1.6. Deneme gruplarına ait büyüme hızları (μ =bölünme gün⁻¹)

Gün	Gruplar						
	1A	2A	3A	1B	2B	3B	K
1							
2	$1,09 \cdot 10^{-13}$	$-1,19 \cdot 10^{-13}$	$-2,00 \cdot 10^{-1}$	$1,93 \cdot 10^{-1}$	$9,11 \cdot 10^{-2}$	$-3,22 \cdot 10^{-1}$	$3,29 \cdot 10^{-1}$
3	$8,93 \cdot 10^{-2}$	$3,32 \cdot 10^{-2}$	$-3,10 \cdot 10^{-2}$	$-9,31 \cdot 10^{-2}$	$1,40 \cdot 10^{-1}$	$7,04 \cdot 10^{-2}$	$-9,48 \cdot 10^{-14}$
4	$-2,91 \cdot 10^{-2}$	$1,55 \cdot 10^{-1}$	$-2,02 \cdot 10^{-1}$	$1,81 \cdot 10^{-1}$	$2,65 \cdot 10^{-2}$	$3,08 \cdot 10^{-1}$	$-2,70 \cdot 10^{-2}$
5	$1,13 \cdot 10^{-1}$	$-1,23 \cdot 10^{-1}$	$1,70 \cdot 10^{-1}$	$5,00 \cdot 10^{-14}$	$0,00 \cdot 10$	$2,75 \cdot 10^{-2}$	$5,34 \cdot 10^{-2}$
6	$-5,55 \cdot 10^{-2}$	$2,36 \cdot 10^{-1}$	$2,90 \cdot 10^{-1}$	$8,25 \cdot 10^{-2}$	$1,49 \cdot 10^{-1}$	$1,05 \cdot 10^{-1}$	$1,73 \cdot 10^{-1}$
7	$-2,46 \cdot 10^{-1}$	$-2,36 \cdot 10^{-1}$	$-2,90 \cdot 10^{-1}$	$-2,00 \cdot 10^{-1}$	$-7,28 \cdot 10^{-2}$	$-7,80 \cdot 10^{-2}$	$4,58 \cdot 10^{-2}$
8	$3,02 \cdot 10^{-1}$	$4,15 \cdot 10^{-1}$	$-3,24 \cdot 10^{-2}$	$2,53 \cdot 10^{-1}$	$9,62 \cdot 10^{-2}$	$-2,70 \cdot 10^{-2}$	$-2,72 \cdot 10^{-1}$
9	$-2,75 \cdot 10^{-2}$	$-4,89 \cdot 10^{-2}$	$3,73 \cdot 10^{-1}$	$-7,94 \cdot 10^{-2}$	$6,82 \cdot 10^{-2}$	$1,79 \cdot 10^{-1}$	$2,72 \cdot 10^{-1}$
10	$-8,57 \cdot 10^{-2}$	$1,19 \cdot 10^{-1}$	$-1,05 \cdot 10^{-1}$	$2,03 \cdot 10^{-1}$	$1,48 \cdot 10^{-1}$	$4,73 \cdot 10^{-2}$	$1,29 \cdot 10^{-1}$
11	$8,57 \cdot 10^{-2}$	$4,51 \cdot 10^{-2}$	$-5,55 \cdot 10^{-2}$	$-7,28 \cdot 10^{-2}$	$-7,13 \cdot 10^{-14}$	$2,31 \cdot 10^{-2}$	$-1,99 \cdot 10^{-1}$
12	$9,87 \cdot 10^{-14}$	$-2,24 \cdot 10^{-2}$	$1,60 \cdot 10^{-1}$	$2,47 \cdot 10^{-2}$	$7,11 \cdot 10^{-14}$	$-1,70 \cdot 10^{-1}$	$2,35 \cdot 10^{-2}$
13	$3,22 \cdot 10^{-1}$	$2,85 \cdot 10^{-1}$	$2,55 \cdot 10^{-1}$	$2,05 \cdot 10^{-1}$	$1,70 \cdot 10^{-1}$	$2,80 \cdot 10^{-1}$	$3,13 \cdot 10^{-1}$
14	$-1,40 \cdot 10^{-1}$	$-1,98 \cdot 10^{-1}$	$-3,60 \cdot 10^{-1}$	$-2,14 \cdot 10^{-2}$	$-1,30 \cdot 10^{-1}$	$-2,14 \cdot 10^{-2}$	$-1,79 \cdot 10^{-1}$
15	$2,42 \cdot 10^{-2}$	$1,41 \cdot 10^{-1}$	$2,03 \cdot 10^{-1}$	$-8,88 \cdot 10^{-2}$	$7,60 \cdot 10^{-2}$	$-2,85 \cdot 10^{-1}$	$4,18 \cdot 10^{-2}$

4.2. Tartışma

Spirulina platensis (Cyanophyta), alg kültüründe gerek ekonomik değeri gerekse kolay yetiştirilebilirliği ile tercih edilen önemli bir mikroalg türüdür. İçeriğinin her geçen gün ilerleyen teknolojiye paralel olarak fark edilmesi önemini giderek artırmaktadır. İçeriğinde bulunan pigment, protein, yağ ve vitamin gibi önemli metabolitler günümüzde pek çok alanda kullanılır hale gelmesini ve ticari değerinin artmasını sağlamaktadır. Diğer alg türleri gibi bu alg türünün de içeriğinin değiştirilebilmesi çeşitli kimyasal ve fiziksel koşullar ile mümkündür. Bu koşullar

sayesinde istenilen kalite ve kantite de metabolit elde edilmesi bu türün biyoteknolojik olarak da değerini artırmaktadır.

Mikroalgler; pH, sıcaklık, besin eksikliği, metal kombinasyonu gibi değişen ortam koşullarında farklı türde kimyasallar ve biyolojik olarak aktif bileşikler üretme potansiyeline sahip organizmalardır (Vonshak, 1997).

Bu çalışmada *Spirulina platensis*'in Fe^{+2} ve Fe^{+3} formunun, EDTA varlığında ve yokluğunda fikosiyanın ve biyomas değerlerine olan etkisi belirlenmiştir.

Denemede uygulanan gruplara Fe^{+2} , Fe^{+3} ile EDTA miktarları Çizelge 4.2.'de belirtildiği şekilde kodlanmıştır.

Çizelge 4.2. Denemede uygulanan parametrelere göre grupların kodlaması

Gruplar	Fe^{+2} (mM)	Fe^{+3} (mM)	EDTA(μ M)
1A	0,3		902,6
2A	0,3		-
3A	0,3		1353,9
1B		0,3	902,6
2B		0,3	-
3B		0,3	1353,9
K	0,1		451,3

Deneme süresince ölçülen en yüksek optik yoğunluk değerlerinin EDTA içermeyen, Fe^{+3} ilaveli 2B (1,901) grubuna ait olduğu tespit edilmiştir. Anderson ve Morel (1982), ışıksız ortamda Fe alım oranının Fe^{+3} aktivitesinin bir fonksiyonu olduğunu belirlemişlerdir. Işıklı ortamda ise, Fe alım oranının EDTA ve CTDA varlığında Fe (III)'ün Fe (II)'ye indirgendiği fotoreaksiyon ile arttığını gözlemlemişlerdir. Çelatör yokluğunda ise, Fe alım oranının ortama ilave edilen Fe (II) ve Fe (III)'ün konsantrasyonlarına bağlı olduğunu tespit etmişlerdir. Bu bağlamda çalışmamız EDTA içermeyen grupta optik yoğunluk değerlerinin yüksek olması sonucu önceki çalışmaları destekler niteliktedir. Yine ikinci en yüksek değer EDTA içermeyen Fe^{+2} ilaveli 2A (1,695) grubuna ait olması, sonuç olarak Fe^{+2} 'nin alımının da Fe^{+3} grubunda olduğu gibi EDTA ile ilintili olmadığını göstermiştir. EDTA içeren ortamlara ait optik yoğunluk değerleri sırasıyla 1,501 (1B), 1,399 (3B), 1,258 (1A), 1,257 (3A) olarak belirlenmiş ve değerler yapılan çalışmaları destekler niteliktedir.

EDTA içermeyen, Fe⁺³ ilaveli 2B grubuna ait klorofil-a (18,296 µg/ml) değerinin diğer klorofil-a değerlerine göre en yüksek değerde olduğu (p<0.05), yine EDTA içermeyen Fe⁺² ilaveli grupta klorofil-a değerinin (17,166 µg/ml) yüksek olduğu belirlenmiştir. İki yüksek klorofil-a değerinin EDTA içermeyen gruplarda olduğunun belirlenmesi, EDTA'nın klorofil-a sentezinde etkili olmadığını, diğer yandan Fe⁺² ve Fe⁺³ formunun klorofil-a sentezi etkileyen bir faktör olduğunu düşündürmektedir.

Martin ve Fitzwater (1988), çalışmalarında Fe ilavesi yapılan kültürlerde denemenin 3. gününden itibaren klorofil-a miktarında artış olduğunu bildirmişlerdir. Martin ve ark. (1991), çalışmalarında, Fe' in fitoplankton üretimini kontrol eden önemli eser metallere biri olduğunu ileri sürmüşlerdir. Morel ve ark. (1991), Fe ve Zn' nun fitoplankton üremesi üzerine önemli etkisinin olduğunu belirlemişlerdir.

Sayın (2004), *E.huxleyi* kültürlerinde EDTA'nın büyümeyi etkilemediği, klorofil-a miktarını düşük Fe (10 nM) dozunda etkilediği, aynı ortamlarda *T.weissflogii* kültürlerine ise EDTA'nın, yüksek Fe dozunda (100 nM) hem hücre yoğunluğunu hem de klorofil-a miktarını belirgin bir şekilde etkilediğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda bütün gruplarda biyomasın artışına paralel olarak pH'ında arttığı belirlenmiştir. En yüksek biyomasın elde edildiği 2A ve 2B gruplarında pH değerlerinin en yüksek değerlerine ulaştığı tespit edilmiş ve deneme boyunca ölçülen pH değerlerinin 9 - 10 arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir.

Sayın (2004), çalışmasında, Fe ilaveli EDTA'lı ve EDTA'sız koşullarda *E.huxleyi* ve *T.weissflogii* hücre yoğunluğunun artması ile ortamın pH değerinin arttığını bildirmiştir.

Boyd (1979), alg kültürlerinde büyümenin artışıyla beraber ortam pH değerlerinin de arttığı, pH değerinin artışının bile tek başına büyümenin takibinde izlenebilen bir yol olduğunu bildirmiştir. Çalışmasında pH değerinin fitoplankton patlamaları sırasında arttığını bildirmiştir.

Çalışmamızda artan büyüme ile, pH değerindeki artış, önceki çalışmaları desteklemektedir.

Fikosiyanın değerleri karşılaştırıldığında en yüksek sentezin sırasıyla; 2A (73,416 µg/ml), kontrol (62,125 µg/ml) ve 2B (56,750 µg/ml) grubunda olduğu tespit edilmiştir.

Denemeden elde edilen sonuç Fe formunun, EDTA'nın etkisi olmaksızın pigment üretimini etkileyen bir unsur olduğunu düşündürmektedir.

Bitkiler, fotosentez için gerekli olan yeşil klorofil pigmentini üretebilmek için demire gereksinim duyarlar. Doğrudan klorofilin yapısında yer almayan demir, klorofilin sentezlenmesi sırasında bir katalizatör (kolaylaştırıcı, hızlandırıcı) işlevi görür. Demir eksikliğinde ve Fe'in alınabilir formunun dışındaki varlığında bitkiler, yeterli klorofili üretemediği için yeterince fotosentez yapamaz; böyle bir durumda CO₂ ve mineraller gibi gerekli bütün besin maddeleri suda bolca bulunsa bile metabolik faaliyetler sınırlanır (Martin ve ark., 1989).

Bermejo ve ark. (2008), çalışmalarında Fe⁺² ve Fe⁺³ iyonlarının ortamda artması sonucunda, Fe⁺³ iyonlarının Fe⁺² iyonlarına oranla yaptığı etkinin daha güçlü olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca *S. platensis*'deki fikosiyanın miktarının 200 µg/ml'de EDTA'lı ortamda % 44.4±1.86, EDTA'sız ortamda ise % 39.5±0.87 olarak tespit etmişlerdir. Kobayashi ve ark. (1993), çalışmalarında *Haematococcus pluvialis*'in kültür ortamına Fe⁺² ilavesinin, karotenoid pigmentinin sentezini teşvik ettiğini belirtmişlerdir.

Çalışmamızda fikosiyanın üretiminde Fe⁺² formunun Fe⁺³ formuna oranla daha etkili olduğu, EDTA'nın fikosiyanın üretiminde etkili olmadığı, bu sonuçların önceki çalışmalarla paralel olduğu belirlenmiştir.

Deneme süresince elde edilen veriler karşılaştırıldığında en yüksek kuru madde miktarlarına sırasıyla; 2B (2,733 g/L), 2A (2,600 g/L), kontrol grubuna ait olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda elde edilen klorofil-a, optik yoğunluk ve fikosiyanın değerlerinde olduğu gibi, kuru madde miktarları değerlendirildiğinde de yine en yüksek değerlere 2B, 2A ve kontrol gruplarında ulaşıldığı belirlenmiştir. Adı geçen değerlerin benzer şekilde aynı gruplarda yüksek çıkması Fe formunun biyoması etkilediği sonucunu göstermektedir.

Harrison ve Morel (1986), *T.weissflogii* türünde Fe sınırlamasının etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, 1-100 nM Fe ve 10 µM EDTA içeren ortamlarda Fe yoğunluğunun azalmasıyla büyüme hızının ve hücrel Fe miktarının azaldığını ve en yüksek büyüme hızının arttığını saptamışlardır. En yüksek büyüme hızının $\mu_{max}=1.54\pm0.002$ bölünme gün⁻¹ ve hücrel Fe miktarının da 80 mol/hücre olduğunu bildirmişlerdir.

Deein ve ark. (2002), yürüttükleri çalışmada *Melosira granulata* ve *Angustissima f. spiralis* tatlısu alglerini kolloid demir içeren ortamda kültüre alarak en fazla ~250 000 hücre ml⁻¹ ve ~60 g Chl-*a* L⁻¹ elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bununla birlikte ~0.1 M çözünebilir Fe içeren örneklerde ise gelişim görülmediğini tespit etmişlerdir. Denemenin sonunda, tatlı su alglerinin kolloidal Fe'i kullanabildiklerini ve kolloidal Fe'in tatlı su algleri için gerekli olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Mckay ve ark. (1997), farklı FeCl₃ miktarlarında (10, 25, 50, 100 ve 1000 nM), 100 µM EDTA, 215 µmol foton m⁻² s⁻¹ aydınlanma ve 24 °C'de kültüre aldıkları *Thalassiosira weissflogii* ve *P.tricornutum* hücrelerinin büyüme oranlarını araştırmışlardır. *P.tricornutum*'da büyüme hızı değerlerinin Fe miktarlarının azalmasıyla yavaş yavaş azaldığını ve en yüksek büyüme değerinin 1.7 gün⁻¹ olduğunu tespit etmişlerdir. *T.weissflogii* için ise; 50, 100 ve 1000 nM Fe miktarlarında 1.64-1.74 gün⁻¹ arasında, 25 nM Fe miktarında ise 1.21 gün⁻¹ olarak oldukça düşük olduğunu tespit etmişlerdir. *T.weissflogii*'de 10nM Fe içeren kültür ortamında büyüme oranının belirlenemediğini ve bu koşulların altında gelişim gözlenmediğini belirtmişlerdir.

Çalışmamızda elde edilen en yüksek büyüme hızı değerlerine bakıldığında elde edilen deneme gruplarının Fe⁺² içerdiği belirlenmiştir. İlerleyen teknoloji ile beraber toplam demir kavramından ziyade demirin formunun ve alınabilirliğinin önemli olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla şimdiye kadar genel bir kanı olan tatlı sularda yüksek toplam demir varlığının fitoplankton büyümesi için bir şey ifade etmediği yapılan son çalışmalar ile belirlenmiştir. Demir çok çabuk form değiştiren, alınabilirliği pek çok etkenden dolayı sınırlanabilen bir elementtir. Şimdiye kadar tatlı su türlerinde eksik olan bu çalışmanın yararlı olacağı düşüncesini taşımaktayız.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, dünyada içeriğinin belirlenmesi ile artan öneminden dolayı yoğun olarak yetiştiriciliği yapılan *Spirulina platensis*'in laboratuvar koşullarında Fe^{+2} , Fe^{+3} ve EDTA 'nın fikosiyanın içeriğine etkisi araştırılmıştır. Araştırma sürecinde; optik yoğunluk (O.D= ışık geçirgenliği), klorofil-a miktarı ($\mu\text{g/ml}$), kuru madde (g/L), pH değişimi, büyüme hızı ($\mu=\text{bölünme/gün}$) ve fikosiyanın miktarları belirlenmiştir. Araştırma sonuçları dikkate alındığında;

Spirulina platensis'in deneme sonucunda elde edilen en yüksek değerleri sırasıyla: optik yoğunluk; 2B (1,901) ve 2A (1,695), pH; 2A (10,03) ve 2B (10,00), kuru madde miktarı; 2B (2,733 g/L) ve 2A (2,600 g/L), klorofil-a miktarı; 2B (18,296 $\mu\text{g/ml}$) ve 2A (17,166 $\mu\text{g/ml}$), fikosiyanın miktarı; 2A (73,416 $\mu\text{g/ml}$), kontrol grubu (62,125 $\mu\text{g/ml}$) ve 2B (56,750 $\mu\text{g/ml}$) olarak belirlenmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen verilerden, *S.platensis*'in gelişimine ortamda EDTA bulunmadığında Fe^{+2} ve Fe^{+3} formunun etkili olduğu belirlenmiştir.

EDTA ilaveli (902,6 μM) Fe^{+3} formu (1B) O.D değerini etkilerken, kontrol grubuna (EDTA miktarı: 451,3 μM) ait klorofil-a, fikosiyanın, pH ve kuru madde miktarlarının artışının diğer EDTA içeren gruplara göre yüksek olduğu belirlenmiştir.

Tez çalışmamızın sonucunda EDTA ilaveli veya ilavesiz deneme grupları değerlendirildiğinde *Spirulina platensis*'in gelişimine Fe^{+3} formundan ziyade Fe^{+2} formunun etkili olduğu saptanmıştır.

Deneme sonucunda elde edilen bulguların ticari veya deneysel olarak *Spirulina platensis* üretimi yapacak olan araştırmacı ve de üreticilere katkıda bulunacağı sonucuna varılmıştır. *Spirulina platensis*'in günümüzde sanayileşmenin getirdiği artan kirlilik ve azalan tarım sahalarından birim alandan daha yüksek ürün elde edilmesine uygun iyi bir alternatif yetiştiricilik materyali olarak sunulabileceği açıkça görülmektedir. Çalışmamız ile elde edilen verilerin değerlendirilmesi ile birçok biyoteknolojik çalışmaya referans olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abd El-Baky, H. H., 2003. Over Production of Phycocyanin Pigment in Blue Green Alga *Spirulina sp.* And It's Inhibitory Effect on Growth of Ehrlich Ascites Carcinoma Cells. **J.Med. Sci.**, 3(4) :314-324 p.
- Anderson, D.W., Tang, C.S. and Ross, E., 1991. The Xantophylls of *Spirulina* and Their Effect. **Poultry Sciens**, 70:115 p.
- Anderson, M. A. and Morel, F. M., 1982. The influence of Aqueous Iron Chemistry on the Uptake of Iron by the Coastal Diatom *Thalassiosira weissflogii*. **Limnol. Oceanogr.**, 27:789-813.
- Anonim, 2009. Akvaryum Bitkileri ve Demir. <http://www.bilyap.com.tr/magazin/mag2/concept2S2.php>.
- Anonim, 2009a. *Spirulina* nedir? <http://www.akvaryumkulubu.org/vbulletin/showthread.php?t=42236>
- Anonymous, 2009. Effect of Dissolved Organic Substances and Iron on the Growth of Cyanobacteria. **VIII Ogólnopolska Konferencja Naukowa**, p 635.
- Banse, K., 1991. Rates of phytoplankton cell division in the fib iron enrichment experiments. **Limnol. Oceanogr.**, 36(8).
- Becker, E. W., 1994. **Microalgae: Biotechnology and microbiology**, Cambridge University Press, UK, 293 p.
- Belay, A., Ota, Y., 1993. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. **Pub. in Journal of Appl. Phycology**, 5:235-241.
- Bermejo-Bescós, P., Piñero-Estrada, E. and Ángel M. Villar Del Fresno, 2008. Neuroprotection by *Spirulina platensis* protean extract and phycocyanin against iron-induced toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Toxicology in Vitro** 22:1496-1502.
- Boussiba, S. and Richmond, A., 1979. Isolation and Characterization of Phycocyanin From the Blue-Green Alga *Spirulina platensis*. **Arch. Microbiol.**, 120: 155-159.
- Boussiba, S. and Richmond, A., 1980. C-Phycocyanin as a Storage Protein in the blue-green Alga *Spirulina platensis*, **Arch. Microbial.**, 125: 145 p.
- Boussiba, S. and Vonshak, A., 1992. Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis*. **Methods in Enzymology**, 213:386-391.
- Boyd, C. E., 1979. **Water Quality in Warmwater Fish Ponds**. Auburn University Agricultural Experiment Station. 482 pp. No Month.
- Ciferri, O., 1983. *Spirulina*, The Edible Microorgogonism, **Microbiol. Rev.**,47:551p.
- Cohen, Z., 1997. The Chemicals of *Spirulina*, 175-204, *Spirulina platensis* (Arthrospira): Physiology, **Cell Biology and Biotechnology**, Vonshak, A.(Ed.),Taylor and Francis, London, 226 p.
- Dainippon Ink and Chemicals INC., 1980. **Production of Highly Purified Alcoholophilic Phycocyanin**, Japanese Patent 80-77:890 p.
- Deein G., Thimdee, W. and Matsunaga K., 2002. Bioavailable colloidal iron in river water originated from the forest. **Marine and Freshwater Research** 53(1) 43-47.
- Duce, R. A., Tindale, N. W., 1991. Atmospheric transport of iron and its deposition in the ocean. **Limnology and Oceanography** 36, 1715–1726.

- Entwisle, T. J., Sonneman, J. A. ve Lewis, S. H. 1997. **Freshwater Algae in Australia**. Sainty and Associates Pty Ltd. Potts Point, NSW.
- Fox, D. R., 1996. **Algoculture: Spirulina, hop efor a hungry world**. Pub. By Editions Edisud, Aix-en-Provence, La Calade, R.N.7, 13090, France.
- Fox, J. M., 1983. Intensive algal culture techniques. In: **CRC Handbook of mariculture**. Volume 1. Crustacean Aquaculture. McVey J P (Ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA, pp 43-69.
- Geitler, L., 1925. **Cyanophyceae**. In Pascher, A. (ed.). Süsswasserflora von itteleuropa. 12, Jena : Verlag von Gustav Fischer. 481 p.
- Gerhardt, A., 1993. Review of impact of heavy metals on stream invertebrates with special emphasis on acid conditions. **Wat. Air Soil Pollut.**, 66: 289-314.
- Gerhardt, A., 1994. Short term toxicity of iron (Fe) and lead (Pb) to the mayfly *Leptophlebiu marginata* (L.) (Insecta) in relation to freshwater acidification. **Hydrobiologia**, 284: 157-168.
- Geringa, L. J. A., De Baar, H. J., Timmermans, W., 2000. A comparison of iron limitation of phytoplankton in natural aceanic waters and laboratory media conditioned with EDTA. **Marine Chemistry.**, 68; 335-346.
- Gomez-Lojero, C., Perez-Gomez, B., Prado-Flores, G., Krogmann, D. W., Carabez-Trejo, A. and Pena-Diaz, A., 1997. The.phycobilisomes of the cyanobacterium *Arthrospira (Spirulina) maxima*. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 29, 1191-1205.
- Guillard, R. R. L., 1973. **Division Rates in Handbook of Phycological methods (J. R. ETEIN editör). Culture Methods and Growth Measurements**, Chambridge Universty Press, Chambridge, pp.289-311.
- Harrison, G. J, and Morel, F. M. M., 1986. Response of marine diatom *Thalassiosira weissflogii* to iron stress. **Limnol. Oceanogr.**, Vol.31, pp.989-997.
- Henrikson, R., 1993. **Microalga Spirulina**. Oikos Pharmaceuticals, C/San Pedro, 29640 Fuengirola, Malaga Costa del Sol, Spain.
- Huebers, H. A., 1991. Iron. **In: Merian, E. (ed.): Metals and their compounds in the environment**. Chapt. II. 14: 94% 958.
- Hutchins, D. A., Franck, V. M., Brzezinski, M. A., Bruland, K. W., 1999. Inducing phytoplankton iron limitation in iron replete coastal waters with a strong chelating ligand. **Limnol. Oceanogr.** 44, 1009-1018.
- Hutchins, D. A., Ditullio, G. R., Bruland, K. W., 1993. Iron and regenerated production: evidence for biological iron recycling in two marine environments. **Limnol. Oceanogr.** 38(6):1242-1255.
- Hyenstrand, P., Rydin, E., and Gunnerhed, M., 2000. Response of pelagic cyanobacteria to iron additions enclosure experiments from Lake Erken. **Journal of Plankton Research** Vol.22 no.6 pp.1113-1126.
- Knauer K., Buffle J., 2001. Adsorption of fulvic acid on algal surfaces and its effect on carbon uptake. **J. Phycol.** 37, 47-5.
- Kobayashi, M., Kakizono, T., Nagai, S., 1993. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*. **Appl. Environ. Microbiol.** 59, 867-873.
- Landing, W. M., Bruland, K. W., 1987. The contrasting biogeochemistry of iron and manganese in the Pacific Ocean. **Geochimica et Cosmochimica Acta** 51, 29-43.
- Madhyastha, H. K. and Vatsala, T. M., 2007. Pigment production in *Spirulina fussiformis* in different photophysical conditions. Biomolecular Engineering, **6th Atlantic Symposium on Computational Biology** 24, Pages 301-305.

- Marquez-Rocha, F., Lamela, T., 2000. Phycocyanin Production in Seawater Culture of *Arthrospira maxima*, **Ciencias Marinas**, 26(4): 607-619.
- Martin, J. H., Fitzwater, S. E., 1988. Iron deficiency limits phytoplankton growth in the north-east Pacific subarctic. **Nature**, 331:341-343.
- Martin, J. L., Gordon, R. M., Fitzwater, S. E., 1991. The case for iron. **Limnol. Oceanogr.**, 6:1793-1802.
- Martin, J. L., Gordon, R. M., Fitzwater S. E., Broenkow, W. W., 1989. Deep-Sea Research. Part A. **Oceanographic Research**, Page:36.
- Mckay, C. J., Curran F., Sharples C., Baxter J. N., Imrie C. W., 1997. **Prospective placebo-controlled randomized trial of lexipafant in predicted severe acute pancreatitis**. *Br J Surg.*, 84:1239-1243.
- Miki, W., Yamaguchi, S. and Konosu, S., 1986. Carotenoid Composition of *Spirulina maxima*, **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.**, 7:1225 p.
- Miller, C. B., Flost, B. W., Wheeler, P. A., Landry, M. R., Welschemery, N., Powell, T. M., 1995. Ecological dynamics in the subarctic Pacific, a possibly iron-limited ecosystem. **Limnol. Oceanogr.**, 36(8):1600-1615.
- Morel, F., Rueter, J., and Price, N., 1991. Iron nutrition of phytoplankton and its possible importance in the ecology of ocean regions with high nutrient and low biomass. **Oceanogr.** 4: 56-61.
- Muggli, D. L., Lecourt, M., Harrison, P. J., 1996. Effects of iron and nitrogen source on sinking rate, physiology and metal composition of an oceanic diatom from the subarctic Pasific. **Marine Ecol. Prog Series.**,132:215-227.
- Oğuz, H., 2009. Çukurova İklim Koşullarının *Spirulina Platensis* (Cyanophyta)'deki Fikosiyanın Miktarına Etkisi. **Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi**, Adana/TÜRKİYE.
- Öztürk, M., Steinnes, E. and Sakshaug, E., 2002. Iron speciation in the Trondheim Fjord from the perspective of iron limitation for phytoplankton. *Estuarine, Coastal and Shelf Sciences*, 55:197-212.
- Pandey, U. and Pandey, J., 2008. Enhanced production of biomass, pigments and antioxidant capacity of a nutritionally important cyanobacterium *Nostochopsis lobatus* **Bioresource Technology** 99:4520-4523.
- Richmond, A., 1986. **Outdoor Mass Cultures of Microalgae. (A. Richmond Editör). Handbook of Microalgal Mass Cultures of Microalgae.** CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 285-329.
- Sarada, R., Pillai, M. G., Ravishankar, G. A., 1998. Phycocyanin from *Spirulina sp*: Influence of Processing of Biomass on Phycocyanin Yield, Analysis of Efficiency of Extraction Methods and Stability Studies on Phycocyanin. **Process Biochemistry**, 34:795-801 p.
- Sayın. S., 2004. Farklı Fe Dozlarının (0, 10, 100 nM) Suni Ligand EDTA Varlığı ve Yokluğunda, *Emiliana huxleyi* (Coccolithophore) ve *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyta) Türlerine Etkileri. **Çukurova Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı Doktora Tezi**. Adana/TÜRKİYE.
- Sayın. S., Işık. O., Hızarcı. L., 2006. EDTA (Etilendiamintetraasetat)'nın 10nM Fe(III) Konsantrasyonunda *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyta)'nın Büyümesine Etkileri. **Ege Su Ürünleri Dergisi**, 23 (1/1): 141-144.
- Singh, N. K., Parmar, A. and Madamwar, D., 2009. Optimization of medium components for increased production of C-phycocyanin from and its purification by single step process. **Bioresource Technology** 100:1663-1669.

- Sunda, W. G., Huntsman, S. A., 1997. Interrelated influence of iron, light and cell size on marine phytoplankton growth. **Nature**, 390, pp.389-392.
- Sunda, W. G., Huntsman, S. A., 1995. Iron uptake and growth limitation in oceanic and coastal phytoplankton. **Marine Chemistry**, 50, 189– 206.
- Taylor, W. R., 1964. The genus *Turbinaria* in eastern seas. **Journal of the Linnean Society, Botany**, 58: 475-489.
- Turpin, P. J. F., 1829. *Spiruline oscillarioide*. In **Dictionnaire des Sciences Naturelles**. Paris : F. G. Levrault.
- Van Leeuwe M. A., Timmermans K. R., Witte H. J., Kraay G. W., Veldhuis M. J. W., De Baar H. J. W., 1998. **Effects of iron stress on chromatic adaptation by natural phytoplankton communities in the Southern ocean**. 166: 43-52.
- Vonshak, A., 1997. Morphology, Ultrastructure and Taxonomy of *Arthrospira* (*Spirulina*): The Basic Concept. (L.Tomoselli editör). *Spirulina platensis* (*Arthrospira*) Physiology, **Cell-Biology and Biotechnology**. Taylor&Francis Ltd. Great Britain, pp.1-15.
- Yılmaz, M., 2001. Farklı Kültür Koşullarının *Spirulina platensis* (Gom.) Geitler'in Büyümesi ve Fikosiyanın Miktarı Üzerine Etkisi. **Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi**. İzmir/TÜRKİYE.
- 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 máxima*** (Set. Ch. Et. Gardner) Geitler. Ph. D. Thesis, University of Paris.
- Zhang, J., 2000. Evidence of trace metal limited photosynthesis in eutrophic estuarine and coastal waters. **Limnol. Oceanogr.** 45, 1871-1878.
- Zhou, Z. P., Liu, L. N., Chen, X. L., Wang, J. X., Chen, M., Zhang, Y. Z. and Zhou, B. C., 2005. Factors That Effect Antioxidant Activity of C-Phycocyanins from *Spirulina platensis*. **Journal of Food Biochemistry**, 29:313-322 p.
- Zhuang, G., Yi, Z., Duce, R. A. & Brown, P. R., 1992. Link between iron and sulphur cycles suggested by detection of Fe (II) in remote marine aerosols. **Nature** 355:537-539.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimime başladığım ilk günden itibaren, ilgi ve desteğini esirgemeyen, büyük bir sabır ve titizlikle bilgi ve tecrübelerini aktararak gelişmemi sağlayan, inandığım ve güvendiğim değerli danışman hocam, Sayın Yrd.Doç.Dr.Selin SAYIN'a, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam esnasında denemelerimin yürütülmesi ve analizler sırasında yardımlarını gördüğüm Su Ürünleri Mühendisi Burak Sezgin ÖZYÜREK'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresinde Mustafa Kemal Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesindeki hocalarıma ve arkadaşlarıma desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Ayrıca, tez çalışmam esnasında varlığımı bütünleyen, bana inanıp sürekli cesaret veren, maddi ve manevi olarak beni yalnız bırakmayan çok değerli annem, babam ve kardeşlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Malatya'nın Darende ilçesinde doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Adana'da tamamladım. 2002 yılında girdiğim Mustafa Kemal Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'nden, 2006 yılında, Su Ürünleri Mühendisi ünvanıyla mezun oldum. Aynı yıl içerisinde Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladım.