

Işık şiddetinin çeltik tarlalarından izole edilen siyanobakterilerde üremeye ve nitrojenaz aktivitesine etkisi (*)

Influence of light intensity on nitrogenase activity and growth of Cyanobacteria isolated from paddy fields

Gülten Ökmen (Kurucuoğlu)¹, Gönül Dönmez²

¹Muğla Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Muğla ²Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara

İletişim / Correspondence: Gülten Ökmen Adres/Address: Muğla Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Muğla
Tel: 0252 211 16 76 Fax: 0252 223 86 56 E-mail: gokmen@mu.edu.tr

ÖZET

Örnekler, Çorum-Osmancık bölgesindeki çeltik alanlarından toplanmıştır. Azot fikse eden siyanobakterilerin izolasyonunda, azot içermeyen BG-II besiyeri kullanılmıştır. Cins düzeyinde tanımlanan siyanobakterilerin nitrojenaz aktiviteleri üzerine ışık şiddeti etkisinin tanımlanmasında asetilen redüksiyon tekniğinden yararlanılmıştır. Tüm cinslerde 600 lüks ışık şiddeti en yüksek nitrojenaz aktivitesine yol açarken, 900 lüks ışık şiddetinin, söz konusu aktiviteyi 300 lüks ışık şiddetinden daha fazla baskıladığı görülmüştür. Tüm cinslerin üremesi ise, başlangıçta artmış ancak artan ışık şiddetinde biyomas baskılanmıştır.

Anahtar kelimeler: Siyanobakteri, ışık şiddeti, nitrojenaz aktivitesi, üreme

SUMMARY

Samples were collected from paddy fields in Çorum- Osmancık area. Nitrogen- free BG-II medium was used for the isolation of nitrogen fixing cyanobacteria. Acetylene reduction technique was used to determine the effect of light intensity on the nitrogenase activities of the cyanobacteria, which were identified at the genus level. Moreover, in all genera while 600 lux light intensity was resulted in the highest nitrogenase activity, 900 lux light intensity was found to suppress the same activity more than 300 lux. As for the growth of all genera, biomass was stimulated at initial period but increasing light intensity was repressed the biomass.

Key Words: Cyanobacteria, nitrogenase activity, isolation, light intensity

GİRİŞ

Atmosferin % 78'inin elementer azot olduğu bilinmektedir. Azot, kantitatif olarak önemli bir biyoelementtir ve biyosferde moleküllerde bağlı azot, mikroorganizmalar ve bitkiler tarafından taşınmaktadır. Çok sayıda azot içeren bileşik, farklı mikroorganizmalar tarafından azot kaynağı olarak kullanılmaktadır. Bunlar arasında nitrat ve amonyum gibi inorganik iyonlar, üre, aminoasitler ve bazı azot içeren bazlar gibi basit organik bileşikler sayılabilir. Buna ilaveten çoğu bakteri azot fikse etme yeteneğindedir (1, 2, 3).

Doğada azot döngüsü mikroorganizmalar tarafından, nitrifikasyon, denitrifikasyon, amonifikasyon veya azot fiksasyonu şeklinde gerçekleşmektedir

(3, 4, 5). Atmosferdeki serbest azotun, mikroorganizmalar vasıtasıyla amonyağa dönüşmesi "azot fiksasyonu" olarak tanımlanmaktadır. Bu işlem, simbiyotik ve serbest yaşayan mikroorganizmalar vasıtasıyla gerçekleştirilmektedir. *Bacillus subtilis* ve *Corynebacterium glutamicum* azot fiske eden mikroorganizmalara sadece iki örnektir. Azot fikse eden bakteriler temelde serbest ve simbiyotik yaşayanlar olmak üzere iki grupta toplanmaktadır.

Serbest yaşayan bakteriler enerji kaynağına göre kemoorganotroflar (*Azotobacter* sp.), kemolitotroflar (*Alcaligenes* sp.) ve fototroflar (*Anabaena* sp.) olarak gruplandırılır.

Serbest yaşayan fakat anaerop şartlarda azot fikse etme yeteneğine sahip organizmalar da, enerji

(*) Bu çalışma Doktora tezinin bir kısmıdır.

kaynağı olarak organik maddeleri (*Clostridium* sp.), inorganik maddeleri (*Methanococcus* sp.) ve ışığı (*Rhodospirillum* sp.) kullanmaktadırlar (2, 4).

İkinci grupta ise, simbiyotik olarak yaşıyan ve legmenin bulunup bulunmayışına göre farklılık gösteren organizmalar bulunmaktadır. Legmenli bitkiler, atmosferik azotu fikse ederek azotlu bileşiklere dönüştürmekte ve bunu da bitkinin gelişimi için kullanmaktadırlar. Legmenli bitkilerle çoğunlukla birlik oluşturan bakteriler *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* ve *Azorhizobium* türleridir.

Bazı legmensiz angiospermiler (*Alnus* sp.:Akaa-a), kök nodüllerinde bulunan aktinomisetlerin (*Frankia* sp.) faaliyeti sonucu azot fikse etmektedirler (3, 4).

Toprak ve sularda serbest yaşıyan mikroorganizmalar tarafından fikse edilen azotun yılda yaklaşık 45- 100 kg /hektar arasında değiştiği, sadece siyanobakterilerin fikse ettikleri azot miktarının ise yılda 28 kg /hektar olduğu bilinmektedir. Bu da dikkat çekici bir unsurdur.

İklim şartları ülkemize benzeyen Asya ve Güney Avrupa lkelerinde, siyanobakteriler biyogübre olarak kullanılmaktadır. Günümüzde Hindistan'da yaklaşık 2 milyon, Burma'da 40 bin, in'de 20 bin ve Amerika'da yaklaşık bin hektar tarım arazisinde siyanobakteriler biyogübre olarak kullanılmaktadır. Ülkemizde bu durum baklagil ekim alanlarında *Rhizobium* türlerinin kullanımı ile sınırlıdır.

Azot fiksasyonunun ışıık, sıcaklık, nemlilik gibi çevresel faktörlerden etkilendiği bilinmektedir. Bu nedenle çevresel faktörlere dirençli, azot fiksasyonu yeteneği fazla olan suşların izole edilmesi kaliteli gübre eldesinde önemli bir aşamadır. Biyogübre maliyetinin, inorganik gübre maliyetinin dörtte biri kadar olması biyogübre kullanımını cazip hale getirmektedir.

Azot fiksasyonuna çevresel faktörlerin etkisi üzerine çok sayıda araştırma bulunmasına (6-44) rağmen ışıık şiddetinin, nitrojenaz aktivitesi üzerine

etkisine yönelik fazla araştırmaya rastlanmamıştır (41, 45-49). Bu nedenle konu üzerindeki eksikliğe katkıda bulunmak amacıyla bu çalışma planlanmıştır.

Bu alışma, eltik tarımı yapılan bölgelerden izole edilen ve azot tespit eden siyanobakterilerde, ışıık şiddetinin nitrojenaz aktivitesi ve üreme üzerine etkisinin araştırılması amacı ile yapılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmada kullanılan azot fikse eden siyanobakteriler eltik bitkisinin gelişme süresi boyunca orum ilinin Osmancık-Kurupınar Mevkiinden üç yıl süresince alınan sulu toprak örneklerinden izole edilmiştir. Çalışmada ayrıca Prof. Dr. Gönül Dönmez tarafından önceden izole edilen *Nostoc* ve *Nodularia* suşları da kullanılmıştır.

İzolasyon ve identifikasyon. Çeltik alanlarından alınan örneklerdeki siyanobakterilerin izolasyonu amacıyla örneklerden seyreltme yapıldıktan sonra azotsuz BGII besiyerine ekim yapılmış ve besiyerleri 600 lüks beyaz ışıık altında, oda sıcaklığında (20±2°C) 25 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerlerinde üreyen mavi-yeşil renkteki kolonilerden saf kültür alınmıştır (50).

Farklı morfolojik yapı ve renkteki kolonilerden, azotsuz BGII besiyerlerine saf kültür alınmıştır. Filamentli yapıdaki siyanobakteri kültürlerinden diğer bakterilerin uzaklaştırılması amacıyla steril lamalar ile yüzeyi paralel çizgiler halinde izilmış azotsuz BGII besiyeri Petri kutularında kullanılmıştır. Siyanobakteri saf kültürlerinden besiyerinin bir ucuna ekim yapılmış ve karşı taraftan ışıık alacak şekilde 600 lüks beyaz ışıık altında 25 gün süresince inkübasyona bırakılmıştır. Işığa doğru hareket eden filamentler, mikroskop altında incelenerek bakteri kontaminasyonu olmayan filament parçaları steril şartlar altında eğri BGII besiyerlerine aktarılmıştır (51, 52).

Bu şekilde saflaştırılan kültürler mikroskop altında incelenmiş ve heterosist, akinet, hormogonyum bulunup bulunmayışını gibi morfolojik özellikleri belirlenerek identifikasyonları yapılmıştır (53).

Kuru ağırlığın belirlenmesi: Azot içermeyen BG11 sıvı besiyerlerinde üreyen kültürlerin kuru ağırlıkları 70°C' de 12 saat kurutulduktan sonra tartımları yapılarak belirlenmiştir (54, 55).

Işık şiddetinin nitrojenaz aktivitesine etkisi: Farklı ışık şiddetinin nitrojenaz aktivitesine etkisini belirlemek amacıyla, 25 mililitrelik serum şişelerindeki azot içermeyen 10ml BG11 besiyerlerine 100µl aktif kültürlerden inoküle edilmiştir. Denemeler 300, 600 ve 900 lüks beyaz ışık altında, oda sıcaklığında (20±2°C) ve 35 gün süreyle devam etmiştir. Üreme periyodu sonunda kültürlerin nitrojenaz aktivitelerini belirlemek amacıyla asetilen redüksiyon tekniği uygulanmış ve etilen miktarları hesaplanmıştır (56). Denemeler üç paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

İstatistik: İstatistik incelemelerde SPSS kullanılmıştır.

BULGULAR

Çalışmalarımız sonucunda, tüm cinslerde ışık şiddetinden nitrojenaz aktiviteleri, başlangıçta stimüle olmuş ancak ışık şiddeti arttıkça inhibisyon gözlenmiştir. Yüksek ışık şiddetinde (900 lüks) nitrojenaz aktivitesinin, düşük ışık şiddetine (300 lüks) nazaran daha fazla baskılandığı saptanmıştır. Çizelge 1'de de görüldüğü üzere tüm cinslerin nitrojenaz aktiviteleri 600 lüks ışık şiddetinde artış göstermiştir. En yüksek nitrojenaz aktivitesi 600 lükste 7,8µl etilen/mg.h etilen miktarı ile *Nostoc* suşunda, en düşük ise 900 lükste 0,22µl etilen/mg.h etilen miktarı ile *Anabaena* suşuna ait olduğu belirlenmiştir. Üremeleri dikkate alındığında ise tüm suşlarda biyomasın başlangıçta arttı-

ğı ancak ışık şiddetinin artmasına bağlı olarak biyomasın baskılandığı saptanmıştır.

TARTIŞMA

Denemelerimiz sonucunda (300- 600-900 lüks) *Anabaena* ve *Nodularia*'da düşük ve yüksek ışık şiddetlerinde nitrojenaz aktivitesinin baskılandığı, en yüksek aktivitenin gelişime paralel olarak 600 lüks ışık altında gerçekleştiği saptanmıştır. *Nostoc* suşunun ise düşük ışıktaki da 600 lükse yakın nitrojenaz aktivitesi gösterdiği ancak 900 lüks ışıktaki aktivitenin keskin bir şekilde baskılandığı belirlenmiştir (Tablo 1.). Valiente and Leganes (41) ışık şiddetinin, henüz yeterince nitrojenaz aktivitesi üzerindeki düzenleyici etkisinin bilinmediğini, bu nedenle olası bir açıklamanın yüksek ışık şiddetinde fotosentezin artması sonucu ortamda biriken oksijenin inhibisyona neden olabileceği ileri sürülmüştür. Düşük ışık şiddetlerinde ise Fay (45) rezerve karbon kaynaklarının kullanılarak nitrojenaz aktivitesinin desteklendiğini, bu nedenle normal şartlardan daha düşük seviyede aktivite gerçekleştiğini ve bu özelliğin ekolojik açıdan avantajlı olabileceğini bildirmiştir.

Valiente and Leganes (41) *Nostoc* sp. nin 10 µE/m².s'de nötral pH değerinde nitrojenaz aktivitesinin arttığını tespit etmiştir. Çalışmalarımız sonucunda da, benzer olarak *Nostoc* suşunda 600 lüks ışık altında nitrojenaz aktivitesinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Işık şiddeti arttıkça tüm denemelerde nitrojenaz aktivitesi düşmüştür. Karanlık uygulaması ile nitrojenaz aktivitesinden yoksun olgun heterosistleri içeren siyanobakteriyel filamentlerin orijinal morfolojilerini koruduğu ve tekrar aydınlatmayı takiben orijinal nitrojenaz aktivitesinin hızla iyileştiği bilinmektedir (46). Tsygankov ve ark (47) *Anabaena variabilis*' in 40- 60 W/m²'de maksimum nitrojenaz aktivitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmalarımız sonucunda ise *Anabaena* suşunda en yüksek nitrojenaz aktivitesi 600 lüks ışık altında (0,34 µE/mg.h) gerçekleşmiştir. Yapılan çalışmaların birçoğunun farklı çevresel faktörlerle birlikte yapılması ve bunların sinerjistik etkisinin olması, bu çalışmada ise ışık

Tablo 1. Farklı ışık şiddetinin siyanobakterilerde üreme ve nitrojenaz aktivitesine etkisi

Işık Şiddeti (lüks)	Anabaena sp.		Nostoc sp.		Nodularia sp.	
	Kuru ağı. (mg/l)	Etilen Miktarı (µl/mg.h)	Kuru ağı. (mg/l)	Etilen Miktarı (µl/mg.h)	Kuru ağı. (mg/l)	Etilen Miktarı (µl/mg.h)
300	256 ± 11.5	0,26 ± 0,006	50 ± 2,5	7,3 ± 0,57	160 ± 0	0,32 ± 0,035
600	520 ± 52	0,34 ± 0,06	50 ± 1,5	7,8 ± 0,85	203 ± 5,7	1 ± 0,15
900	313 ± 50	0,22 ± 0,03	18 ± 2,5	0,25 ± 0,05	65 ± 7,0	0,4 ± 0

**Işık şiddetinin üreme üzerinde etkili (p<0,01) olduğu belirlenmiştir.

şiddetinin tek olarak ele alınması söz konusu çalışmalarla karşılaştırma yapılmasına izin vermemektedir.

Günümüze kadar yapılan çalışmalardan da anlaşıldığı üzere siyanobakteriler farklı çevresel koşullara tolerans gösteren organizmalardır. Mikroalglerin de ürün verimini arttırdığı ve ayrıca toprak stabilizasyonunu sağladığı bilinmektedir. Uzun süreli inorganik gübre kullanımının hem ürün hem de toprak verimini olumsuz yönde etkilemesi ve pahalı bir yöntem olması tercih edilebilirliğini azaltmaktadır. Bu nedenle ekonomik olarak daha ucuz ve güvenli yöntemlere dolayısıyla biyoteknolojik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmalarımız sırasında kullandığımız  cinsin de ışığa toleranslarının farklı olduğunu, ancak *Nostoc* suşunun diğerlerine göre daha yüksek bir nitrojenaz aktivitesi gösterdiği saptanmıştır. Bu nedenle biyogübre çalışmalarında uygun cins olabileceği düşünülmektedir. Dünyanın çoğu ülkesinde özellikle siyanobakterilerin tarım alanında “starter kültür” olarak kullanımı yaygındır, ancak ülkemizde bu konu *Rhizobium* cinsi ile sınırlı kalmıştır. Bu nedenle ucuz ve kaliteli gübre eldesi için araştırmacılar, siyanobakterilerin üzerinde yoğunlaşarak bunların çevresel faktörlere cevaplarını araştırmışlardır. Günümüze kadar yapılan çalışmalar sonucunda ortaya çıkan kanı, ucuz ve kaliteli biyogübre eldesinde siyanobakterilerden yararlanmanın kaçınılmaz olduğu yönündedir.

Çalışmalarımız sonucunda elde edilen verilerden, her üç cinsin optimum ışık şiddeti isteği belirlenmiş olup bundan sonra yapılacak çalışmalara ışık tutacağına inanmaktayız. Konu üzerinde çalışma yapacak araştırmacıların ilerki basamaklarda “large scale up” tekniğini kullanarak biyogübre uygulamalarında kullanılacak olan siyanobakterilerin üretimini artırmaya ve dolayısıyla tarım alanında yaygın olarak kullanımının sağlanmasına yönelik olmalıdır.

TEŞEKKÜR

Nitrojenaz aktivitesinin belirlenmesi aşamasında

her türlü imkanı sağlayan A.. Gıda Mühendisliği ğretim yesi Sayın Prof. Dr. S. Dönmez'e, çalışma süresince bilgi ve yönlendirmelerinden yararlandığım A.. Ziraat Fakültesi ğretim yesi Sayın Prof. Dr. S. Taban'a ve A..F.F. Öğretim yesi Sayın Prof. Dr. O. Obalı'ya teşekkürlerimi sunarım.

KAYNAKLAR

1. Albrecht SL. Principles and Applications of Soil Microbiology. Prentice-Hall, America 1998.
2. Herrero A, Muro-Pastor AM and Flores E. Nitrogen control in cyanobacteria. J Bacteriol. 2001; 183: 411.
3. Manahan SE. Environmental Science and Technology, Lewis Publishers, New York 1997.
4. Madigan MT, Martinko JM and Parker J. Brock Biology of Microorganisms, 8. baskı. Prentice-Hall London 1997.
5. Purves WK, Orians GH, Heller HC and Sadava D: Life: The Science of Biology, 5. baskı. Sinauer Assoc, Inc. USA, 1997.
6. Adhya TK, Pattnaik P, Satpathy S N, Kumaraswamy S, and Sethunathan N. Influence of phosphorus application on methane emission and production in flooded paddy soils. Soil Biol Biochem 1998; 30: 177.
7. Apte SK, Reddy BR and Thomas J. Relationship between sodium influx and salt tolerance of nitrogen-fixing cyanobacteria. Appl Environ Microbiol 1987; 53: 1934.
8. Audholia S, Goyal D and Saxena RK. Zinc tolerance in *Phormidium uncinatum*. Folia Microbiol 1993; 38: 341
9. Bender J, Gould JP, Vatcharapijarn Y, Young JS and Phillips P. Removal of zinc and manganese from contaminated water with cyanobacteria mats. Water Environ Res 1994; 66: 679.
10. Bottomley PJ, Grillo, JF, Baalen CV and Tabita FR. Synthesis of nitrogenase and heterocysts by *Anabaena*, sp. CA in the presence of high levels of ammonia. J Bacteriol, 1979; 140: 938
11. Cavet JS, Gilles PMB and Nigel JR. Zn, Cu and Co in cyanobacteria: selective control of metal availability. FEMS Microbiol Rev 2003; 27: 165
12. Clemencia L, Kumazawa S and Mitsui A. Cyclic appearance of aerobic nitrogenase activity during synchronous growth of unicellular cyanobacteria. Curr Microbiol 1986; 13: 149).
13. El-Enany AE and Issa AA. Cyanobacteria as a biosorbent of heavy metals in sewage water. Eur J Pharmacol 2000; 8: 95
14. Fang W-C and Kao CH. Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc. Plant Sci 2000; 158: 71.
15. Fernandes TA, Iyer V and Apte SK. Differential respon-

ses of nitrogen fixing cyanobacteria to salinity and osmotic stresses. Appl and Environ Microbiol 1993; 59: 899

16. Gianessi LP, Silvers CS, Sankula S and Carpenter JE. Herbicide Tolerant Rice. Plant Biotechnology: Current and Potential Impact for Improving Pest Management in U.S. Agriculture an analysis of 40 Case Studies. www. ncfap. org, pp 1, 2002.

17. Howard S, Hales BJ and Socolofsky MD. Nitrogen fixation and ammonia switch-off in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas viridis*. J Bacteriol 1983; 155: 107.

18. Irisarri P, Gonnet S and Monza J. Cyanobacteria in Uruguayan rice fields: diversity, nitrogen fixing ability and tolerance to herbicides and combined nitrogen. J Biotechnol 2001; 91: 95

19. Jianyi M, Ligen X, Shufeng W, Rongquan Z, Shuihu J, Songqi H and Youjun H. Toxicity of 40 Herbicides to the Green Alga *Chlorella vulgaris*. Exotoxicol Environ Saf 2002; 51: 128

20. Jose MN, Herrero A and Flores E. Control of nitrogenase mRNA levels by products of nitrate assimilation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC7120. Plant Physiol, 1991; 97: 825

21. Leganes F, Carreres R, Tome RG, Nieva M, Quesada A, Sendra J and Valiente EF. Effect of phosphate fertilisation, straw incorporation, insecticide application and inoculation with cyanobacteria on rice productivity. Invest Agr Prod Prot Veg 2001; 16: 273.

22. Mansour FA, Soliman ARI, Shaaban-Desouki SA and Hussein MH. Effect of herbicides on cyanobacteria. I. Changes in carbohydrate content, Pmase and GOT activities in *Nostoc* sp. and *Anabaena* sp. Phykos 1994; 33: 153

23. Moisaner PH, McClinton E and Paerl HW. Salinity effects on growth, photosynthetic parameters and nitrogenase activity in Estuarine planktonic cyanobacteria. Microbial Ecol 2002; 43: 432

24. Murry M A, Hallenbeck PC and Esteva D. Nitrogenase inactivation by oxygen and enzyme turnover in *Anabaena cylindrica*. Can J Microbiol 2002; 29: 1286

25. Nathanael G, Lin HY and Huang TC. Induction of a nitrogenase activity rhythm in *Synechococcus* and the protection of its nitrogenase against photosynthetic oxygen. Curr Microbiol 1987; 15: 29

26. Noriko T, Kasai F and Watanabe MM. Effects of Cu, Cd and Zn on photosynthesis of freshwater benthic algae. J Appl Phycol 1989; 1: 39

27. Pratley JE, Broster JC, Flower GE. and Flower RF. Herbicide resistance in the rice growing regions of Southern Australia. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation, No: 01/ 40 pp1 2001.

28. Rai AK and Tiwari SP. Response to NaCl of nitrate assimilation and nitrogenase activity of the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 and its mutants. J Appl Microbiol

1999; 87: 877

29. Rippka R and Stanier RY. The effects of anaerobiosis on nitrogenase synthesis and heterocyst development by Nostocacean cyanobacteria. J Gen Microbiol 1978; 105: 83

30. Selwin PT and Shanmugasundaram S. Osmoregulatory role of alanine during salt stress in the nitrogen fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. 287. Biochem Intern 1991; 23: 93

31. Singh AL, Asthana RK, Srivastava SC, and Singh SP. Nickel uptake and its localization in cyanobacterium. FEMS Microbiol Lett 1992; 99: 165

32. Singh HN, Rai UN, Rao VV and Bagchi SN. Evidence for ammonia as an inhibitor of heterocyst and nitrogenase formation in the cyanobacterium *Anabaena cycadeae*. Biochem Biophys Res Commun 1983; 111: 180.

33. Singh MV and Abrol IP. Transformation and movement of zinc in an alkali soil and their influence on the yield and uptake of zinc by rice and wheat crops. Plant Soil 1986; 94: 445

34. Singh LJ and Tiwari DN. Effects of selected rice field herbicides on photosynthesis, respiration and nitrogen assimilating enzyme systems of paddy soil diazotrophic cyanobacteria. Pestic Biochem Phys 1988; 31: 120.

35. Singh S. Involvement of ammonium assimilation in ammonium inhibition of nitrogenase activity in cyanobacterium, *Nostoc* Anth. Indian J Exp Biol 1991; 29: 496.

36. Sroga GE. Regulation of nitrogen fixation by different nitrogen sources in the filamentous non-heterocystous cyanobacterium *Microcoleus* sp. FEMS Microbiol Lett 1997; 153: 11

37. Takamura N, Kasai F and Watanabe MM. Effects of Cu, Cd and Zn on photosynthesis of freshwater benthic algae. J Appl Phycol 1989; 1: 39.

38. Takamura N, Kasai F and Watanabe MM. Unique response of cyanophyceae to copper. J Appl Phycol 1990; 2: 293.

39. Turpin DH, Edie SA and Calvin DT. In vivo nitrogenase regulation by ammonium and methylamine and the effect of MSX on ammonium transport in *Anabaena flos-aquae*. Plant Physiol 1984; 74: 701.

40. Valiente EF, Quesada A, Prosperi C, Nieva M, Leganes F and Ucha A. Short and long term effects of ammonium on photodependent nitrogen fixation in wetland rice fields of Spain. Biol Fert Soils 1997; 24: 353.

41. Valiente EF and Leganes F. Regulatory effect of pH and incident irradiance on the levels of nitrogenase activity in the cyanobacterium *Nostoc* UAM. J Plant Physiol 1989; 135: 623

42. Warr SRC, Reed RH and Stewart WDP. Physiological responses of *Nodularia harveyana* to osmotic stress. Mar Biol 1984; 79: 21.

43. Wilson JT and Alexander M. Effect of soil nutrient status and pH on nitrogen-fixing algae in flooded soils. Soil Sci Soc Am J 1979; 43: 936.

44. Yan GA, Yan X and Wu W. Effects of the herbicide

molinate on mixotrophic growth, photosynthetic pigments and protein content of *Anabaena sphaerica* under different light conditions. *Ecotox Environ Safe* 1997; 38:144.

45. Fay P. Factors influencing dark nitrogen fixation in a blue-green alga. *Appl Environ Microbiol* 1976; 31: 376

46. Ramos J L, Madueno F and Guerrero M G. Regulation of nitrogenase levels in *Anabaena* sp. ATCC 33047 and other filamentous cyanobacteria. *Arch Microbiol* 1985; 141: 105.

47. Tsygankov AA, Chan VN and Gogotov IN. *Anabaena variabilis* in continuous culture growth and adaptation potential of its nitrogenase system. *Microbiology* 1992; 60: 591.

48. Raps S, Wyman K, Siegelman HW and Falkowski PG. Adaptation of the cyanobacterium *Microcystis* sp. to light intensity. *Plant Physiol* 1983; 72: 829.

49. Smith DL, Patriquin DG, Dijak M and Curry GM. The effect of light dependent oxygen consumption on nitrogenase activity in *Anabaena cylindrica*. *Can J Bot* 1986; 64: 1843.

50. Rippka R. Isolation and purification of cyanobacteria.

Methods Enzymol 1988; 167: 3.

51. Castenholz RW. Culturing methods for cyanobacteria. *Methods Enzymol* 1988; 167: 68.

52. Fogg GE, Stewart WDP, Fay P and Walsby AE. *The Blue Green Algae*. Academic Press, New York, 1973.

53. Rippka R. Recognition and identification of cyanobacteria. *Methods Enzymol* 1987; 167: 28.

54. Cappuccino JG and Sherman N: *Microbiology A Laboratory Manual*. 6. baskı. Benjamin Cummings, S. Francisco, 2001.

55. Prosperi C, Luna C and Valiente EF: Influence of pH light intensity and oxygen on the short-term effect of ammonium on nitrogenase activity of cyanobacteria from rice fields. *Environ and Exp Bot* 1993; 33: 545.

56. Burlage RS, Atlas R, Stahl D, Geesey G, and Sayler G: *Techniques in Microbial Ecology*. Oxford University Press, America, 1998.