

Emiliana huxleyi (Prymnesiophyceae)'nin Büyümesinde İki Farklı Fe konsantrasyonu (10nM ve 100nM) ve EDTA (Etilendiamintetraasetat)'nın Etkisi

Selin Sayın¹, Oya Işık²

¹ İskenderun Teknik Üniversitesi, Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi

² Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi

*sorumlu yazar: selin.sayin@iste.edu.tr

Özet

Biyolojik olaylarda önemli görevleri olan demir (Fe)'in sucul sistemde alınabilir formlarını ve alımını etkileyen faktörler halen tam olarak bilinmemektedir. Çalışmada, iki farklı demir (10-100 nM) içeren F/2 besi ortamında, suni ligand EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit) (100µM)'nin, *Emiliana huxleyi*'nin büyümesine etkileri araştırılmıştır. Denemede ortam sıcaklığı 18 ± 2 °C ve aydınlanma şiddeti ise $80\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ olacak şekilde ayarlanmıştır. Denemede kullanılan deniz suyu, makro besleyiciler ve EDTA, Chelex-100 reçinesi ile eser metallere arındırılmıştır. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, en yüksek hücre yoğunluğu, klorofil-a miktarı ve hücrel Fe oranının 100nM Fe ve EDTA içeren *E.huxleyi* kültürlerine ait olduğu, en yüksek spesifik büyüme hızının ise 10nM Fe+EDTA içeren kültürlerden elde edildiği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Demir, *Emiliana huxleyi*, EDTA, Büyüme, Alınabilir form.

Abstract

The factors affecting the uptake and intake of iron (Fe), which has important roles in biological events, in the aquatic system are still unknown. In the study, the effects of artificial ligand EDTA (Ethylenediaminetetraacetate) (100µM) on the growth of *Emiliana huxleyi* were investigated in F / 2 medium containing two different iron (10-100 nM). In the experiment, the ambient temperature was 18 ± 2 °C and the luminous intensity was adjusted to be $80\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Sea water, macronutrients and EDTA used in the experiment were cleaned from trace metals by passing through Chelex-100 resin. When the data obtained were evaluated, it was found that the highest cell density, chlorophyll-a amount and cellular Fe ratio belong to *E.huxleyi* cultures containing 100nM Fe and the highest specific growth rate was obtained from cultures containing 10nM Fe + EDTA.

Keywords: Iron, *Emiliana huxleyi*, EDTA, Growth, Available form

1.Giriş

Kimyasal, fiziksel ve biyolojik içerik olarak karmaşık bir yapı içeren denizler, yapısını oluşturan canlı, cansız unsurlar ve birbirleri ile olan etkileşimleri yıllardır bilim adamlarının ilgisini çekmiştir. Deniz suyunun cansız unsurları, kimyasal bileşimini oluşturan elementler fitoplankterler için hayati fonksiyonlara sahiptirler. Yaşamın başlangıcı ve devamlılığı, bu elementlerin deniz suyundaki dağılımlarına, derişimlerine ve fitoplankterlerce kullanılabilir formlarda olmalarına bağlıdır. Özellikle altı biyoaktif eser metalin (Fe, Mn, Ni, Cu, Co ve Zn) yokluğu ve/veya yüksek konsantrasyonlarının da benzer şekilde sınırlayıcı etki gösterebilecekleri yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Brand ve ark., 1986; Sunda, 1988; 1989).

Fitoplankton yoğunluğu ve çeşitliliği için deniz suyunun içerdiği eser metaller, yoğunlukları, formları ve bileşik oluşturmaları ile doğrudan ilişkilidirler (Shkolnik, 1984). Her eser metalin rol oynadığı farklı metabolik olaylar vardır. Bu elementler arasında Fe, bitki metabolizmasında biyolojik olayları kontrol eden (fotosentez, solunum, elektron taşınımı, klorofil sentezi, enzimatik işlevler) en önemli elementlerden birisidir (Sunda ve ark., 1995). Miktarı belirleme çalışmalarında, Fe yoğunluğu yüzey suyundan itibaren derinliğe doğru (0-4000m); 0.0, 0.2, 0.4, 0.6 ve 0.8 nM olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre deniz suyunda belirlenen Fe miktarı 1nM'in altındadır (Martin ve ark., 1989). Deniz suyunda demir, Fe(II) ve Fe(III) olarak iki oksidasyon formunda bulunur. Okside formlar, çözülmüş organik, inorganik bileşikler, kolloidler ve partikül yapılarını içermektedir (Öztürk ve ark., 2002; Öztürk ve ark., 2003a; Schoemann ve ark., 1998). Fe'in bulunduğu bütün bu formlar toplam Fe olarak nitelendirilir. Fe'in kimyasal formları ise çok çeşitlidir ve çözülmüş Fe'in %95'den fazlası organik kompleks halinde bulunur (Öztürk ve ark., 2002). Kıyısız sistemlerde, fitoplankton gelişimi için toplam Fe varlığının aksine, ortamdaki Fe'in formu önemlidir (Öztürk ve ark., 2003b). pH, tuzluluk, ışık şiddeti, ısı, oksijen miktarı vs. gibi çeşitli çevre koşulları gibi faktörler, Fe'in biyolojik olarak kullanılabilirliğini etkileyen önemli faktörlerdir (Wells ve ark.,1983).

Metal ve çok dişli ligand arasında bir "zincir" ya da "kafes" yapı oluşumuna "şelatlanma"; metal ile bağlanmayı gerçekleştiren organik yapıya "şelatlayıcı"; oluşan kimyasal yapıya da "şelat" denir. Şelat ifadesi yunanca yengeç kısıkağı anlamına gelen "Chela" kelimesinden türemiştir. Şelat oluşumu doğada, özellikle akuatik sistemlerde metallerin biyolojik olarak kullanılabilir forma geçmesine yardımcı oldukları gibi bazen de kullanılmaz hale getirebilirler. Bu organik maddeler fitoplanktonik hücreler tarafından salgılanabildiği gibi, ortamda doğal olarak veya kültür çalışmalarında kullanıldığı gibi sentetik olarak mevcuttur. Ligandlar, kompleks yapıya sahip organik; EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit), NTA, DTPA veya inorganik; Cl, CO₃ gibi formlarda bulunabilirler. Ortamda doğal olarak bulunan başlıca ligandlar; sideroforlar, heme molekülleri, humik asitler, fulvik asitler ve hidrokarboksilik asitlerdir. Bu organik maddelerin yokluğu, deniz suyunda Fe konsantrasyonunun 0.01nM düzeylerine düşmesin sebep olabilir (Hutchins ve ark., 1991).

Yapılan çalışmalarla, CO₂ ve CaCO₃ döngüsünde rol oynayan tek hücreli fitoplankton *E. huxleyi* bloomlarının, Fe içeren Sahra kökenli tozların uzak bölgelere taşınması ile mümkün olabildiği belirlenmiştir (Saydam ve Polat, 1999). *E. huxleyi* birincil üretim ile karbonu organik madde olarak tutabilir ve karbonunun çoğunu proteinler yerine lipite transfer eder, bu yüzden de diğer türler ile karşılaştırıldığında yüzey suyundan nitrojenden daha çok karbon alır. Karbon ise önemli bir sera gazıdır ve iklim değişimlerinde önemlidir (Fernandez ve ark., 1996).

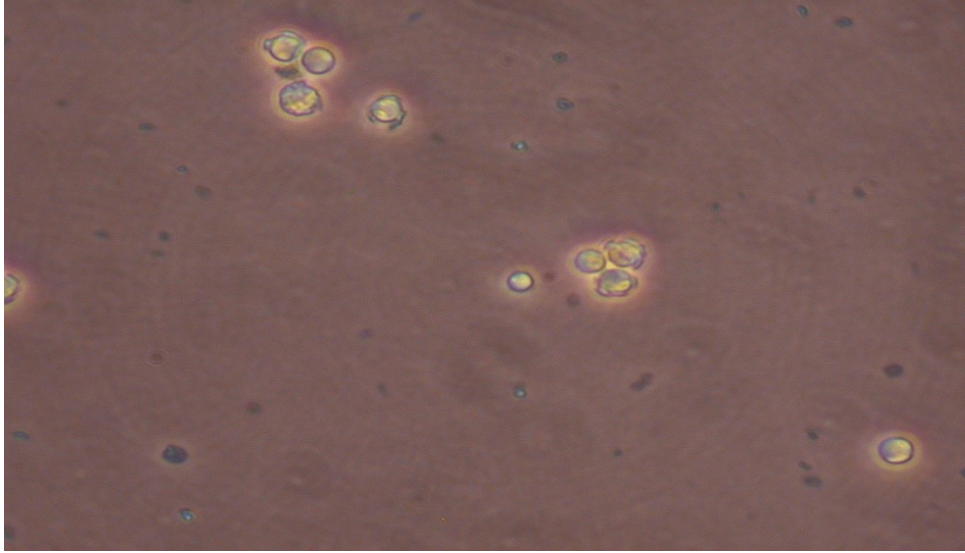
Yoğun biyomas eldesi için kültür çalışmalarında doğal suları taklit etmek amacıyla, metal iyonlarının konsantrasyonlarını ve yapılarını kontrol etmek, metallerin toksitesini indirmek veya yok etmek, metallerin ve özellikle Fe'in alınabilirliğini artırmak gibi amaçlarla suni ligandlar (EDTA, NTA, CDTA vs.) özellikle EDTA kullanılmaktadır (Geringa ve ark., 2000). Bu çalışma, 10nM Fe(III) içeren kültür ortamlarında, 100µM EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit)'nin, *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae)'nin hücre yoğunluğu (hücre/ml), klorofil-a miktarı (µg/L), büyüme hızı

(μ =bölünme/gün), hücresel klorofil-a miktarı (pg/hücre), hücresel Fe miktarı (amol/hücre) ve ortamın pH değişimi üzerine etkilerini belirlemek amacıyla planlanmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

Araştırmada, bir Coccolithophore olan ve 270 bin yıl öncesinden günümüze kadar ekolojik rollerinin

öneminden dolayı bilinen *Emiliana huxleyi* (Lohman) türü kullanılmıştır. (Paasche, 2002). *E. huxleyi*, Haptophyta bölümüne ait, pikoplanktonik, mesotropik ve oligotropik sularda fotosentetik biomasa en fazla katkıda bulunan, ökaryotik bir mikroalgdir (Van den Hoek ve ark., 1995) (Şekil 1).



Şekil 1. *Emiliana huxleyi* (Lohman)-Orjinal

Araştırmada kullanılan kültür ortamları ve deniz suyunun partikül ve bakterilerden arındırılması işlemlerinde sırasıyla, 0.45 μ m ve 0.2 μ m göz açıklığına sahip filtrelerden yararlanılmıştır. Filtrelenmiş deniz suyunun pH ayarları yapılarak içerdiği eser metallerin çözünür hale gelmesi sağlanmış ve sonrasında, 5ml/dk.'lık akış hızı (sistemin en etkin çalıştığı hız) ile Chelex-100 (Imminodiacetate) reçinesinden geçirilerek eser metallerinden arındırılmıştır (Şekil 2), (Öztürk, 2002-2003-2004; Kişisel iletişim). Araştırmada kullanılan bütün cam ve plastik malzemeler, filtreler, hidroklorik asit (HCl-Merck) yardımıyla yüzeylerindeki eser metallerinden arındırılmış ve distile su ile durulanmıştır.

Deney kültür ortamlarının hazırlanması amacıyla, eser metallerden arındırma işlemi (Chelex kolonundan geçirilmiş) yapılmış olan deniz sularının pH'ı 3'e düşürülmüş ve Si ilavesi yapılmıştır. Silis ilavesinden sonar 48 saat bekletilen deniz sularının

pH'ı 8 ± 0.1 'e ayarlanmıştır. pH ayarlarında WTW-330 marka pH metre ve esermetallerden isothermal yöntem ile arındırılmış NH_4 kullanılmıştır (Öztürk, 2002-2003-2004; Kişisel iletişim).

Araştırma türü olan *E. huxleyi*'nin kültüre alınacağı deniz suyuna (esermetallerden arındırılmış) sırasıyla; EDTA, eser metal, vitamin solüsyonları ve son olarak da Fe(III) (10nM, 100nM) solüsyonu ilavesi yapılarak F/2 ortamı hazırlanmıştır. Hazırlanan F/2 kültür ortamlarının pH'ı yeniden 8 ± 0.1 'e ayarlanmıştır. Denemeler iki farklı demir yoğunluğunda (10nM, 100nM), EDTA (suni ligand) yokluğunda ve varlığında (100 μ M) gerçekleştirilmiştir. Deneyler, üç tekrarlı olarak yürütülmüştür.

Klorofil-a analizleri Parson ve Strickland (1963)'e göre yapılmıştır. Gruplara ait en yüksek klorofil-a değerleri (μ g/L), hücre yoğunluğuna (hücre/L) bölünerek hücresel klorofil-a değerleri hesaplanmıştır. Klorofil-a değerleri aşağıda belirtilen

formüle koyularak deneme gruplarına ait büyüme hızları (μ =bölünme/gün) hesaplanmıştır.

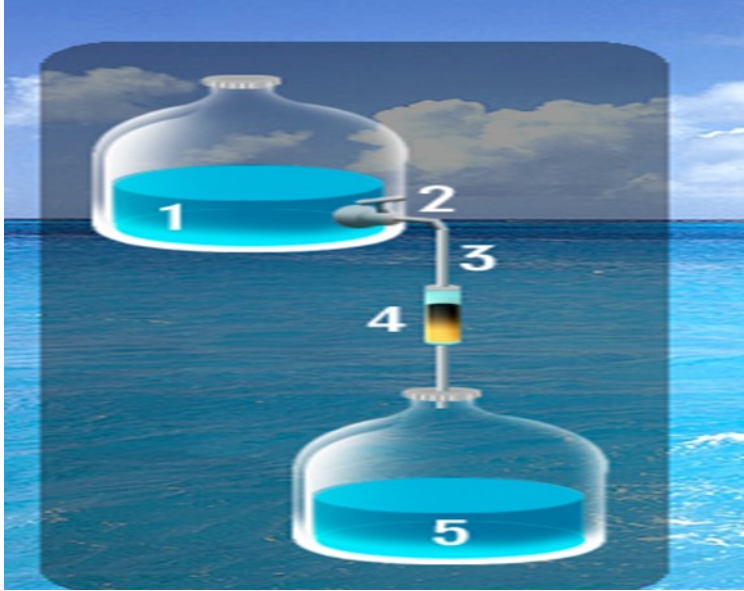
$$\mu = (N1/ N0) \times (3.322 / t) \text{ (Guillard, 1973).}$$

N1 : Başlangıç klorofil-a miktarı ($\mu\text{g/L}$)

N0 : t zamandaki klorofil-a miktarı

t : süre

Denemede aşı olarak 5ml aşı kültürü (70×10^4 hücre/ml) kullanılmıştır. Denemeler, modifiye edilmiş F/2 (Guillard,1973) kültür ortamında, % 032 tuzluluk, 18 ± 2 °C sabit sıcaklık, $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ sürekli ışık şiddetinde gerçekleştirilmiştir. Deneme süresince her gün örnek alınmış ve denemeler 10 gün sürmüştür.



Şekil 2. Chelex kolon sistemi.

1. Deniz suyu, 2. Hacim ayarlayıcı, 3. Polietilen hortum, 4. Chelex kolonu, 5. Eser metallere arındırılmış deniz suyu

3. Bulgular ve Tartışma

İki farklı demir yoğunluğunda (10nM, 100nM), yapay ligand EDTA varlığında ($100 \mu\text{M}$) ve yokluğunda 16 gün süren çalışma ile, *E. huxleyi* kültürlerinde hücre yoğunluğu (hücre/ml), klorofil-a miktarı ($\mu\text{g/L}$), hücresel klorofil-a miktarı (pg/hücre), büyüme hızı (μ =bölünme/gün), hücresel Fe miktarı (amol Fe/hücre) ve ortamın pH değişimi belirlenmiştir (Tablo 1).

3.1. Hücre sayısı ve Klorofil-a Miktarı

E.huxleyi' nin 10nM Fe ve 100nM EDTA içeren kültür ortamlarına ait hücre yoğunlukları ve klorofil-a içerikleri değerlendirildiğinde, denemenin yedinci günü en yüksek hücre yoğunluğu 4×10^4 hücre/ml ve klorofil-a $11 \mu\text{g/L}$ miktarına ulaşmıştır. Denemenin birinci gününden itibaren hücre yoğunluğu artmaya başlamış dolayısıyla bir gecikme evresi gözlenmemiştir. Hücre sayısında 9 gün süren bir duraklama gözlenmiştir. Denemenin 7. gününde hücresel klorofil-a miktarı 0.27pg/hücre olarak hesaplanmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. EDTA eklenen ve eklenmeyen 10 nM ve 100 nM Fe içeren *E. huxleyii* kültürlerinde hücre sayısı (hücre x 10⁴ ml⁻¹), klorofil-a (µg/L) ve büyüme hızı (µ=bölünme/gün) değerleri.

Fe-EDTA	Hücre sayısı (hücre x 10 ⁴ ml ⁻¹)	Klorofil a (µg/L)	Büyüme hızı (µ=bölünme/gün)	Hücresel Fe (amol/hücre)
10 nM Fe+EDTA	4 (7. Gün)	11	0.33	0.111
10 nM Fe	5 (13. Gün)	17	0.29	0.353
100 nM Fe+EDTA	14 (14. Gün)	28	0.27	0.754
100 nM Fe	13 (13. Gün)	26	0.31	0.641

EDTA içermeyen ve 10nM Fe içeren kültür ortamında hücre sayısı denemenin 13. günü en yüksek hücre yoğunluğu 5 x 10⁴ hücre/ml ve klorofil-a miktarı 17 µg/L'ye ulaşmıştır (Tablo 1). Denemenin son 3 günü hücre sayısında duraklama gözlenmiştir. Hücresel klorofil-a miktarı 0.34 pg/hücre olarak hesaplanmıştır. *E. huxleyii*'nin 10nM Fe dozunda EDTA içeren ve içermeyen ortamlara ait hücre yoğunlukları karşılaştırıldığında aralarındaki fark önemsiz bulunmuştur (p>0.05). Aynı hücre yoğunluklarına ait en yüksek klorofil-a değerleri karşılaştırıldığında ise aralarındaki farkın önemli olduğu belirlenmiştir (p<0.05).

100nM Fe ve 100µM EDTA içeren kültür ortamında denemenin başlangıcından itibaren hücre yoğunluğu artmaya başlamıştır. Hücre bölünmesi on dördüncü güne kadar devam etmiş ve en yüksek hücre sayısı 15.gün 14 x 10⁴ hücre/ml ve klorofil-a miktarı ise 28 µg/L olarak belirlenmiştir (Tablo 1).

100nM Fe ve EDTA içeren kültür ortamına ait hücresel klorofil-a miktarı 15.gün için 0.25pg/hücre olarak hesaplanmıştır. 100nM Fe içeren, EDTA içermeyen deneme grubunda, denemenin 13. günü 13 x 10⁴ hücre/ml hücre yoğunluğu ve 26 µg/L klorofil-a miktarına ulaşmıştır (Tablo 1). On üçüncü günden itibaren hücre sayısı ve klorofil-a miktarında azalma gözlenmiştir. Hücresel klorofil-a miktarı 13.gün 0.2pg/hücre olarak hesaplanmıştır.

E. huxleyii'nin 100nM Fe dozunda EDTA'lı ve EDTA'sız ortamlara ait en yüksek hücre yoğunlukları ve klorofil-a miktarları karşılaştırıldığında aralarındaki farkın önemli olmadığı belirlenmiştir (p>0.05).

Denemede kontrol grubu olarak hazırlanan demir içermeyen besi ortamında (Fe içermeyen F/2 ortamı)

E. huxleyii'nin hücre yoğunluğu ve klorofil-a miktarı üçüncü gün azalmaya başlamış ve beşinci gün hücrelerin büyük bir çoğunluğunun öldüğü gözlenmiştir.

Denemede kontrol olarak demir içermeyen besi ortamında *E. huxleyii* 'de gelişim gözlenmemiştir. *E. huxleyii*'nin evrim süreci boyunca içinde bulunduğu besin rejimleri ve diğer optimum çevre koşulları çok iyi bilinmemektedir. Fe gereksiniminin düşük olması Fe girdileri ile buzul dönemi boyunca yaygın olmasında rol oynamış olabilir (Archer ve ark., 2000). Braarud (1962), *E. huxleyii*'nin ekolojik adaptasyonunun çok yüksek olduğuna dikkat çekmiş ve geniş yayılma alanlarına sahip olmasının bunun en iyi göstergesi olduğunu bildirmiştir.

Martin ve Fitzwater (1988), ligand ilave edilmiş su örneklerine 0, 1, 5, 10 nmol/kg Fe ilaveleri yaparak klorofil-a miktarlarını belirlemeye çalışmışlar denemenin başlangıcından itibaren üç gün boyunca klorofil miktarlarında değişikliğin olmadığını ve 4. günden itibaren artışın başladığını ve artışların Fe ilavelerinin yapılmasından sonra başladığını belirlemişlerdir. Eklenen 0, 1, 5 nmol/kg Fe miktarları için sırasıyla 1.07, 5.21 ve 7.91 µg/kg klorofil değerlerini belirlerken en yüksek klorofil-a değerleri 10.16µg/kg ile 10nmol/kg Fe ilavesi ile elde ettiklerini belirtmişlerdir. Mevcut çalışma bulguları değerlendirildiğinde Fe miktarının yüksek olduğu ve ligand ilaveli türlerde hücre yoğunluğuna paralel olarak klorofil-a miktarında artış gösterdiği belirlenmiştir.

3.2. Büyüme Hızı (μ =bölünme/gün)

Denemede EDTA varlığında ve yokluğunda 10nM ve 100nM Fe dozlarının uygulanmış olduğu gruplara ait hücre sayıları (hücre/ml $\times 10^4$) sonuçları kullanılarak her bir gruba ait spesifik büyüme hızları hesaplanmıştır (Guillard, 1973).

100 μ M EDTA ve 10nM Fe içeren grupta büyüme hızı 0.33 bölünme/gün, EDTA içermeyen 10nM Fe içeren kültür ortamına ait büyüme hızı ise 0.29 bölünme/gün olarak hesaplanmıştır (Tablo 1). 10nM Fe içeren EDTA'lı ve EDTA'sız kültür ortamlarına ait büyüme hızları karşılaştırıldığında farkın önemli olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$).

100nM Fe ve 100 μ M EDTA içeren kültür ortamına ait büyüme hızının 0.27 bölünme/gün, EDTA içermeyen 100nM Fe içeren kültür ortamına ait büyüme hızının ise 0.31 bölünme/gün olduğu hesaplanmıştır. İki gruba ait büyüme hızları karşılaştırıldığında aralarındaki farkın önemli olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$).

Brand ve ark. (1983), *E.huxleyi* ile yapılan çalışmada, neritik türlerin büyüme hızlarının azaldığı Fe düzeyi $<10^{-7}$ M olduğu halde, oseanik türlerin en düşük demir ilaveli konsantrasyonda dahi en yüksek düzeyde büyüme hızına ulaştığını saptamışlardır. Bu bulgularının denizel fitoplankton populasyonları için önemli olduğunu ifade etmişlerdir. Mevcut çalışmada, düşük Fe dozlarında elde edilen büyüme hızı verilerinin uyumlu olduğu görülmektedir. Çalışmamızın sonuçları değerlendirildiğinde,

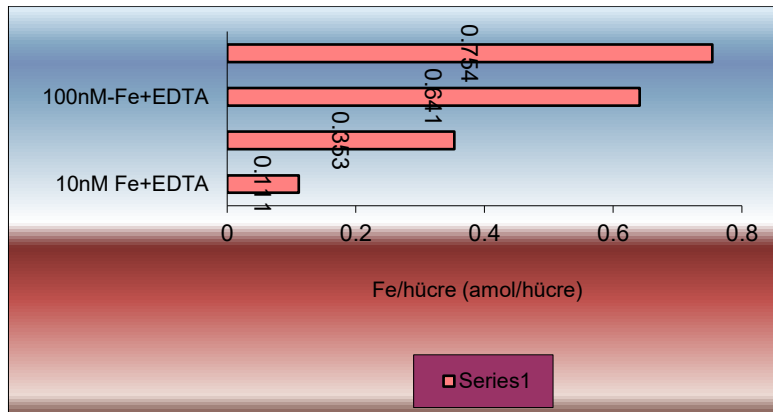
büyüme hızını EDTA varlığının etkilediği belirlenmiştir.

3.3. Hücre Yoğunluğu ve pH Değişimi

Deneme boyunca bütün gruplarda hücre yoğunluğunun artmasına paralel olarak ortamın pH'ı da artış göstermiştir. Biyolojik olarak önemli bir element olan demir (Fe) kimyası pH'a en duyarlı elementlerden biridir. pH ile paralel olarak değişir. Hücre yoğunluğunun artmasına paralel olarak pH değerinin de artış gösterdiği ilgili çalışmalar ile belirlenmiştir. Bitki yaşamı ile salınan karbonatın bikarbonata dönüşmesi ile yoğun fitoplankton patlamaları sırasında hızlı fotosentez döneminde ortamda pH'ın aniden 9 ve yukarısına çıktığı saptanmıştır. Fitoplankton gelişimi, 6.5 veya üzerindeki pH değerinde artan besin kullanılabilirliği, çözülen fosfat konsantrasyonu ile artmaktadır. Fitoplankton yoğunluğunun artmasıyla ortamda CO₂ azalmakta ve ortam bazik duruma geçmektedir. Yapılan çalışmalar pH değerinin fitoplankton patlamaları sırasında arttığını saptamıştır (Boyd, 1979).

3.4. Hücre Sayısı ve Fe/hücre (amol/cell) oranı

Deneme gruplarına ait hücre Fe/hücre oranları (amol Fe/hücre) Şekil 3'te verilmiştir. En yüksek hücre Fe/hücre oranının 100nM Fe içeren gruba ait olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$).



Şekil 3. Deneme gruplarına ait Fe/hücre oranları.

Okyanuslardaki Fe (III) kütlesinin organik bileşikler tarafından şelatlandığı bilinir ve şelatlanmayan fraksiyon hidrolize olarak bulunur. Fe'in spesifikasyonu ve çözünürlüğü, ortamdaki organizmalar için kullanılabilirliği ortamın pH'ı ve ligand mekanizması ile ilgilidir. İlgili çalışmalar ile karşılaştırıldığında, Fe/hücre oranlarının Fe miktarı artışı ile arttığı belirlenmiştir.

4. Sonuç

Denemelerde 10nM (EDTA'lı ve EDTA'sız) ile 100nM (EDTA'lı ve EDTA'sız) Fe içeren ortamlarda Fe'in *E.huxleyi*'nin ulaştığı biomass miktarına olan etkisi belirgin bulunmuştur. Deniz sularında ortalama Fe yoğunluğunun 1nM civarında olduğu bilinmektedir. Çalışmada kullanılan Fe dozları, biyoması sınırlayıcı etkisini gözlemek için oldukça yüksek olmakla birlikte 10 ve 100nM Fe dozlarında hücre yoğunlukları arasındaki fark belirgin olmuştur. Bu da *E. huxley* biomassının belirgin bir biçimde ortamdaki Fe konsantrasyonu ile kontrol edildiğini göstermektedir.

Kaynaklar

- Archer, D., Winguth, A., Lea, D., Mahowald, N. (2000). What caused the glacial/interglacial atmospheric pCO₂ cycles? *Reviews of Geophysics*, 38: 159-189.
- Brand, L.E., Sunda, W.G., Guillard, R.R.L. (1983). Limitation of marine phytoplankton reproductive rates by zinc, manganese, and iron. *Limnology and Oceanography*, 28: 1182-1198.
- Brand, L.E., Sunda, W.G., Guillard, R.R.L. (1986). Reduction of marine Phytoplankton Reproduction rates by Copper and Cadmium. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 96: 225-250.
- Braarud, T. (1962). Species distribution in marine phytoplankton. *Journal of the Oceanographical Society of Japan 20th Anniversary. Volume: 628-649.*
- Fernandez, E., Maranon, E., Harbour, D.S., Kristiansen, S., Heimdal, B.R. (1996). Patterns of carbon and nitrogen uptake during blooms of *Emiliania huxleyi* in two Norwegian fjords. *Journal of Plankton Research*, 18: 2349-2366.
- Geringa, L.J.A., de Baar, H.J.W., Timmermans. (2000). A comparison of iron limitation of phytoplankton in natural oceanic waters and laboratory media conditioned with EDTA. *Marine Chemistry*. 68: 335-346.
- 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.
- Hutchins, D.A., Rueter, J.G., Fish, W. (1991). Bioavailability and Bioaccumulation of Iron in the Sea (W. G. SUNDA editör). *The Biogeochemistry of Iron in Seawater*, John Wiley & Sons Ltd, Baffins Lane, Chichester, West Sussex PO19 1 UD, England, 41-85.
- 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., Gordan, R.M., Fitzwater, S.E., Broenkow, W.W. (1989). *Deep-Sea Research. Part A. Oceanographic Research*, Page:36
- Öztürk, M., Steinnes, E., 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
- Öztürk, M., Vadstein, O., Sakshaug, E. (2003a). The effects of enhanced phytoplankton production on iron speciation and removal in mesocosm experiments in a land-locked basin of Hopavagen, Norway. *Marine Chemistry*, 84(1-2): 3-17.
- Öztürk, M., Bizsel, N., Steinnes, E. (2003b). Iron speciation in eutrophic and oligotrophic Mediterranean coastal waters. Impact of phytoplankton and protozoan blooms on iron distribution. *Marine Chemistry* 81: 19-36.

- Paasche, E. (2002). A Review of The Coccolithophorid *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae) with Particular Reference to Growth, Coccolith formation, and Calsification – Photosynthesis Interactions. *Phyqologia*, 40(6): 503-529.
- Saydam, A.C., Polat, I. (1999). The impact of Saharan dust on the occurrence of algae bloom. Proceeding of EUROTRAC Symposium 98. Pp.656-663 Eds: Borrell, P. M and Borrell, P. WITpress. Southampton.
- Schoemann, V., de Baar H.J.W., de Jong, J.T.M. and Lancelot, C. (1998). Effects of phytoplankton blooms on the cycling of manganese and iron in coastal waters. *Limnology and Oceanography*, 43: 1427–1441.
- Shkolnik, M.Y. (1984). Trace Elements in Plants. Developments in Crop Science V. 6. Elsevier. New York.
- Sunda, W.G. and Huntsman, S.A. (1995). Iron uptake and growth limitation in oceanic and coastal phytoplankton. *Marine Chemistry*, 50: 189-206.
- Sunda, W.G. (1989). Trace Metals Interactions with Marine Phytoplankton. *Journal of Marine Biology and Oceanography*, 6: 411-442.
- Van den Hoek, C., Mann, D.G., Jahs, H.M. (1995). *Algae an Introduction to phycology*. Cambridge University Press.133, 219:614.
- Wells, M.L., Zorkin, N.G., Lewis, A.G. (1983). Bioavailability and Bioaccumulation of Iron in the Sea (W.G. SUNDA editor). *The Biogeochemistry of Iron in Seawater*, John Wiley & Sons Ltd, Baffins Lane, Chichester, West Sussex PO19 1 UD, England, 41-85.