

EDTA (Etilendiamintetraasetat)'nın 10nM Fe(III) Konsantrasyonunda *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyta)'nın Büyümesine Etkileri

*Selin Sayın¹, Oya Işık², Leyla Hızarcı²

¹Mustafa Kemal Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Antakya, Hatay, Türkiye

²Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Adana, Türkiye

*E mail: helenselin@yahoo.com

Abstract: The effects of EDTA (Ethylenediaminetetraacetate) on the growth of *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyta) in 10nM Fe(III) concentration. Being active in a number of biological events, iron (Fe) is essential trace metal, which is vital for a great many organisms. In an effort to find out a biological approach to the functions of Fe, which are not yet fully understood, and its available marine forms as well as to help determine the factors affecting Fe uptake, the effects of artificial ligand EDTA (Ethylenediaminetetraacetate) (100µM) on the growth of *Thalassiosira weissflogii* were studied in modified F/2 medium consisting of 10nM iron. An ambient temperature of 18± 2 °C and lighting intensity of 80µmol m⁻² s⁻¹ were provided during the experiment. Sea water used macro nutrients and EDTA were let through Chelex-100 resin while all other items were freed from any trace metals in acid bath. According to the results, it was found that in *T. weissflogii* culture, EDTA didn't have any effect on cell number, the number of chl-a, growth rate and the pH values which increased proportional to the growth (p>0.05). It was also appeared to be a difference among cell Fe quota (p<0.05).

Key Words: Iron, *Thalassiosira weissflogii*, EDTA, growth.

Özet: Demir (Fe) biyolojik olaylarda görev yapan önemli bir eser metaldir ve pek çok organizma için hayattır. Fe'in biyolojik olaylarda hala tam olarak bilinmeyen işlevleri, sudaki kullanılabilir formları ve alımını etkileyen faktörlerin belirlenmesi konularına katkıda bulunmak amacıyla yürütülen çalışmada, 10 nM demir (Fe) içeren modifiye F/2 ortamında, suni ligand EDTA (Ethylenediaminetetraacetate) (100µM) nin, *Thalassiosira weissflogii* nin büyümesine etkileri araştırılmıştır. Denemenin yürütüldüğü ortamda, 18 ± 2 °C sıcaklık ve 80µmol m⁻² s⁻¹ aydınlanma şiddeti sürekli olacak şekilde sağlanmıştır. Denemede kullanılan deniz suyu, makro besleyiciler ve EDTA, Chelex-100 reçinesinden geçirilmiş, kullanılan bütün malzemeler ise asit ile yıkanarak eser metallerinden arındırılmıştır. Denemenin sonunda, EDTA nin, *T. weissflogii* kültürlerinde, hücre yoğunluğu, klorofil-a miktarı, büyüme hızı ve büyümeye paralel olarak artan pH değerlerini etkilemediği (p>0.05) saptanırken hücre Fe miktarları arasında farklılık olduğu (p<0.05) belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Demir, *Thalassiosira weissflogii*, EDTA, büyüme.

Giriş

Biyolojik olaylar deniz suyunun içerdiği eser metallere doğrudan ilişkilidirler. Eser metaller hücrelerde elektron aktarma sistemlerinin ve pek çok enzimin yapısında yer alan gerekliliği tartışılmaz unsurlardır. Yoğunlukları, formları veya bileşik oluşturmaları gibi özellikleri ile içinde buldukları ortamda biyolojik olayların gelişimini olumlu ya da olumsuz yönde değiştirebilmektedirler (Shkolnik, 1984). Bu elementler arasında Fe, biyolojik olayları kontrol eden en önemli elementlerden biridir. Demir yeryüzünde en bol bulunan dördüncü element olmasına rağmen denizlerdeki miktarı, karasal sistemlere göre (yeraltı suları, göller, nehirler vs.) onlarca kat daha azdır. Denizel ortamlarda Fe, farklı kimyasal ve fiziksel yapıya sahiptir, bütün bu Fe yapıları toplam demir olarak adlandırılır. Fitoplanktonik organizmaların gelişimi için toplam Fe miktarından çok, alınabilir formda olması önemlidir. Yeryüzünde bol miktarda bulunmasına rağmen Fe⁺³ formunun çözünürlüğünün çok düşük olması nedeniyle okyanuslarda çözünmüş demir, 1nM'in altında çok düşük konsantrasyonlarda bulunur. (Martin ve ark.,1989). Demirin

biyolojik alınımı, karmaşık ve dinamik olan kimyasal yapısından çok etkilenmektedir. Diatomlar gibi patlama yapan türler için de Fe sınırlayıcıdır. *Thalassiosira weissflogii* ile yapılan çalışmalar bunu göstermiştir (Anderson ve Morel, 1982). Yapılan çalışmalar genellikle okyanuslardaki *Thalassiosira* türüne göre kıyasal türlerin hücre Fe miktarının ve Fe gereksiniminin daha yüksek olduğunu belirlemiştir (Sunda ve Huntsman, 1995).

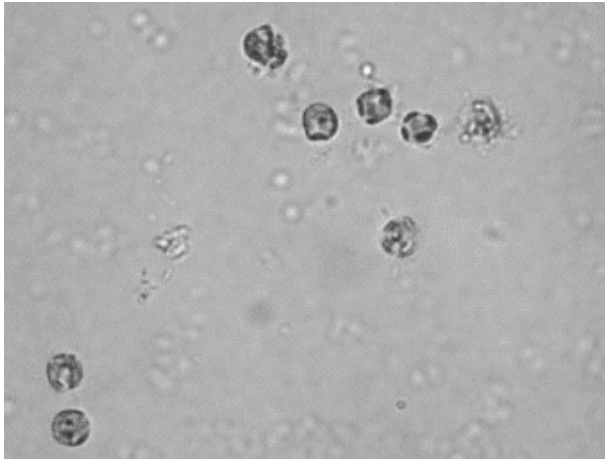
Laboratuvar çalışmaları en yüksek hücre yoğunluğunu elde etmek, doğal suları taklit etmek, metal iyonlarının konsantrasyonlarını ve yapılarını kontrol etmek, ortamda yüksek konsantrasyonda bulunduğu toksik etki gösterebilecek metallere toksisitesini engellemek veya yok etmek, metallere ve özellikle Fe'in 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 (Ethylenediaminetetraacetate)'nin, *T. weissflogii* (Bacillariophyta)'nin hücre yoğunluğu (hücre/ml), klorofil-a miktarı (µg/L), büyüme hızı (µ=bölünme/gün), hücre Fe miktarı (pg/hücre), hücre Fe miktarı

(amol/hücre) ve ortamın pH değişimi üzerine etkilerini belirlemek amacıyla planlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Denemede Bacillariophyta bölümünün bir üyesi olan kıyusal diatom *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) kullanılmıştır (van den Hoek ve ark., 1995). Kozmopolit bir tür olan *T. weissflogii*, 5-20µm büyüklüğünde ve dikdörtgen şeklinde hücrelere sahip sentrik bir diyatomdur (Şekil 1).

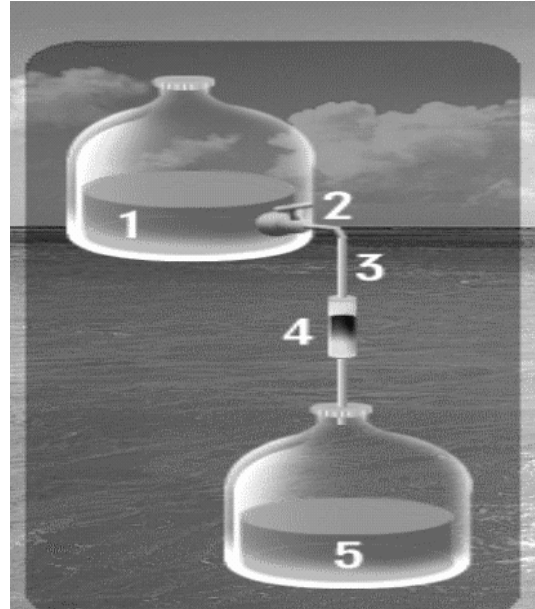


Şekil 1. *Thalassiosira weissflogii* (Grunow)

Denemede kullanılan deniz suyunu partiküllerinden arındırmak için 0.45µm, deniz suyu ve kullanılan kültür ortamlarının bakterilerden arındırılması için de 0.2µm göz açıklığında filtreler kullanılmıştır. Partiküllerinden arındırılmış olan deniz suyunun içerdiği eser metalleri çözünür hale getirmek için pH ayarları yapıldıktan sonra deniz suyu eser metallerinden arındırılmak üzere, sistemin en etkin çalıştığı 5ml/dk.'lık akış hızı ile Chelex-100 (Imminodiacetate) reçinesinden geçirilmiştir (Şekil 2), (Öztürk, 2002-2003-2004; Kişisel iletişim). Deneme boyunca kullanılan bütün deneme kapları, filtreler, HCl (Merck) yardımıyla eser metallerinden arındırılmış daha sonra eser metallerden arındırılmış olan distile su ile durulanmıştır.

Chelex kolonundan geçirilmiş olan deniz sularına F/2 besi stoklarından ilave edilmeden önce, Si ilavesi için 3'e düşürülen ortam pH'ları (WTW-330 marka pH metre) isothermal yöntem ile eser metalden arınmış-NH₄ kullanılarak yeniden 8±0.1'e ayarlanmıştır (Öztürk, 2002-2003-2004; Kişisel iletişim). Bu işlemde sonra F/2 ortamının hazırlanması işleminde deniz suyuna sırasıyla; eser metal, EDTA, vitamin solüsyonları ve son olarak da Fe(III) (10nM) solüsyonu ilavesi yapılmıştır. Bu ilavelerin ardından kültür ortamlarının pH'ı yeniden 8±0.1'e ayarlanmıştır. Muamele grupları 10nM Fe (III) + EDTA (100µM), 10nM Fe (III) ve Fe içermeyen ortamlardan 3 tekrarlı olarak oluşturulmuştur. Denemede aşı olarak 500nM Fe içeren kültürlerden yararlanılmıştır. Aşı miktarı 5ml hacminde (70x10⁴ hücre/ml) kullanılmış ve buradan 1.5 Litre hacmindeki kültür ortamına 1.6nM Fe girişi olduğu

hesaplanmıştır. Denemede kullanılan deniz suyunun tuzluluğu %032' ye ayarlanmıştır. Deneme süresi 10 gün olarak belirlenmiş ve deneme boyunca her gün örnek alınmıştır. Deneme 18±2 °C sabit sıcaklık, 80µmol m⁻² s⁻¹ sürekli ışık şiddetinde ve modifiye edilmiş F/2 (Guillard,1973) kültür ortamı kullanılarak yürütülmüştür.



Şekil 2. Eser metalden arındırma kolon sistemi. 1. Makro Besleyici ilaveli Deniz suyu, 2. Hacim ayarlayıcı, 3. PE hortum, 4. Chelex kolonu, 5. Eser metallerden arındırılmış deniz suyu

Bulgular ve Tartışma

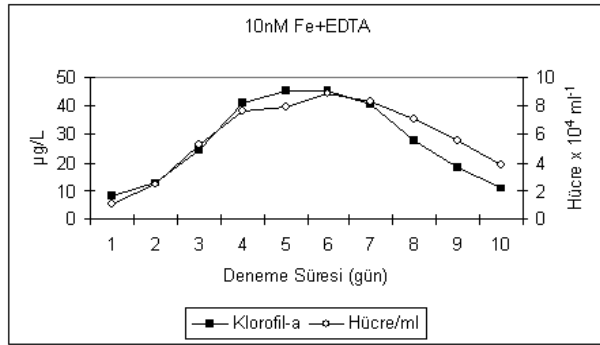
10nM demir yoğunluğunda yapay ligand EDTA varlığında (100µM) ve yokluğunda *T. weissflogii* kültürlerinde hücre yoğunluğu (hücre/ml), klorofil-a miktarı (µg/L), hücresel klorofil-a miktarı (pg/hücre), büyüme hızı (µ=bölünme/gün), hücresel Fe miktarı (amol Fe/hücre) ve ortamın pH değişimine olan etkilerini belirlemek amacıyla kurulan deneme 10 gün devam etmiştir.

Tablo 1.'de *T. weissflogii*'nin muamele grupları için belirlenmiş parametrelere ait veriler verilmiştir. Tabloda verilen hücre yoğunluğu, klorofil-a miktarı, hücresel Fe miktarları ve pH değerleri deneme süresince elde edilen en yüksek değerlerdir. Fe içermeyen ortamda kültüre alınan *T. weissflogii* kontrol grubunda hücre sayısında ve klorofil-a miktarında bir artış olmaması sebebiyle hücresel pigment, hücresel Fe ve büyüme hızı gibi parametrelerin hesaplaması yapılamamıştır.

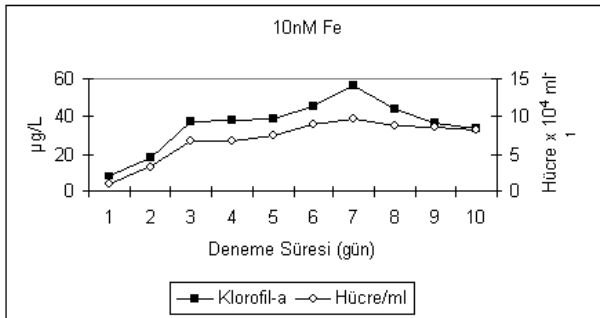
Hücre Yoğunluğu (hücre/ml)

10nM Fe ve 100µM EDTA içeren besi ortamında *T. weissflogii* hücre yoğunluğunda denemenin başlangıcından itibaren artış gözlenmiştir. Denemenin 6. gününde en yüksek hücre yoğunluğu 9 x 10⁴ hücre/ml ve klorofil-a miktarı 43 µg/L olarak belirlenmiştir. Hücresel klorofil-a miktarının 6. günde 0,5 pg/hücre olduğu hesaplanmıştır (Şekil 3).

10nM Fe içeren, EDTA sız besi ortamında hücre yoğunluğu en yüksek 9×10^4 hücre/ml ve klorofil-a miktarı 46 $\mu\text{g/L}$ olarak denemenin 7. gününde belirlenmiştir Hücresel klorofil-a miktarının 7. günde 0,5 pg/hücre olduğu hesaplanmıştır. *T. weissflogii*'nin 10 nM Fe dozunda EDTA içeren ve içermeyen ortamlara ait hücre yoğunlukları ve klorofil-a miktarları karşılaştırıldığında aralarındaki farkın önemsiz olduğu belirlenmiştir ($p > 0.05$). Logaritmik evrede maksimum hücre yoğunluğuna ulaşılan süre ve hücre yoğunlukları, ligand varlığı ve yokluğunda benzer bulunmuştur. Suni ligand EDTA'nın 10nM Fe dozunda hücre yoğunluğu üzerinde etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 3. 10nM Fe ve 100 μM EDTA içeren kültür ortamında *T. weissflogii*'ye ait hücre yoğunlukları ve klorofil-a miktarları.



Şekil 4. 10nM Fe içeren EDTA içermeyen kültür ortamında *T. weissflogii*'ye ait hücre yoğunlukları ve klorofil-a miktarları.

Çalışmamızda $\sim 1.5\text{nM}$ Fe içeren kontrol grubunda gelişimin olmaması, EDTA'lı ve EDTA'sız 10nM Fe dozunda gelişimin artması ve hücre yoğunluklarının benzer olması, EDTA içermeyen ortamlarda hücrelerin ligand salgıladıklarını düşündürmektedir. Diğer yandan Fe konsantrasyonunun artması ile beraber her iki fitoplankterde de gelişimin artması Fe'in sınırlayıcı rolünü doğrulamıştır. Bu hipotezin doğruluğu Fe zenginleştirilmesi yapılan okyanus çalışmalarında saptanmış olan fitoplankton üretkenliğinin artması ile belirlenmiştir (Martin ve ark.,1994; Coale ve ark., 1996). Geringa ve ark. (2000)'nin yürüttükleri bir çalışmada ise sentetik ligand EDTA'nın Fe alımı ve büyümeyi olumlu yönde etkilediği yönünde bulguları olmuştur. Bu çalışmada her iki gruptan elde edilen benzer hücre yoğunlukları, EDTA'nın Fe alımını artırmadığını göstermiştir.

Tablo 1. *T. weissflogii*'ye ait belirlenmiş olan parametreler.

Parametreler (maksimum değerler)	10nM Fe EDTA'lı 100 μM	10nM Fe EDTA'sız	Kontrol (Fe'siz F/2)
Hücre Yoğunluğu (hücre/ml)	9×10^{4a}	9×10^{4a}	2×10^4
Klorofil-a miktarı ($\mu\text{g/L}$)	43 ^a	46 ^a	8
Klorofil-a/hücre (pg/hücre)	0.5 ^a	0.5 ^a	-
μ (bölünme/gün)	0.63 ^a	0.77 ^a	-
Hücresel Fe miktarı (amol/hücre)	32.30 ^b	52.67 ^d	-
pH	8.77 ^b	8.90 ^b	8 ^c

*Farklı harfler farklı ortalamaları ifade etmektedir.

Klorofil-a Miktarı ($\mu\text{g/L}$)

EDTA içermeyen 10nM Fe içeren kültür ortamında elde edilen en yüksek klorofil-a değerinin 46 $\mu\text{g/L}$, EDTA içeren kültür ortamında ise 43 $\mu\text{g/L}$ olduğu ve aralarındaki farkın önemli olmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$). Sonuçlardan anlaşılacağı gibi EDTA ilavesi 10nM Fe dozunda *T. weissflogii* hücrelerinin klorofil-a oluşturmalarını etkilememiştir (Şekil 3. ve 4.). Denemenin kontrol grubunda ikinci günden itibaren hücre sayısında ve klorofil-a miktarında düşüş olduğu belirlenmiştir. Denemenin üçüncü günü hücre sayısı ve klorofil-a miktarının belirlenmediği saptanmıştır.

Hücresel Klorofil-a Miktarı (pg/hücre)

T. weissflogii'nin hücresel C miktarı olan 144pg C/hücre değerinden hücresel klorofil-a miktarının 8.64 pg/hücre olduğu hesaplanmıştır (Harrison ve Morel, 1986). 10nM Fe ve EDTA içeren gruba ait hücresel klorofil-a miktarı 0.5 pg/hücre, EDTA içermeyen 10nM Fe'de 0.5 pg/hücre olduğu ve aralarındaki farkın önemsiz olduğu belirlenmiştir ($p > 0.05$).

Büyüme Hızı (μ =bölünme/gün)

T. weissflogii'nin EDTA varlığında 10nM Fe dozunda büyüme hızının $\mu=0.63$ bölünme/gün, EDTA yokluğunda ise $\mu=0.77$ bölünme/gün olduğu ve aralarındaki farkın önemli olmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$). McKay ve ark. (1997), *T. weissflogii* ve *P. tricornutum*'un büyüme hızlarına 10, 25, 50 ve 100nM FeCl_3 ve 100 μM EDTA varlığının 215 μmol quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ aydınlanma şiddeti ve 24 $^{\circ}\text{C}$ kültür koşullarında etkisini araştırmışlar, *T. weissflogii*'nin 50-100nM Fe aralığında büyüme hızının $\mu=1.74$ bölünme gün $^{-1}$, 25nM Fe konsantrasyonunda $\mu=1.21$ bölünme gün $^{-1}$ olduğunu, 10nM Fe dozunda ise büyüme hızının belirlenmediğini bildirmişlerdir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar, *T. weissflogii* hücrelerinin büyüme hızlarına EDTA'nın etki etmediğini göstermektedir.

Hücresel Fe Miktarı (amol/hücre)

Hücresel Fe birimleri 10nM Fe+EDTA grubunda 32.30 amol/hücre, 10nM Fe grubunda ise 52.67 amol/hücre olarak hesaplanmıştır. Deneme gruplarına ait hücresel Fe miktarları karşılaştırıldığında aralarındaki farkın önemli olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Sonuçlar *T. weissflogii*'nin hücresel Fe miktarının EDTA varlığıyla sınırlandırılmış olduğu belirlenmiştir. Schmidt ve Hutchins (1999), *T. weissflogii*'nin hücresel Fe miktarının Fe ile sınırlandırılmış ortamda 204 amol/hücre, Fe'e doymuş ortamda ise 432 amol/hücre olduğunu belirlemişlerdir.

Sunda ve Huntsman (1991), *Thalassiosira*'nın ozeanik ve kıyusal türlerinin hücresel Fe miktarlarını karşılaştırmışlar ve neritik olanların hücresel Fe miktarlarının ozeanik olanlara göre çok çok yüksek olduğunu, kıyusal *T. weissflogii* ve *T. pseudonana*'nın hücresel Fe miktarının 60-96 amol/hücre aralığında olduğunu, okyanus türleri olan *T. sp* ve *T. ozeanica*'nın hücresel Fe miktarının ise 24 amol/hücre olduğunu belirlemişlerdir. Harrison ve Morel (1986), *T. weissflogii*'ye Fe sınırlaması koşullarının etkilerini araştırmışlardır. 1-100nM Fe ve 10µM EDTA içeren kültür ortamlarında azalan Fe konsantrasyonu ile hücresel Fe miktarının azaldığını, maksimum büyüme oranının arttığını, *T. weissflogii*'nin hücresel Fe miktarının 80 amol/hücre olduğunu belirlemişlerdir.

Hücre Yoğunluğu ve pH Değişimi

T. weissflogii'nin 100µM EDTA varlığı ve 10nM Fe dozunda 9×10^4 hücre/ml ulaştıklarında pH değeri 8.77 ,EDTA içermeyen 10nM Fe dozunda 9×10^4 hücre/ml olduğunda ise pH 8.90 olduğu ve aralarındaki farkın önemli olmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$). Bitki yaşamı ile salınan karbonatın bikarbonata dönüşmesi ile yoğun fitoplankton patlamaları sırasında hızlı fotosentez döneminde ortamda pH'in aniden 9 ve yukarısına çıktığı belirlenmiştir. Fitoplankton gelişimi 6.5 veya üzerindeki pH'da 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).

Sonuç

Demir (Fe) biyolojik olaylarda görev yapan önemli bir eser metaldir ve pek çok organizma için hayatidir. Fe'in biyolojik olaylarda henüz bilinmeyen fonksiyonlarının belirlenmesinde ekolojik çalışmaların yanı sıra laboratuvar çalışmaları katkı sağlayacaktır. Sonuç olarak bu çalışmada 10nM Fe dozunda EDTA'nın *T. weissflogii*'nin büyümesini etkilemediği fakat Fe alımını etkilediği belirlenmiştir.

Kaynakça

- Boyd, C.E. 1979. Water Quality in Warmwater Fish Ponds. Auburn University Agricultural Experiment Station.
- Coale, K.H., Johnson, K.S., Fitzwater, S.E., Gordon, R.M., Tanner, S., Chavez, F.P., Ferioli, L., Sakamoto, C., Rogers, P., Millero, F., Steinberg, P., Nightingale, P., Cooper, D., Cochlin, W.P., Landry, M. R., Constantinou, J., Rollwagen, G., Traswina, A., Kuela, R., 1996. A massive phytoplankton bloom induced by an ecosystem-scale iron fertilization experiment in the equatorial Pacific Ocean. *Nature*, 383; 495-501.
- 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.
- 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 University 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.
- Martin, J.H., Coale, K.H., Johnson, K.S., Fitzwater, S.E., Gordon, R.M., Tanner, S.J., Hunter, C.N., Eldor, V.A., Nowicki, J.L., Coley, T.L., Barber, R.T., Lindey, S., Watson, A.J., Van Scoy, K., Law, C.S., Liddicoat, M.I., Ling, R., Station, T., Stockel, J., Collins, C., Anderson, A., Bidigare, R., Ondrusek, M., Latasa, M., Millero, F. J., Lee, K., Yao, W., Zhang, J.Z., Friederich, G., Sakamoto, C., Chavez, F., Buck, K., Kolber, Z., Green, R., Fallowski, P., Chisholm, S.W., Hoge, F., Swift, R., Yangel, J., Turner, S., Nightingale, P., Hatton, A., Liss, P., Tindale, N.W., 1994. Testing the iron hypothesis in ecosystems of the equatorial Pacific Ocean. *Nature*, 359:123-129.
- Mckay, R.M.L., Geider, R.J and Lacroche, J.,1997. Physiological and Biochemical Response of the Photosynthetic Apparatus of Two marine Diatoms to Fe stress. *Plant Physiol.*, 114; 615-622.
- Martin, J.L., Gordon, R.M., Fitzwater, S.E., Broenkow, W.W., 1989. Deep-Sea Research. Part A. Oceanographic Research, Page:36
- Öztürk, M. 2002;2003;2004. Doğal Bilimler ve Teknoloji Fakültesi, TBS. Norwec Bilim ve Teknoloji Üniversitesi. Trondheim, NO-7491.
- Shkolnik, M.Y., 1984. Trace elements in plants. *Develop. Crop Sci.* V. 6. Elsevier.
- Sunda, W.G., Huntsman, S.A., 1991. Low iron requirement for growth in oceanic phytoplankton. *Nature*, 351:55-57.
- Sunda, W.G., Huntsman, S.A., 1995. Iron uptake and growth limitation in oceanic and coastal phytoplankton. *Mar. Chem.*, 50: 189-206.
- Schmidt, M.A. and Hutchins, D.A., 1999. Size-fractionated biological Fe and uptake along a coastal to offshore transect in the NE Pacific. *Deep-Sea Res. II*, 46/12, in press.
- Van Den Hoek, C., Mann, D.G., Jahs, H.M., 1995. *Algae an Introduction to phycology*. Cambridge University Press.133, 219:614.