ÖLÇÜM VE ARAŞTIRMA YÖNTEMLERİ KILAVUZU

Denizsuyu, Sediment ve Makroalg Örneklemesi: Gübre ve Biyoplastik Üretiminde İleri Uygulamalar

Interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN

Faaliyet 1.1. & A.1.2
Araştırma Ekibinin ve Araştırma Yönteminin Oluşturulması I & II

Proje Yürütücüsü
Prof. Dr. Levent Bat
Sinop Üniversitesi /Türkiye
Su Ürünleri Fakültesi
Telefon: +90 368 287 62 62
Email: leventb@sinop.edu.tr

İletişim Yöneticisi
Dr. Elif Arıcı
E-mail: earici@sinop.edu.tr
Telefon: +90 368 287 62 65 - 3418

Proje web sitesi: https://www.macroclean.org/

Bu belge, Interreg NEXT Karadeniz Havzası Programı'nın mali desteğiyle yürütülen MACRO CLEAN projesinin (Makroalg Patlamaları için Araştırma, Temizlik Yöntemleri, Ekonomik Değerlendirme ve Pilot Uygulama) faaliyetlerine dayanmaktadır.

Bibliyografik amaçlarla bu belge şu şekilde kaynak gösterilmelidir:
MACRO CLEAN Projesi. (2025). Makroalg, deniz suyu ve sediment örneklemesi ile makroalglerin gübre ve biyoplastik uygulamalarında kullanımı için metodoloji kılavuzu (BSB00584, Interreg NEXT Karadeniz Havzası Programı). Sinop Üniversitesi, 52 s. https://www.macroclean.org/

Sorumlu yazarlar:
leventb@sinop.edu.tr[1]& earici@sinop.edu.tr[2]

Katkıda bulunan yazarlar:
Rıza Bayrak, Ömer Elkıran, Dilara Kaya Öztürk, Ayşah Öztekin, Orçin Uygun, Gökhan Yıldız, Erdoğan Çiçek, Sevil Sungur, Burak Seçer, Akın Ustaoğlu and Seray Sevgi

Yayın tarihi: Eylül 2025

Bu belgenin içeriğinin sorumluluğu, Interreg NEXT Karadeniz Havzası Programı kapsamında yürütülen BSB00584 MACRO CLEAN Projesi ortaklarına aittir. Belge, tüm ortakların üzerinde uzlaştığı en iyi uygulamalara ilişkin gayriresmî bir mutabakatı yansıtmaktadır.

YÖNETİCİ ÖZETİ

Interreg NEXT Karadeniz Havzası Programı (BSB00584) kapsamında yürütülen MACRO CLEAN (Makroalg Patlamaları için Araştırma, Temizlik Yöntemleri, Ekonomik Değerlendirme ve Pilot Uygulama) Projesi; Türkiye'den Sinop Üniversitesi (SNU) ve Marmara Belediyeler Birliği (MMU), Gürcistan'dan Batum Devlet Üniversitesi (BSU) ve Bulgaristan'dan Şumen Üniversitesi'nin (ShU) katılımıyla gerçekleştirilen ortak bir girişimdir. Proje, makroalglerin ekonomik olarak değerlendirilmesine yönelik araştırma ve pilot uygulamalara odaklanmakta; aynı zamanda ötrofikasyona ve Karadeniz bölgesinde makroalg patlamalarına yol açan insan faaliyetlerinin etkilerini önlemeyi ve hafifletmeyi de amaçlamaktadır.

Projenin temel amacı; makroalg araştırmaları için kapsamlı bir araştırma metodolojisi geliştirmek, laboratuvar kapasitelerini artırmak, makroalg temelli uygulamalara yönelik fizibilite planları hazırlamak, paydaşların farkındalığını yükseltmek ve yenilikçi temizlik teknolojileri konusunda işbirliğini teşvik etmektir. Karasal kaynaklı kirlilik ve deniz ekosistemlerindeki değişimlerden büyük ölçüde kaynaklanan ötrofikasyon ve alg patlamaları gibi bölgesel sorunlara çözüm üreterek, proje sürdürülebilir kaynak yönetimini desteklemekte ve kalıcı olumlu etkiler yaratmayı hedeflemektedir.

Bu kılavuz, makroalg, deniz suyu ve sediment örneklemesine; ayrıca makroalglerin gübre ve biyoplastik uygulamalarında kullanımına yönelik olarak Faaliyet 1.1 ve Faaliyet 1.2 kapsamında ortaklaşa geliştirilen metodolojiyi ortaya koymaktadır. Paydaşların katılımı ve uyumlaştırılmış bir metodolojinin geliştirilmesi sayesinde, A.1.1 ve A.1.2 politika yapıcılar, araştırmacılar ve çevre kuruluşlarının bu faaliyetleri etkin bir şekilde izlemesine ve uygulamasına yardımcı olacak pratik yönergeler bütünü oluşturmuştur.

Bu belge, tüm ortakların ortak çabalarını ve gayriresmî mutabakatını yansıtmakla birlikte, Interreg NEXT Programı'nın resmî görüşlerini mutlaka temsil etmemektedir.

Prof. Dr. Levent BAT
Proje Yürütücüsü
Eylül, 2025

İÇİNDEKİLER

YÖNETİCİ ÖZETİ 3

GİRİŞ 6

KISALTMALAR 7

BÖLÜM I – SAHA ÇALIŞMALARI 8

I.I. MAKROALG BİYOMAS ARAŞTIRMASI VE ÖRNEKLEME TEKNİKLERİ 8

I.II. MAKROALG ARAŞTIRMALARINDA ÖRNEKLEME ALANLARININ BELİRLENMESİ 14

I.III. PLANLANAN İSTASYONLARIN KONUMU 15

BÖLÜM II – ÖRNEKLEME TEKNİKLERİ 20

II.I. MAKROALG ÖRNEKLEME 20

II.II. DENİZSUYU ÖRNEKLEME 21

II.III. SEDİMENT ÖRNEKLEME 25

BÖLÜM III- ANALİTİK TEKNİKLER 27

III.I. MAKROALGLERDE METAL ANALİZİ 27

III.II. DENİZSUYUNDA METAL ANALİZİ 27

III.III. SEDİMENTTE METAL ANALİZİ 29

BÖLÜM IV- SERA 30

IV.I. SERA KURULUMU 30

IV.II. SERADAKİ BİTKİLER 31

IV.III. BİTKİ BÜYÜME DENEMELERİ 33

BÖLÜM V – BİTKİ MATERYALLERİ 34

V.I. SEBZE PERFORMANSI 35

V.II. BİTKİ ANALİZLERİ 35

Interreg NEXT Black Sea Basin Co-funded by the European Union MACRO CLEAN

BÖLÜM VI – TOPRAK MATERYALLERİ 37
VI.I. TOPRAK MATERYALİ VE ANALİZİ 37
VI.II. BİTKİLERİN SULANMASI 38
BÖLÜM VII - GÜBRELER 39
VII.I. SIVI GÜBRE 39
VII.II. KATI GÜBRE 41
VII.III. KOMPOST GÜBRE 42
VII.IV. GÜBRE ANALİZİ 43
VII.V. KİMYASAL GÜBRE UYGULAMASI (15N, 15P, 15K) 44
BÖLÜM VIII – BİYOPLASTİKLER 45
VIII.I. EKSTRAKSİYON PROSEDÜRÜ 45
VIII.II. BİYOFİLM HAZIRLIĞI 45
VIII.III. FİLMLERİN ÖZELLİKLERİ 46
VIII.IV. EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ 48
ARAÇLAR VE EKİPMANLAR 50
KAYNAKLAR 52

GİRİŞ

Gerekçe

MACRO CLEAN Projesi, Türkiye, Gürcistan ve Bulgaristan'dan üç Karadeniz Havzası ülkesinin ortak çabalarıyla, güncel çevresel sorunlara çözüm üretmek amacıyla başlatılmıştır. Proje, makroalglerin gübre ve biyoplastik olarak kullanılmasına yönelik sürdürülebilir ve etkin toplanması, değerlendirilmesi ve ekonomik katma değer kazandırılması için araştırma ve pilot uygulamalara odaklanan kapsamlı bir çerçeve sunmaktadır.

Bu amaç doğrultusunda, ortaklaşa geliştirilen bir metodoloji; makroalg, deniz suyu ve sediment örneklemesi için açık yönergeler ortaya koymakta ve bunların çeşitli ekonomik sektörlerde kullanımına rehberlik etmektedir. Bu kılavuz, dört ana bileşeni kapsayan entegre bir araştırma metodolojisi sunmaktadır: saha çalışmaları, örnekleme teknikleri, analitik prosedürler ve uygulamalı araştırmalar.

Ayrıca, gübre ve biyoplastiklerle ilgili örnek olaylar ve pilot projeler üzerinden, makroalg kullanımına yönelik pratik uygulamalar ve yenilikçi yaklaşımları da vurgulamaktadır. Metodolojik tutarlılığı sağlamak ve veri kalitesini artırmak yoluyla, bu bileşenler; Karadeniz bölgesinde ve ötesinde, deniz kaynaklarının sürdürülebilir kullanımını teşvik etmeye kararlı araştırmacılar, kurumlar ve paydaşlar arasında bilgi paylaşımını kolaylaştırmayı amaçlamaktadır.

Teşekkür

Bu metodoloji rehberinin hazırlanmasına katkı sağlayan tüm kişi ve kurumlara en içten teşekkürlerimizi sunarız. Özellikle çalışmanın farklı aşamalarında verdikleri değerli rehberlik, uzmanlık ve yapıcı öneriler için Prof. Dr. Rıza Bayrak, Doç. Dr. Ömer Elkıran, Doç. Dr. Dilara Kaya Öztürk, Dr. Öğr. Üyesi Ayşah Öztekin, Dr. Öğr. Üyesi Orçin Uygun, Dr. Gökhan Yıldız, Dr. Erdoğan Çiçek, Dr. Sevil Sungur, Dr. Burak Seçer, Ziraat Mühendisi Akın Ustaoğlu ve Yüksek Lisans öğrencisi Seray Sevgi'ye özel olarak teşekkür ederiz. Onların özverili desteği ve akademik katkıları, bu yayının bilimsel niteliğini ve genel kalitesini önemli ölçüde yükseltmiştir.

Önemli not: *Bu materyalin içeriğinden yazar(lar) sorumludur. İçerik, Avrupa Birliği'nin resmi görüşünü yansıtmak zorunda değildir. Kaynak belirtilmek ve yapılan değişiklikler açıkça gösterilmek koşuluyla çoğaltılmasına izin verilmektedir.*

KISALTMALAR

AAS	Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
Al	Alüminyum
Ca	Kalsiyum
$CaCl_2$	Kalsiyum Klorür
Co	Kobalt
Cr	Krom
Cu	Bakır
DO	Çözünmüş Oksijen
E223	Sodyum Metabisülfit
EC	Elektriksel İletkenlik
EVA	Etilen-Vinil Asetat
Fe	Demir
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi
HCl	Hidroklorik Asit
Hg	Cıva
HNO_3	Nitrik Asit
ICP-MS	İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometrisi
IR	Kızılötesi
K	Potasyum
KOH	Potasyum Hidroksit
Mg	Magnezyum
Mn	Manganez
N	Azot
Na	Sodyum
Na_2CO_3	Sodyum Karbonat
Ni	Nikel
P	Fosfor
ppm	Milyonda Birim
Sb	Antimon
Se	Selenyum
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
Sn	Kalay
TGA	Termogravimetrik Analiz
UV	Ultraviyole
W/V	Ağırlık/Hacim
XRD	X-ışını Kırınımı
Zn	Çinko

BÖLÜM I – SAHA ÇALIŞMALARI

I.I. MAKROALG BİYOMAS ARAŞTIRMASI VE ÖRNEKLEME TEKNİKLERİ

Makroalg biyokütlesi araştırması, kıyı sularında yürütülmekte olup yaklaşık 15 x 15 metrelik bir alanda ve 0–1 metre derinlikte, en az üç farklı noktadan örnek alınarak bölgesel temsil edilebilirlik sağlanmaktadır (Şekil 1 ve 2).

Örneklerin toplanmasında, Bouiadjra ve ark. (2021) tarafından önerilen yöntemde belirtildiği üzere 20 x 20 cm'lik (400 cm^2) bir quadrat kullanılmaktadır (Şekil 3a). Örnekler, spatula yardımıyla elle toplanmakta, önce plastik poşetlere konulmakta, ardından da deniz suyu ile doldurulmuş plastik kavanozlara aktarılmaktadır (Şekil 3b). Koruma amacıyla, %2–5 oranında formaldehit–deniz suyu çözeltisi, ÇŞB-ÇEDİDGM ve TÜBİTAK-MAM (2017) tarafından önerildiği şekilde eklenmektedir (Şekil 3c).



Şekil 1. Biyomas araştırması



Şekil 2. Makroalg örnekleme



Şekil 3. (a) Kuadrat, (b) Plastik kaplar and (c) Formaldehit

Laboratuvara getirilen örnekler, taş, kum veya epifit gibi yabancı maddelerden arındırmak amacıyla damıtık su ile yıkanır (Şekil 4). Temizlenen örnekler, fazla suyun uzaklaştırılması için emici kağıt üzerine yerleştirilir (Şekil 5) ve ardından 60 °C'de, 48 saat boyunca etüvde kurutulur (Srijaya ve ark., 2010; Fernández-Aláez & Fernández-Aláez, 2011; Setthamongkol ve ark., 2015) (Şekil 6). Kurutma işleminin ardından, makroalgler tartılır ve yabancı maddelerden ayrılan örnekler üzerinde, gerekirse mikroskobik inceleme yapılarak taksonomik teşhis gerçekleştirilir.

Kimyasal analiz için kullanılacak makroalgler, biyokütle araştırmasından bağımsız olarak ayrı örnekler halinde toplanır. Bu örnekler, iyon giderilmiş su ile yıkanır, makroskobik epizoa ve epifitlerden arındırılır ve ardından laboratuvar etüvünde 60°C'de 48 saat boyunca kurutulur. Kurutulan materyal daha sonra havan ve tokmak kullanılarak ince toz haline getirilir (Şekil 7). Bu işlem, makroalg örneklerinin hem biyokütle ölçümleri hem de ayrıntılı kimyasal analizler için doğru şekilde hazırlanmasını sağlar.

Tanımlanan alg örneklerinin biyokütle ölçümleri, 0,0001 g hassasiyetindeki analitik terazi kullanılarak yapılır. Makroalglerin nicel örnekleri, birim alan başına biyokütleye (g kuru ağırlık/m^2) dönüştürülür. Kıyı şeridi boyunca bentik alg topluluklarının mevsimsel dağılımını daha iyi anlamak amacıyla, makroalg türlerine ait verilerin ortalama değerleri istatistiksel analize tabi tutulur. Ayrıca, pH, sıcaklık, tuzluluk ve çözünmüş oksijen gibi çevresel parametrelerin yerinde (in situ) ölçümleri, çok parametreli bir cihaz kullanılarak gerçekleştirilir (Şekil 8).



Şekil 4. Temizleme ve tür teşhisi



Şekil 5. Örneklerden fazla suyun kağıt üzerinde uzaklaştırılması



Şekil 6. Örneklerin etüvde kurutulması



Şekil 7. Toz haline getirilmiş örnekler



Şekil 8. Fiziksel paremetrelerin yerinde ölçümü

I.II. MAKROALG ARAŞTIRMALARINDA ÖRNEKLEME ALANLARININ BELİRLENMESİ

İstasyonlar aşağıdaki kriterlere göre seçilmektedir:

a. Kıyısal Özellikler: Örnekleme için kumlu, kayalık ve çamurlu ortamlar gibi farklı zemin tipleri hedeflenmektedir. Bu çeşitli zeminler, makroalglerin dağılımı ve büyümesi üzerinde önemli bir rol oynamaktadır.

b. İnsan Faaliyetlerine Yakınlık: Yüksek düzeyde insan etkisine maruz kalan bölgeler (ör. tarımsal drenaj, kentsel atık su deşarjları) ile görece az etkilenmiş, nispeten bozulmamış alanlar örnekleme için seçilmektedir. Bu karşılaştırma, insan kaynaklı etkilerin değerlendirilmesine olanak tanır. Makroalg büyümesi ve kıyı ekosistemleri üzerindeki çevresel etkinin tüm boyutlarını anlayabilmek için hem yoğun insan etkisine maruz kalan hem de görece doğal kalan alanların seçilmesi kritik öneme sahiptir. Tarımsal drenaj ve kentsel atık su deşarjlarından etkilenen bölgeler genellikle azot ve fosfor gibi besin elementlerinde artış gösterir. Bu durum ötrofikasyona ve makroalg patlamalarına yol açar. Bu tür alanlar, insan faaliyetlerinin deniz ekosistemleri üzerindeki doğrudan sonuçlarına dair değerli bilgiler sunar. Buna karşılık, görece bozulmamış ve doğal kalan alanlar, doğal süreçlerin baskın olduğu referans noktaları olarak işlev görür ve karşılaştırmalar için temel bir ölçüt sağlar. Bu iki farklı çevre tipinin karşılaştırılması sayesinde, insan etkisiyle ortaya çıkan değişimlerin boyutu değerlendirilebilir ve çevresel bozulmayı azaltmaya yönelik yönetim stratejilerinin etkinliği ölçülebilir. Bu ikili yaklaşım, insan faaliyetlerinin ekolojik sonuçlarının daha iyi anlaşılmasına katkı sağlar ve daha sürdürülebilir kıyı yönetim uygulamalarının geliştirilmesine destek olur.

c. Ulaşılabilirlik ve Örnekleme Uygunluğu: Seçilen bölgeler yıl boyunca kolayca erişilebilir olmalı ve düzenli izleme ile veri toplamanın sürekliliğini sağlamak için mevsimsel olarak tekrarlanan örnekleme çalışmalarına elverişli olmalıdır.

d. Temsil Yeteneği: Seçilen istasyonlar, kıyı şeridinin genel ekolojik durumunu doğru biçimde yansıtır. Uzun vadeli izleme çalışmalarına elverişli olup, uzun süre boyunca sürekli veya tekrarlayan veri toplama imkanı sunar. Bu uzun vadeli yaklaşım, ekosistemdeki değişimlerin izlenmesi, zaman içindeki eğilimlerin belirlenmesi ve uygulanan yönetim ya da koruma çalışmalarının etkinliğinin değerlendirilmesi açısından büyük önem taşır.

e. Mekansal Değişkenlik: İstasyonlar, mekansal heterojeniteyi yansıtacak şekilde yeterli uzaklıklara dağıtılmıştır. Bu sayede farklı bölgeler ve çevresel gradyanlar arasındaki değişkenlik incelenebilmektedir.

f. Kaynak Potansiyeli: Makroalg çeşitliliği ve biyokütlesi yüksek alanlara öncelik verilmektedir. Özellikle, gübre ve biyoplastik üretimine uygun türlerin bulunduğu bölgeler tercih edilmektedir.

I.III. PLANLANAN İSTASYONLARIN KONUMU

Bu çalışma, bölgede görülen makroalg aşırı büyümesi ve ötrofikasyonun kaynaklarını ve dinamiklerini incelemek amacıyla tasarlanmıştır. Araştırmanın odağında, bu olgulara katkıda bulunan çevresel ve insan kaynaklı faktörlerin belirlenmesi yer almaktadır.

Çalışmanın temel amaçlarından biri, gübre ve biyoplastik üretimi gibi uygulamalar yoluyla makroalglerin sürdürülebilir kullanımına katkı sağlamaktır. Araştırma, özellikle bölgedeki baskın makroalg türleri olan *Ulva* spp. ve *Cystoseira* sp. üzerine yoğunlaşmaktadır (Şekil 9 ve 10). Bu türlerden alınan örnekler ile; makrobentik alglerin yoğunluğu, mevsimsel büyüme modelleri ile makroalg, denizsuyu ve sedimentin besin bileşimi gibi çeşitli faktörler değerlendirilmektedir.



Şekil 9. *Ulva* sp.



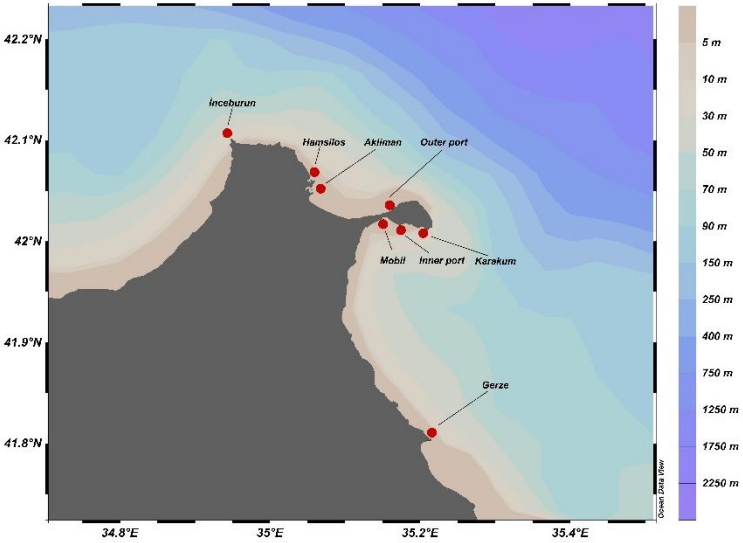
Şekil 10. *Cystoseira* sp.

Çalışma tasarımında belirtildiği üzere, örnekleme bölgeleri önceden belirlenen kriterlere göre seçilmiştir. Türkiye'nin Sinop ilinde seçilen alanlar şunlardır: İnceburun, Hamsilos, Akliman, Dış Liman, Karakum, İç Liman ve Mobil (Şekil 11). Bulgaristan'da örnekleme bölgeleri, Emine Burnu'nun güneyinde yer almakta

olup Burgaz Körfezi, Chengene Skele Körfezi, Maslen Nos Körfezi, Petrol Limanı Körfezi, Sozopol ve Bamboo'yu kapsamaktadır (Şekil 12). Gürcistan'da ise belirlenen örnekleme alanları Sarph, Kvariati, Gonio, Yeşil Burun (Green Cape), Tsikhisdziri, Photi ve Kulevi'den oluşmaktadır (Şekil 13). Örnekleme istasyonlarının koordinatları (enlem ve boylam) tabloda sunulmaktadır (Tablo 1)

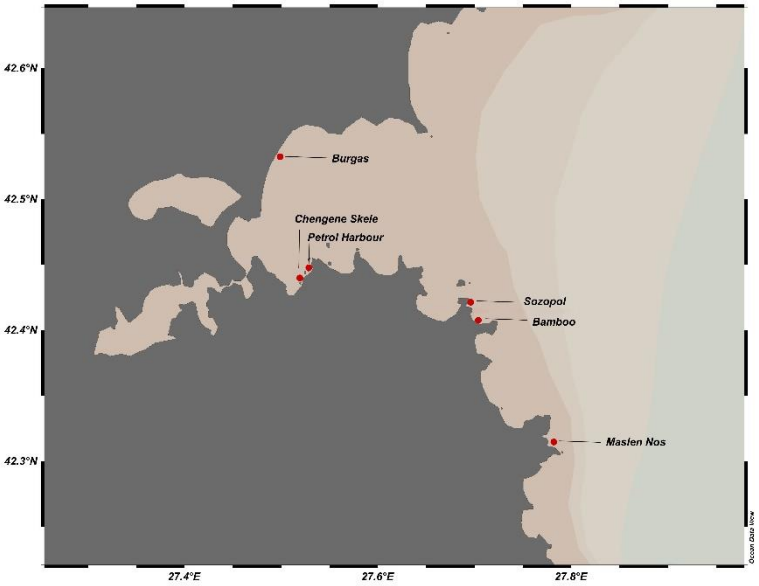
Table 1. Örnekleme istasyonlarının koordinatları

İstasyon adı	Enlem	Boylam
İnceburun (TR)	42°5'46.38"N	34°56'40.63"E
Hamsilos (TR)	42°3'38.14"N	35°2'39.74"E
Akliman (TR)	42°3'3.31"N	35°2'37.19"E
Dış Liman (TR)	42°1'51.48"N	35°9'6.32"E
Karakum (TR)	42°0'56.16"N	35°11'11.94"E
İç Liman (TR)	42°1'13.07"N	35°9'34.01"E
Mobil (TR)	42°0'36.81"N	35°7'9.87"E
Burgaz Körfezi (BG)	42°30'16.24"N	27°29'2.87"E
Chengene Skele Körfezi (BG)	42°15'43.24"N	27°18'51.55"E
Maslen Nos Körfezi (BG)	42°18'27.17"N	27°47'24.32"E
Petrol Limanı Körfezi (BG)	42°26'45.36"N	27°32'4.85"E
Sozopol (BG)	42°25'20.02"N	27°41'40.29"E
Bamboo (BG)	42°24′35.49″N	27°42′20.62″E
Sarph (GE)	41°5'39.9"N	41°5'20.0"E
Kvariati (GE)	41°5'40.6"N	41°5'52.8"E
Gonio (GE)	41°5'43.85"N	41°5'56.95"E
Yeşil Burun (Green Cape) (GE)	41°6'96.68"N	41°7'06.14"E
Tsikhisdziri (GE)	41°7'61.02"N	41°7'42.99"E
Photi (GE)	42°0'43.66"N	41°7'27.34"E
Kulevi (GE)	42°2'48.23"N	41°6'27.75"E

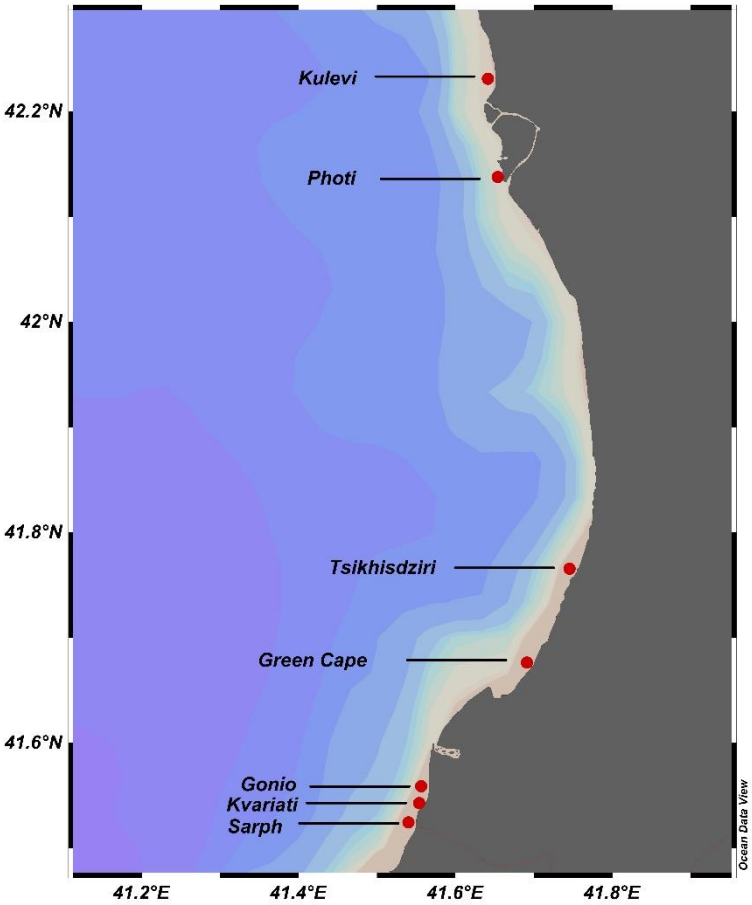


Şekil 11. Sinop ilindeki örnekleme istasyonları

Interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN



Şekil 12. Bulgaristan'da örnekleme istasyonları



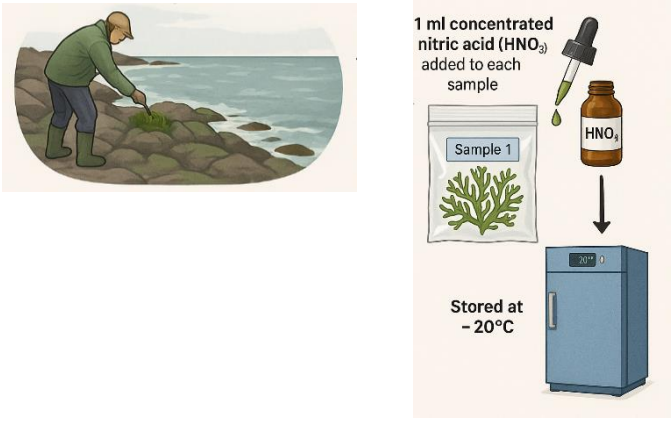
Şekil 13. Gürcistan'da örnekleme istasyonları

BÖLÜM II – ÖRNEKLEME TEKNİKLERİ

Makroalg, Denizsuyu ve Sediment

II.I. MAKROALG ÖRNEKLEME

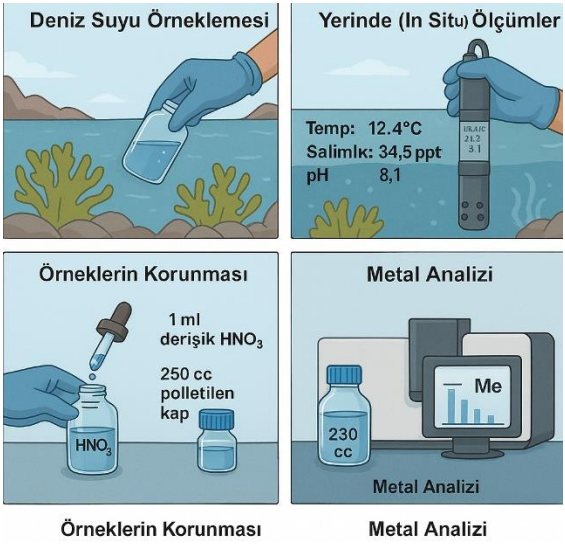
Makroalg örnekleri, çalışılan bölgenin tamamını temsil etmelerini sağlamak amacıyla kıyı şeridindeki farklı noktalardan mevsimsel olarak toplanmaktadır. Toplanan örnekler dikkatle etiketlenir ve taşınmak üzere polietilen torbalara yerleştirilir. Daha sonra gerçekleştirilecek metal analizleri için, her örneğe 1 ml derişik nitrik asit (HNO_3) eklenerek metal çökelmesi önlenir ve eser elementlerin çözünürlüğü korunur. Örnekler, analiz yapılana kadar -20 °C'de saklanır. Bu yöntem, örneklerin bütünlüğünü koruyarak laboratuvarda metal analizi öncesinde bozulma ve kontaminasyona karşı güvence sağlar (Şekil 14).



Şekil 14. Makroalg örneklemesinin görseli

II.II. DENİZSUYU ÖRNEKLEME

Makroalglerin bulunduğu noktalardan denizsuyu örnekleri toplanmaktadır. Bu alanlar, denizsuyu ile makroalgler arasındaki metal geçişinin ilişkisini daha iyi anlamak amacıyla seçilmiştir. Örnek toplamaya ek olarak, sıcaklık, tuzluluk ve pH gibi temel fiziksel parametrelerin anlık (*in situ*) ölçümleri çok parametreli bir prob kullanılarak kaydedilmektedir. Bu sayede örnekleme sırasında geçerli olan çevresel koşullar bütüncül olarak değerlendirilebilmektedir.



Şekil 15. Denizsuyu örneklemesinin görseli

Makroalglerin bulunduğu noktalardan, hem metal analizi hem de klorofil-*a* (Chl-*a*) ölçümü için, 500 ml'lik polietilen kaplara üçer örnek halinde denizsuyu alınmıştır.

Sonraki metal analizleri için örneklerin korunmasını sağlamak amacıyla, her kaba 1 ml derişik HNO_3 eklenmiştir. Kapakları kapatılan kaplar, laboratuvar analizine hazır hale gelene kadar doğrudan güneş ışığından ve ısı kaynaklarından uzak, oda sıcaklığında saklanmıştır. Chl-*a* analizinde kullanılan su örnekleri ise laboratuvara getirildikten sonra vakum filtrasyon sistemi ile süzülmüştür (Şekil 16).

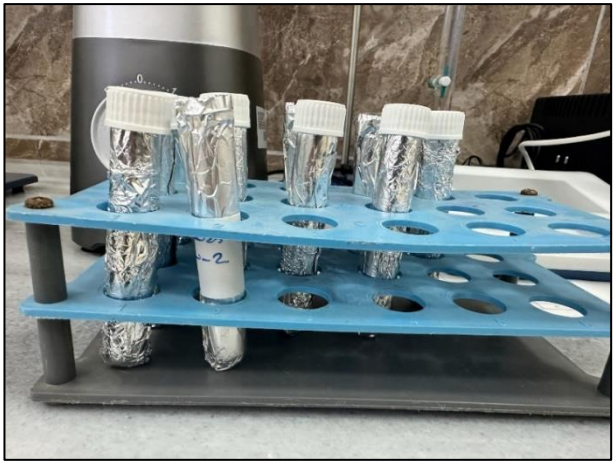


Şekil 16. Filtrasyon sistemi

Klorofil-a (Chl-a) tayini, aşağıda verilen yönteme göre gerçekleştirildi:

Her bir analiz için, 2 litrelik su örnekleri üç tekrar halinde, 0.45 µm gözenek çapına sahip GF/C cam fiber filtre kağıtları kullanılarak süzüldü. Süzme işleminden önce, filtre kağıtları üzerine %1'lik magnezyum karbonat ($MgCO_3$) çözeltisinden birkaç damla damlatılarak nemlendirildi; böylece asitleşme önlendi ve filtrede tutulan parçacıkların pH dengesi korundu. Nemlendirilmiş filtreler vakumlu filtrasyon sistemine yerleştirildi ve 2 litrelik örnekler vakum altında süzülerek algler ve diğer partiküllerin filtre yüzeyinde birikmesi sağlandı.

Filtrasyon işleminin ardından filtre kağıtları dikkatlice katlanarak 15 ml'lik santrifüj tüplerine yerleştirildi (Şekil 17). Her tüp, 10 ml %90'lık aseton çözeltisi ile doldurulduğu, sıkıca kapatıldı ve klorofilin çözücüye geçişini kolaylaştırmak amacıyla buzdolabında (yaklaşık 4 °C) 12–24 saat süreyle bekletildi. Bu adım, alg hücrelerindeki klorofilin asetona maksimum düzeyde aktarılmasını sağlamaktadır.



Şekil 17. Santrifüj tüpleri

24 saatlik ekstraksiyon süresinin ardından tüpler buzdolabından çıkarılarak oda sıcaklığına ulaşmaları beklendi. Daha sonra, katı partiküllerin çökelmesi ve berrak bir süpernatan elde edilmesi için 5000 devir/dakikada 10 dakika süreyle santrifüj edildi.

Elde edilen berrak süpernatanın absorbansı, spektrofotometre kullanılarak 750, 664, 647 ve 630 nm dalga boylarında ölçülmüştür. Bulanıklığın (süspansiyon halindeki partiküllerin ışık saçılımı) neden olabileceği hataları gidermek için, 750 nm'de ölçülen absorbans değerleri 664, 647 ve 630 nm'deki ölçümlerden çıkarılmıştır. Bu düzeltme, klorofil dışı ışık saçılımından kaynaklanan girişimleri en aza indirerek daha doğru klorofil ölçümleri yapılmasını sağlamaktadır (Şekil 18).

Klorofil-*a* (Chl-*a*) Konsantrasyonu Hesaplama Formülü:

Chl-*a* (µg L^{-1}) = (11,85 * (E664 – E750)-1,54 * (E647 - E750)- 0,08 * (E630-E750))*Ve/Vf

Ve: Ekstraksiyon hacmi (ml), Vf: Filtre edilen su hacmi (litre)



Şekil 18. Klorofil ölçümleri

II.III. SEDİMENT ÖRNEKLEME

Sediment örnekleri, farklı zemin yapısına sahip istasyonlardan, sediment kor cihazı veya kürek kullanılarak toplanmıştır (Şekil 19). Çevresel etkileşimlerin incelenebilmesi için örnekler sediment yüzeyinin üst 0–5 cm'lik kısmından alınmıştır. Toplanan örnekler dikkatlice etiketlenerek tanımlanmış ve bütünlüklerinin korunması amacıyla analiz yapılıncaya kadar -20 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır (Şekil 20).



Şekil 19. Sediment kor

Metal analizlerinin doğruluğunu ve hassasiyetini sağlamak amacıyla sediment örnekleri asidik bir ortamda muhafaza edilmektedir. Her bir örneğe, metallerin çökelmesini engellemek ve çözünürlüklerini korumak için az miktarda (1–2 ml) derişik HNO_3 ilave edilmiştir. Bu adım, özellikle karmaşık sediment matrisleriyle çalışıldığında eser metallerin doğru ölçümü açısından kritik öneme sahiptir. Asitle muamele edilen örnekler, laboratuvarda ileri işlemler yapılıncaya kadar genellikle 4°C civarında düşük sıcaklıklarda saklanmakta ve bu şekilde taşınmaktadır.



Şekil 20. Etiketlenmiş sediment örnekleri

Laboratuvara ulaştırılan sediment örnekleri, içerdikleri metalleri açığa çıkarmak ve sediment yapısını parçalamak amacıyla derişik HNO_3 veya HCl gibi asidik çözücüler kullanılarak çözündürülmüştür. Bu işlem, metal içeriğinin tamamen ekstrakte edilmesini ve analize hazır hale getirilmesini sağlamaktadır. Çözünen örnekler daha sonra eser metal konsantrasyonlarının belirlenmesi için analiz edilmiştir. Analizlerde, çevresel örneklerde eser metalleri tespit etme ve nicelendirme açısından oldukça etkili yöntemler olan İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi (ICP-MS) veya Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi (AAS) kullanılmıştır.

BÖLÜM III- ANALİTİK TEKNİKLER

III.I. MAKROALGLERDE METAL ANALİZİ

Makroalglerde metal analizi süreci, bu canlıların yoğun bulunduğu seçili bölgelerden örneklerin toplanmasıyla başlar. Toplanan makroalg örnekleri, analiz sonuçlarını etkileyebilecek denizsuyu, tortu ve diğer kirleticilerden arındırılmak üzere dikkatlice temizlenir. Bu temizlik aşaması, dış etkenlerin ölçüm sonuçlarını etkilemesini önlemek açısından kritik öneme sahiptir.

Temizleme işleminin ardından makroalgler etüvde kurutulur. Bu kurutma işlemiyle örneklerin nemi uzaklaştırılır. Tamamen kuruyan algler ince toz haline gelinceye kadar öğütülür. Metal analizinde genellikle 0,5–1 gram arası kurutulmuş ve öğütülmüş makroalg örneği kullanılır.

Öğütülmüş deniz yosunları, daha sonra asidik sindirim işlemine tabi tutulur. Örnek, organik yapının parçalanması ve içerdiği metallerin açığa çıkarılması amacıyla derişik HNO_3 veya HCl içinde çözündürülür. Sindirim işleminin ardından çözeltide kalabilecek katı kalıntıları uzaklaştırmak için süzme yapılır.

Elde edilen berrak çözelti uygun derişime seyreltilerek metal analizine hazır hale getirilir. Analiz öncesinde makroalg örneklerinin saklanması gerekiyorsa, asitlendirilmiş çözelti içinde muhafaza edilir ve 4 °C'de buzdolabında tutulur. Böylece örnekler test aşamasına kadar bütünlüklerini korur.

III.II. DENİZSUYUNDA METAL ANALİZİ

Denizsuyunda metal analizi, öncelikle makroalglerin bulunduğu bölgelerden örneklerin toplanmasıyla başlar. Denizsuyu örnekleri, taşınma sırasında kirlenmeyi veya uçucu maddelerin kaybını önlemek amacıyla 250 cc'lik kaplara alınarak sıkıca kapatılır. Toplanan örnekler, analiz aşamasına kadar bütünlüklerini korumaları için doğrudan güneş ışığı ve ısıdan uzak, oda sıcaklığında muhafaza edilir. Metal analizi için her bir örneğe 1 ml derişik HNO_3 ilave edilerek metallerin çökelmesi önlenir ve çözeltinin çözünmüş halde kalması sağlanır (Şekil 21). Asitle muamele edilen örnekler, laboratuvarda ileri analizler yapılıncaya kadar kapalı kaplarda saklanır. Laboratuvar ortamında bu denizsuyu örnekleri, eser metal konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla analiz edilir.



Şekil 21. Denizsuyu örneklerine derişik HNO_3 ilavesi

III.III. SEDİMENTTE METAL ANALİZİ

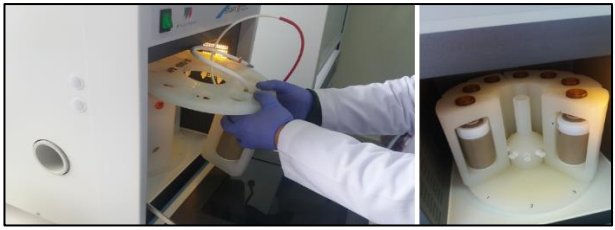
Makroalglerin toplandığı alanlardan alınan sediment örnekleri, sediment yüzeyinin üst 0–5 cm'lik tabakasından toplanmıştır. Toplama işleminin ardından örneklere 1–2 ml nitrik asit eklenmiş, örnekler etiketlenmiş ve ileri analizlere kadar bütünlüklerinin korunması amacıyla -20 °C'de saklanmıştır.

Metal analizinden önce, sediment örnekleri derin dondurucudan çıkarılmış ve nemleri emici kağıt kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, 105 °C'de 24 saat boyunca etüvde kurutulmuştur. Kurutma işleminin ardından örnekler, farklı gözenek boyutlarına sahip eleklerle donatılmış motorlu elek cihazından geçirilmiş ve 63 µm veya daha küçük boyuttaki partiküller element konsantrasyonlarının belirlenmesinde kullanılmıştır (Şekil 22).

Metal analizine ayrılan küçük boyutlu örnekler, mikrodalga parçalama ünitesinde yakılmış, ardından ICP-MS veya AAS cihazları kullanılarak analiz edilmiştir (Şekil 23).



Şekil 22. Kurutulmuş sediment örneklerinin motorlu elek cihazı ile elenmesi



Şekil 23. Mikrodalga parçalama ünitesi

BÖLÜM IV- SERA

IV.I. SERA KURULUMU

Sera, en az 50 m^2 (5,5 m x 9,09 m) büyüklüğünde olacak şekilde tasarlanmış ve kapalı bir yapıdadır (Şekil 24 ve Şekil 25). Sera boyutları 5,5 m x 9,09 m olup toplam alanı 50 m^2'dir. Orta noktasındaki minimum yükseklik 270 cm'dir. Yapıda her biri en az 1 metre genişliğinde iki sürgülü kapı bulunmaktadır. Kapılar, sineklikli, açılıp kapanabilir, metal malzemeden yapılmış ve minimum 45x45 cm boyutlarında havalandırma panjurları ile donatılmıştır.



Şekil 24. Çalışmada kullanılacak seranın görsel temsili



Şekil 25. SNU'da seranın kurulumu

Interreg NEXT Black Sea Basin Co-funded by the European Union MACRO CLEAN

Sera yapısı galvanizli borular kullanılarak inşa edilmiştir. Ana taşıyıcı direkler, her yay bağlantı noktasında zemine çakılmış olup 40 mm galvanizli borudan yapılmıştır; kemer direkleri ise 32 mm galvanizli borudan üretilmiştir. Zemindeki bağlantılar, rüzgar direncini sağlamak için uygun aralıklarla yerleştirilmiştir.

Sera yan yüzeyleri ve tavanında, üç sıra 32 mm galvanizli boru ve en az 2 mm kalınlığında beş sıra eşit aralıklarla yerleştirilmiş galvanizli tel bulunmaktadır (şekilde gösterildiği gibi).

Serada, metal profillerden yapılmış ve naylon örtü ile kaplanmış iki kapı (ön ve arka) bulunmaktadır. Yapının dayanıklılığını artırmak amacıyla, yatay bir üst boruya bağlanan iki dikey destek borusu ile makas tipi çapraz borular kullanılmıştır. Örtü, rüzgar hasarını önlemek için sıkıca serilmiş, kenarları toprağa gömülerek sabitlenmiştir. Kullanılan galvanizli boruların et kalınlığı en az 2,5 mm'dir.

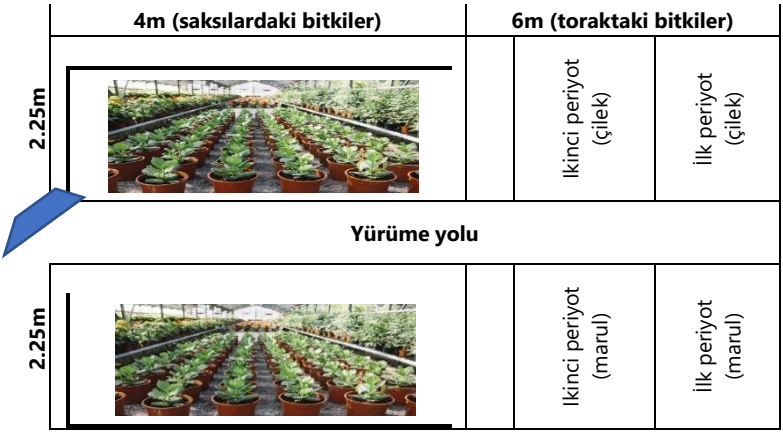
Sera örtüsü (sera filmi), 36 ay dayanıklı polietilen malzemeden yapılmış olup UV, IR, EVA, AO, AV ve difüzyon direncine sahiptir.

IV.II. SERADAKİ BİTKİLER

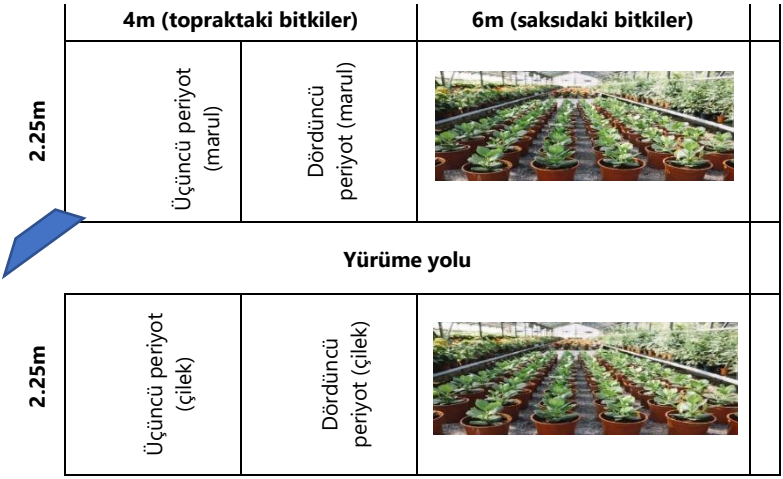
Serada bitkiler hem saksılarda hem de doğrudan toprakta yetiştirilmektedir. Birinci ve ikinci deneme dönemlerinin tamamlanmasının ardından, saksılar seranın toprak alanına taşınmaktadır. Bu yöntem, sera alanının daha verimli kullanılmasına olanak sağlamaktadır (Şekil 26 ve Şekil 27). Dikimden önce analiz edilmiş toprak saksılara yerleştirilmiştir.

Çalışmada sıvı gübre, katı gübre (toz ve pelet formunda) ve kompost olmak üzere üç farklı konsantrasyonda uygulama yapılması hedeflenmiştir: katı gübrelerde 1 g, 3 g, 5 g; sıvı gübrelerde ise 1 ml, 3 ml, 5 ml.

Ayrıca her deneme döneminde 2 saksı kimyasal gübre için, 2 saksı ise kontrol grubu olarak ayrılmıştır. Bu nedenle, her bir bitki türü için her dönem toplamda 14 saksıya ihtiyaç duyulmaktadır.



Şekil 26. Seradaki saksı ve bitkilerin yerleşim planları (Birinci ve ikinci dönemler)



Şekil 27. Seradaki saksı ve bitkilerin yerleşim planları (Üçüncü ve dördüncü dönemler)

Bitki başına saksı dağılımı (Her deneme dönemi için)

- Sıvı gübre: 3 saksı (1 ml, 3 ml, 5 ml)
- Katı gübre (Toz): 3 saksı (1 g, 3 g, 5 g)
- Katı gübre (Pelet): 1 saksı (3 g)
- Kompost: 3 saksı (1 g, 3 g, 5 g)
- Kontrol ve Kimyasal Gübre: 4 saksı
- Toplam: Her bir bitki türü için, her dönemde 14 saksı

IV.III. BİTKİ BÜYÜME DENEMELERİ

Bitki büyüme denemeleri iki aşamada gerçekleştirilmektedir: saksı denemeleri ve sera denemeleri. Saksı denemelerinde, makroalg bazlı gübrelerin bitki gelişimi, verim ve besin alımı üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla saksılarda kontrollü deneyler yapılır. Bu denemeler, standart koşullar altında ayrıntılı veriler elde edilmesini sağlar. Sera denemelerinde ise yarı-tarla koşullarında, daha doğal bir ortamda deneyler yürütülerek gübrelerin performansı daha geniş ölçekte değerlendirilir.

Kullanılan saksılar villa tipi, dikdörtgen formda olup en az 62 litre hacme sahiptir (boyutlar: 38 x 86 x 30 cm). Malzemesi UV ışınlarına dayanıklı ve dış mekanda kullanıma uygundur. Her saksıda bir drenaj deliği ve taban kısmında bir ayak bulunmaktadır.

BÖLÜM V – BİTKİ MATERYALLERİ

Bu araştırma projesinde temsilî bitki materyali olarak çilek (*Fragaria* × *ananassa*) ve marul (*Lactuca sativa* L.) seçilmiştir.

Çilek, Rosaceae (gülgiller) familyasında yer alan Fragaria cinsine ait, meyvesi için dünya genelinde yaygın olarak yetiştirilen hibrit bir türdür. Seçilen çeşit, geniş ekolojik uyum yeteneği ve kısa meyve verme süresi nedeniyle tercih edilmiştir. Saksılara dikilecek çilek fideleri, yaklaşık 10 cm uzunluğunda köklere ve 2–3 yaprağa sahip olacak şekilde budanmış köksüz (bare-root) fide formunda temin edilmiştir (Şekil 28).

Marul (*Lactuca sativa* L.), Asteraceae (papatyagiller) familyasına ait tek yıllık bir bitkidir (Şekil 29). Bu özel çeşit, yıl boyunca yetiştirilebilme özelliği ve kısa hasat süresi nedeniyle seçilmiştir. İlk aşamada marul tohumları tüplerde çimlendirilmekte, fideler 2–3 yaprak oluşturduğunda saksılara aktarılmaktadır. Bitkinin gelişim süreci boyunca ilgili ölçümler yapılmaktadır.



Şekil 28. Çilek (*Fragaria* × *ananassa*) ve çilek fideleri



Şekil 29. Marul (*Lactuca sativa L.*)

Interreg Co-funded by the European Union NEXT Black Sea Basin | MACRO CLEAN

V.I. SEBZE PERFORMANSI

Makroalg bazlı gübrelerle yetiştirilen sebzelerin performansı birkaç temel parametre üzerinden değerlendirilmektedir. Öncelikle, ürünlerin büyüme, verim ve kalite özellikleri ölçülerek geleneksel gübrelerle yetiştirilen sebzelerle karşılaştırılır. Bu sayede, makroalg bazlı gübrelerin bitki gelişimini desteklemedeki etkinliği belirlenir. Ayrıca, hasat edilen sebzelerin besin içeriği analiz edilerek bitkilerin bu organik gübrelerden besin alımındaki verimliliği ortaya konur. Son olarak, makroalg bazlı gübrelerin uygulanmasından kaynaklanabilecek olası kirleticileri veya kalıntıları tespit etmek amacıyla kalıntı analizi yapılır.

V.II. BİTKİ ANALİZİ

Çalışma, çilek ve marul bitkilerinde büyüme, besin alımı ve kalıntı düzeylerine ilişkin ayrıntılı analizleri içermektedir.

a. Ürün Büyümesi ve Verimi: Büyüme ve verimi değerlendirmek için her uygulama grubundan en az beş örnek üzerinde çeşitli ölçüm ve gözlemler yapılmaktadır. Bunlar; bitki boyu (toprak üstü), yaprak genişliği ve uzunluğu, çiçek sayısı (çilek için), meyve sayısı (çilek için), bitki gövdesi ve yaprak rengi, kökler dahil toplam bitki uzunluğu, topraktan çıkarıldıktan sonraki bitki ağırlığı ile renk, tat ve koku gibi duyusal değerlendirmeleri kapsamaktadır. Marul için ayrıca çap ölçümleri de yapılmaktadır.

b. Besin Alımı: Besin analizi, büyümenin orta döneminde yaprak örnekleri alınarak gerçekleştirilmektedir. Analiz edilen elementler şunlardır: Azot (N), Fosfor (P), Potasyum (K), Kalsiyum (Ca), Magnezyum (Mg), Demir (Fe), Bakır (Cu), Manganez (Mn) ve Çinko (Zn).

Çilekte en uygun örnekleme zamanı, aktif büyüme dönemi olup çiçeklenme ve meyve verme öncesidir. Bu dönemde farklı bitkilerin çeşitli kısımlarından rastgele seçilen yaklaşık 10–15 yaprak (100–150 g) toplanmaktadır. Örnekler soğuk zincir koşullarında laboratuvara taşınmaktadır.

Marulda, yaprak örnekleri hasattan 2–4 hafta önce alınmaktadır. Yine farklı bitkilerin çeşitli bölgelerinden yaklaşık 10–15 yaprak (100–150 g) toplanmakta ve soğuk zincir koşullarında taşınmaktadır.

c. Kalıntı Analizi: Ağır metal kalıntı analizi, Cu, Hg, Zn, Fe, Ca vb. metallerin varlığını tespit etmek amacıyla yapılmaktadır.

Çilekte örnekleme, ağır metallerin en çok yapraklarda birikme olasılığının bulunduğu hasattan 3–7 gün önce gerçekleştirilmektedir. Bu dönemde rastgele seçilen yaklaşık 10–15 üst yaprak alınmakta ve buz kutuları ile koruyucu ambalaj gibi hijyenik saklama malzemeleri kullanılarak soğuk zincir koşullarında muhafaza edilmektedir.

Marulda ise örnekleme, metal alımının en yüksek seviyede olması beklenen hasattan 2–4 hafta önce yapılmaktadır. Farklı bitkilerin çeşitli kısımlarından 10–15 yaprak toplanarak toplamda yaklaşık 100–150 gram örnek elde edilmektedir. Bu örnekler de sıkı soğuk zincir ve hijyen protokolleri altında korunmaktadır.

BÖLÜM VI – TOPRAK MATERYALLERİ

Projede toprak analizi, makroalg bazlı gübrelerin uygulanmasından önce ve sonra besin içeriği ile pH değerinin incelenmesi yoluyla toprak verimliliği ve mikrobiyal aktivitenin değerlendirilmesine odaklanmaktadır. Ayrıca bu gübrelerin mikrobiyal topluluklar ve besin döngüsü üzerindeki etkileri incelenerek toprak sağlığına katkıları hakkında önemli veriler elde edilmektedir.

VI.I. TOPRAK MATERYALİ VE ANALİZİ

Deneyde kullanılacak toprak, proje kapsamında kurulan seranın çevresinden temin edilmiştir (Şekil 30). Dikimden önce, büyük parçacıkların uzaklaştırılması amacıyla toprak 1 cm gözenekli elekten geçirilerek hazırlanır. Toprak örnekleri, hem saksılara yerleştirilmeden önce hem de bitkiler büyümesini tamamladıktan sonra alınır. Benzer şekilde, sera toprağında yetiştirilen bitkiler için de dikim öncesi ve sonrası toprak analizleri yapılır.



Şekil 30. Seradaki toprak materyali

Toprak Verimliliği Değerlendirmesi: Toprak verimliliği, makroalg bazlı gübrelerin uygulanmasından önce ve sonra besin içeriği ile pH değerinin analiz edilmesiyle belirlenmektedir. Örnekler (yaklaşık 1000 gram), dikim öncesinde ve bitki gelişiminden sonra 0–20 cm derinlikten alınmaktadır. pH ölçümleri pH metre ile yapılmakta, ayrıca organik madde analiziyle toprağın besin durumu değerlendirilmektedir.

Toprak Mikrobiyal Aktivitesi: *Makroalg bazlı gübrelerin toprak mikrobiyal toplulukları ve besin döngüsü üzerindeki etkileri değerlendirilmektedir. Toplam mikrobiyal kütledeki artış, mikroorganizmaların sayısında, biyolojik aktivitelerinde veya onlar için çevresel koşulların iyileşmesinde bir artışı göstermektedir. Bu artış genellikle tarımsal verimlilik, çevre sağlığı ve ekosistem işleyişi üzerinde olumlu etkiler yaratır. Mikrobiyal aktivite analizleri, her grup için her dönemde, deney öncesinde ve sonrasında gerçekleştirilmektedir.*

VI.II. BİTKİLERİN SULANMASI

Sulama, şehir şebeke suyu kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Seranın dışında bulunan su deposunun çıkış hattına bağlı otomatik sulama sistemi, iklim koşullarına göre sulamayı sağlamaktadır. Sulama sıklığı, EC (Elektriksel İletkenlik) seviyelerine göre belirlenmektedir (Çilek: 1–2.5; Marul: 1.5–3) ve ortalama pH 6 seviyesinde tutulmaktadır.

BÖLÜM VII - GÜBRELER

Çalışma için üç farklı gübre türü hazırlanmıştır: sıvı gübre, kompost ve katı gübre. Hazırlanan gübreler, bitki örneklerine uygulanmadan önce analiz edilmiştir.

VII.I. SIVI GÜBRE

Toplanan makroalgler (*Ulva* spp.), gübre üretim çalışmalarına başlanmadan önce +40 °C'de 24 saat süreyle musluk suyunda bekletilmektedir. Makroalgler, tuzluluk seviyesi 1 PSU'nun altına düşene kadar akan musluk suyu ile yıkanır. İstenen değerlere ulaşıldığında yıkama işlemi sonlandırılır ve bir sonraki aşamaya geçilir.

Denizden çıkarılıp ön işlemden geçirilen ve 0,5–1 cm boyutlarında hazırlanan örnekler, saf su ile 1:1 oranında karıştırılarak fermantasyon tankına yerleştirilecektir (Şekil 31). Kullanılacak gübre tankı daha önce kullanılmamış olup, basit mekanizmalar (örneğin plastik kaplar) tercih edilmiştir. Bu nedenle mevcut fermantasyon tanklarında, hava girişini engellemek için kilitli mekanizma kurulması gibi küçük değişiklikler yapılacaktır.

Fermantasyon tankı içindeki sıcaklık 22–26 °C arasında tutulacak ve pH değeri 7 olmalıdır. pH ölçümü, tank üzerinde bulunan özel bir bölümden yapılacaktır. Gerekirse pH ayarı için KOH gibi bir asit eklenebilir. Hassas pH ayarlamaları için bir kimyacıya danışılabilir. Tank içindeki karıştırıcı her 15 dakikada bir 2 dakika çalışacaktır. Fermantasyon süresi 30 gün olacaktır.

Fermantasyon tamamlandıktan sonra sıvı gübre şişelere alınacak ve saf su ile 1:5 oranında (1 birim gübre, 5 birim su) seyreltilerek hazırlanacaktır. Fermantasyon sürecini durdurmak için şişelere Sodyum Metabisülfit (E223) (5,5 g/20 L) ile birlikte küf ve mantar oluşumunu önlemek amacıyla Potasyum Metabisülfit (2 g/10 L) eklenecektir. Fermantasyon tankının temizliğinde dezenfeksiyon için Potasyum Metabisülfit (20 g/10 L) ve Sitrik Asit (10 g/10 L) karışımı kullanılacaktır. Karışım fermantasyon tankına dökülecek, kapağı gazların yavaşça çıkmasına izin verecek şekilde gevşek kapatılacaktır. 30 dakika beklendikten sonra çözelti durulanmaya gerek kalmadan boşaltılacaktır.



Şekil 31. Sıvı gübre tankı

Sıvı gübre üç farklı derişimde (1 ml, 2 ml ve 3 ml) uygulanmaktadır. İlk uygulama, bitkiler saksılara veya toprağa dikildikten hemen sonra yapılır. Sonraki uygulamalar, bitkiler gelişimlerini tamamlayana kadar 15 günlük aralıklarla gerçekleştirilir. Her uygulamada sıvı gübre, belirtilen derişimlerde (1 ml, 2 ml ve 3 ml) 1 litre suya eklenerek hazırlanır ve hem saksılara hem de açık toprağa uygulanır.

VII.II. KATI GÜBRE

Denizden toplanan örnekler, ön işlem olarak nem oranının %10'un altına düşürülmesi amacıyla kurutma işlemine tabi tutulur (Şekil 32). Daha sonra öğütücüde toz haline getirilir. Elde edilen tozdan, 2,5 mm ve 3 mm çaplarında pelet formunda gübre üretilir. Hem toz gübre hem de peletler ayrı ayrı saflaştırılır.



Şekil 32. İklim kontrollü odada kurutma işlemi

Analiz tamamlandıktan sonra uygulamalar yapılır. Katı gübrede küf ve mantar oluşumunu önlemek amacıyla %95 Propiyonik Asit kullanılır. Püskürtme işleminden sonra gübre 1 gün boyunca kapalı kapta bekletilir. Ardından kapak 1 gün açık bırakılır ve gübre kullanıma hazır hale gelir. 1 kg katı gübre için 20 ml su ve 3 ml propiyonik asit karışımı kullanılmaktadır.

Katı gübre uygulaması dikimden hemen önce başlar. Yani önce gübre uygulanır, ardından bitki dikilir. Toz gübre uygulamasından sonra toprak 10 cm derinliğe kadar karıştırılır. Bitki gelişimini tamamlayana kadar gübre 15 günlük aralıklarla

uygulanır. Kontrol saksısına gübre uygulanmaz. İkinci saksıya başlangıç dozu olarak 1 g, üçüncü saksıya 3 g, dördüncü saksıya ise 5 g gübre verilir. Pelet uygulamasında toprak yüzeyden 3–5 cm derinliğe kadar karıştırılır. Pelet, tek doz halinde 1 saksıya uygulanır ve toprağa karıştırılır. Pelet için uygulama miktarı 3 g'dır. Katı gübreler doğrudan bitkinin kök bölgesine uygulanır.

VII.III. KOMPOST GÜBRE

Denizden toplanıp ön işlemden geçirilen örnekler 1–3 cm boyutlarında doğranır veya kesilir (Şekil 33) ve ardından kompost hazırlamak için "Bokashi Yöntemi" kullanılarak fermantasyon cihazına yerleştirilir (Şekil 34). Hazırlanan kompost, analizden sonra bitkilere uygulanır.

Kompostta küf ve mantar oluşumunu önlemek için %95 Propiyonik Asit kullanılır. Püskürtme yoluyla uygulandıktan sonra kompost 1 gün boyunca kapalı kapta bekletilir. Daha sonra kapak 1 gün açık bırakılarak havalandırılır ve kompost kullanıma hazır hale gelir. Kompost gübre uygulamaları, dikimden hemen sonra başlar. Bitki gelişimini tamamlayana kadar 15 günlük aralıklarla gübreleme yapılır. Kontrol saksısına gübre uygulanmaz. İkinci saksıya başlangıç dozu olarak 1 g, üçüncü saksıya 3 g, dördüncü saksıya ise 5 g gübre uygulanır.

Interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN



Şekil 33. Doğranmış makroalg örnekleri



Şekil 34. Fermantasyon cihazı

VII.IV. GÜBRE ANALİZİ

Bitki örneklerine uygulanmadan önce gübreler kapsamlı bir analizden geçirilir. Bu analiz, hem sıvı hem katı gübreler ile kompost için çeşitli parametreleri değerlendirmektedir.

Sıvı ve katı gübrelerde incelenen parametreler şunlardır: nem içeriği, yanma kaybı, pH, elektriksel iletkenlik (EC) ve azot (N), fosfor (P), potasyum (K), kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg), demir (Fe), manganez (Mn), çinko (Zn) ve bakır (Cu) gibi temel besin elementleri. Ayrıca, alginik asit, giberellik asit, sitokinin ve oksin varlığı da analiz edilmektedir.

Kompost analizinde ise nem içeriği, yanma kaybı, pH, EC ve aynı temel besin elementleri (N, P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu) incelenmektedir. Buna ek olarak, hümik asit ve fülvik asit ile birlikte alginik asit, giberellik asit, sitokinin ve oksin varlığı da değerlendirilmektedir.

VII.V. KİMYASAL GÜBRE UYGULAMASI (15N, 15P, 15K)

Makroalg bazlı gübrelerin yanı sıra, çalışma süresince her bitkiye kimyasal gübre de uygulanmaktadır. Kullanılan kimyasal gübre 15-15-15 bileşimindedir (%15 Azot, %15 Fosfor ve %15 Potasyum).

Çilek için, dikimden hemen önce saksıya veya toprağa 30 gram kimyasal gübre uygulanır. Çileklerin dikimi için toprak 10 cm derinliğe kadar kazılır. Daha sonra, çalışma tamamlanıncaya kadar her 30 günde bir 15 gram kimyasal gübre uygulanır.

Marul için, dikimden hemen sonra 25 gram kimyasal gübre verilir. Ardından marul bitkileri tam olarak gelişene kadar her 15 günde bir 15 gram gübre uygulanır.

BÖLÜM VIII – BİYOPLASTİKLER

VIII.I. EKSTRAKSİYON PROSEDÜRÜ

1–5 mm boyutlarında hazırlanan biyokütle, kaynatma balonunda saf su ile elektrikli ısıtıcı kullanılarak 30 dakika kaynatılır. Ardından, alg artığı $CaCl_2$ (0,5% A/H) çözeltisi içinde kaynatma balonunda 30 dakika pişirilir. Daha sonra, alg biyokütlesine sodyum klorür (NaCl) (%0,5 A/H) eklenir ve 60 dakika kaynatılır. Son aşamada, alg artığı Na_2CO_3 (%5 A/H) ile kuvvetli karıştırma eşliğinde 30 dakika kaynatılır. İzopropil alkol veya etil alkol eklenerek sodyum aljinat elde edilir ve 50 °C'de elektrikli etüvde 28 saat boyunca kurutulur.

VIII.II. BİYOFİLM HAZIRLIĞI

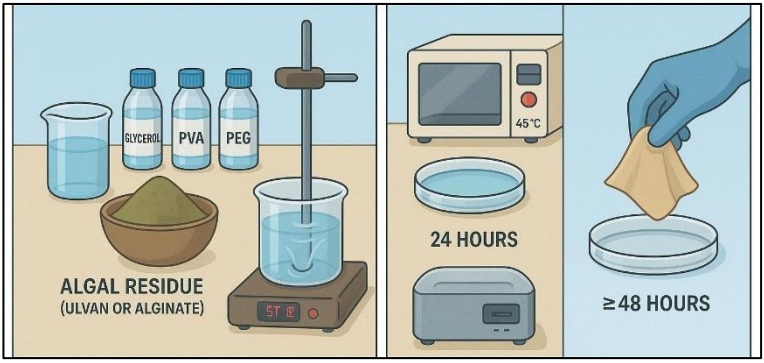
Biyofilm hazırlığı, istenen film özelliklerine bağlı olarak farklı miktarlarda alg artığının, özellikle ulvan veya aljinatın hassas şekilde ölçülmesiyle başlar. Bu biyopolimerler, temel ham madde olarak kullanılır ve homojen bir çözelti elde etmek amacıyla saf suda çözündürülür. Biyofilmlerin esnekliğini, mekanik dayanıklılığını ve genel performansını artırmak için çözeltiye belirlenen derişimlerde gliserol, polivinil alkol (PVA), polietilen glikol (PEG) veya literatürde yaygın olarak bildirilen selüloz türevleri gibi çeşitli plastikleştiriciler eklenir.

Karışım, tüm bileşenlerin tam olarak dağılmasını sağlamak ve polimer zincirlerinin kümelenmesini önlemek için manyetik ya da mekanik karıştırıcı ile sürekli olarak karıştırılır. Karıştırma işlemi, protokole bağlı olarak değişebilen ancak genellikle oda sıcaklığından orta dereceli ısıtmaya kadar değişen kontrollü sıcaklıklarda gerçekleştirilir. Bu süreç, çözeltinin tamamen çözünmesini ve homojenleşmesini kolaylaştırır.

Bu homojenleştirme aşamasının ardından, hazırlanan çözelti biyofilmin kalıbını oluşturacak şekilde temiz petri kaplarına dikkatlice dökülerek düzgün bir tabaka halinde yayılır. Petri kapları daha sonra 45 °C'de sabitlenen bir etüve yerleştirilir ve burada çözücü (su) 24 saat boyunca yavaş yavaş buharlaşır. Bu kurutma işlemi sonucunda, kapların yüzeyine yapışan ince ve homojen biyofilmler oluşur.

Filmler tamamen kuruduktan sonra, herhangi bir hasar veya yırtılmayı önlemek için petri kaplarından dikkatlice çıkarılır. Fiziksel özelliklerin stabilize edilmesi ve artık nemin uzaklaştırılması amacıyla biyofilmler, sabit sıcaklık ve bağıl nemin korunduğu kontrollü bir ortamda en az 48 saat süreyle şartlandırılır. Bu şartlandırma adımı, biyofilmlerin sonraki testler veya uygulamalar sırasında

özelliklerinin tekrarlanabilirliğini ve güvenilirliğini sağlamak açısından kritik öneme sahiptir (Şekil 35).



Şekil 35. Biyofilm hazırlığı

VIII.III. FİLMLERİN ÖZELLİKLERİ

Üretilen biyoplastiklerin karakterizasyonu ve değerlendirilmesi, fiziksel, optik, mekanik, morfolojik, termal ve biyobozunurluk özelliklerini kapsamlı bir şekilde incelemek üzere tasarlanmış bir dizi titiz test aracılığıyla gerçekleştirilecektir. Bu analizler, yalnızca deniz yosunu bazlı biyoplastiklerin genel kalite ve performansını belirlemek için değil, aynı zamanda geleneksel petrol türevi plastiklerle doğrudan karşılaştırma yapılabilmesi için de kritik öneme sahiptir. Böylece, çalışmanın amacı sürdürülebilir denizel biyokütleden biyoplastik üretiminin teknik olarak uygulanabilirliğini ve çevresel avantajlarını ortaya koymak, aynı zamanda bu biyoplastiklerin gelişmekte olan yeşil teknoloji pazarına potansiyel katkılarını vurgulamaktır.

Fiziksel Özellikler: Filmlerin yapısal bütünlüğünü ve çevresel dayanıklılığını anlamak için temel fiziksel parametreler ölçülmektedir. Kalınlık, homojenliği sağlamak amacıyla hassas mikrometreler veya kalınlık ölçerlerle değerlendirilir. Çözünürlük testleri, filmin suya ve diğer çözücülere karşı direncini inceleyerek farklı uygulamalara uygunluğunu ortaya koyar. Su buharı geçirgenliği (WVP) ve su buharı geçiş hızı (WVTR) ölçümleri, filmin nem transferine karşı bariyer özelliklerini belirlemek için yapılır; bu özellikler özellikle ambalaj uygulamaları açısından kritik öneme sahiptir. Nem içeriği analizi ise biyoplastiğin bünyesinde

tuttuğu su miktarını ölçer ve bu değer, mekanik ve bariyer özelliklerini etkileyen önemli bir parametre olarak kabul edilir.

Optik Özellikler: Filmlerin görsel kalitesi ve ışıkla etkileşim özellikleri, spektrofotometri kullanılarak ilgili dalga boylarında geçirgenlik, opaklık ve ışık geçirgenliği değerlerinin ölçülmesiyle incelenir. Bu özellikler, özellikle belirli optik berraklık veya ışık engelleme kapasitesi gerektiren gıda ambalajı ya da tarımsal filmler gibi uygulamalar açısından önemlidir.

Mekanik Özellikler: Filmlerin çekme dayanımı, kopma anındaki uzama ve Young modülü değerlerini belirlemek için üniversal test cihazı kullanılarak mekanik testler yapılır. Çekme dayanımı, biyoplastik filmin kırılmadan önce dayanabileceği maksimum gerilimi; kopma anındaki uzama, filmin esnekliğini ve sünekliğini; Young modülü ise sertlik ve elastikiyetini gösterir. Bu parametreler, biyoplastiklerin pratik uygulamalardaki dayanıklılığını ve performansını değerlendirmek açısından kritik öneme sahiptir.

Morfolojik İnceleme: Biyoplastiklerin kimyasal bileşimi ve yüzey morfolojisini araştırmak için ileri analitik teknikler kullanılmaktadır. Fourier-dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi, fonksiyonel grupları ve kimyasal bağları belirleyerek filmin moleküler yapısı ve iç etkileşimleri hakkında bilgi sağlar. Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FE-SEM), yüzey topografyası ve mikro yapısal özellikleri ayrıntılı olarak ortaya koyarken, Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) nanoskopik ölçekte yüzey pürüzlülüğü ve doku bilgisi sunar. X-ışını kırınımı (XRD) analizi ise biyoplastik materyallerin kristallik derecesi ve faz bileşimini belirlemek için yapılır; bu özellikler, malzemenin mekanik ve termal davranışlarını doğrudan etkiler.

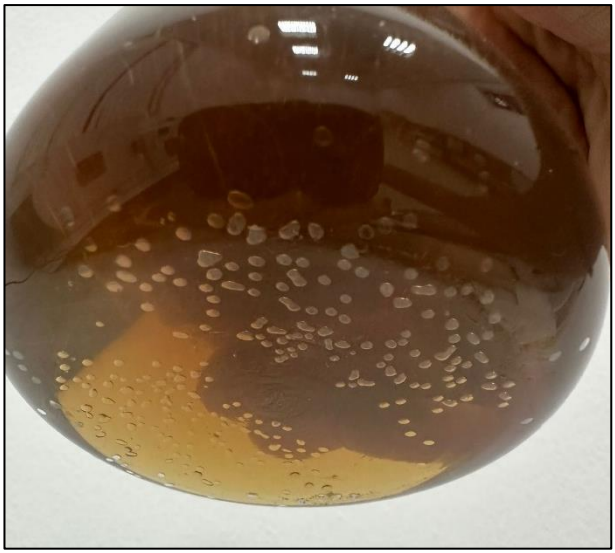
Termal Özellikler: Biyoplastiklerin termal kararlılığını ve bozunma eğilimlerini değerlendirmek için Termogravimetrik Analiz (TGA) uygulanır. Bu teknik, sıcaklığa bağlı olarak ağırlık kaybını ölçerek biyoplastiklerin bütünlüğünü koruduğu sıcaklık aralıkları ve termal bozunma süreçlerinin niteliği hakkında değerli veriler sağlar.

Biyobozunurluk: Biyoplastiklerin çevresel etkisi ve sürdürülebilirliği, doğal toprak ortamına gömülerek zaman içinde bozunma süreçlerinin izlendiği toprakta gömülme testleri ile değerlendirilmektedir. Bu test, biyoplastik materyallerin mikrobiyal aktiviteyle ne ölçüde parçalanabildiğini ve bozunma hızını ortaya koyarak, onların sentetik plastiklere çevre dostu bir alternatif olarak sınıflandırılmasını desteklemektedir.

VIII.IV. EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ

Aljinat Ekstraksiyonu

Blender ile parçalanmış alg biyokütlesi (20 g), bir beherde 200 mL saf su ile karıştırılır ve 50 °C'de 30 dakika ısıtılır. Karışım süzülür ve geriye kalan alg artığı 300 mL kalsiyum klorür çözeltisi (%0,5, a/h) ile 50 °C'de 30 dakika işleme tabi tutulur. Filtrasyondan sonra 300 mL sodyum klorür çözeltisi (%0,5, a/h) eklenir ve karışım 50 °C'de 60 dakika ısıtılır. Süspansiyon yeniden süzülür ve alg artığı 100 mL sodyum karbonat çözeltisi (%5, a/h) ile 50 °C'de kuvvetli mekanik karıştırma altında 30 dakika muamele edilir. Filtrata etil alkol eklenerek sodyum aljinat çöktürülür ve ürün 50 °C'de elektrikli etüvde 28 saat boyunca kurutulur (Şekil 36).



Şekil 36. Aljinat ekstraksiyonu

Ulvan Ekstraksiyonu için Ön İşlem

Ulvan, yeşil alglerden sıcak su ekstraksiyon yöntemi ile elde edilmektedir. Ekstraksiyon öncesinde, lipidleri, pigmentleri ve fenoller, serbest şekerler, amino asitler gibi düşük molekül ağırlıklı bileşikleri uzaklaştırmak için bir ön işlem uygulanır. Yıkanmış ve kurutulmuş, blender ile parçalanmış algler 24 saat boyunca Soxhlet ekstraktörü kullanılarak etil alkol ile muamele edilir. Üst fazlar atılır ve örnekler 40 °C'de 48 saat süreyle tekrar kurutulduktan sonra sıcak su ekstraksiyon işlemine kadar saklanır.

ARAÇLAR VE EKİPMANLAR

AAS (Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi): Metal konsantrasyonlarının analizinde kullanılır.
Analitik Terazi: Örneklerin tartılmasında kullanılır.
Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM): Biyofilmlerin yüzey özelliklerinin nanoskopik ölçekte incelenmesinde kullanılır.
Otomatik Sulama Sistemi: Bitkilere suyun düzenli verilmesini sağlar.
Emici Kağıt: Temizlenen örneklerin kurutulması ve fazla suyun alınmasında kullanılır.
Kaynatma Balonu: Alg biyokütlesinin işlem sırasında kaynatılmasında kullanılır.
Soğuk Zincir Saklama Ekipmanı: Buz kutuları ve soğutmalı araçlarla örnek bütünlüğünü korur.
Derişik HNO_3 (Nitrik Asit): Örneklerin asitlendirilmeleri, metallerin çökelmesini önleyerek bütünlüğünü korur.
Saf Su (Distile Su): Toplanan örneklerin yabancı maddelerden arındırılması için kullanılır.
EC Ölçüm Cihazları: Sulama sıklığını düzenlemek için EC seviyelerinin belirlenmesinde kullanılır.
Elektrikli Isıtıcı: Kaynatma balonuna ısı sağlamak için kullanılır.
Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM): Biyofilmlerin yüzey yapısının incelenmesinde kullanılır.
Beş Sıra Galvanizli Tel: Sera yapısının güçlendirilmesinde kullanılır.
Formaldehit-Denizsuyu Çözeltisi (2–5%): Makroalg örneklerini korur.
FTIR Spektroskopisi: Üretilen biyoplastiklerin kimyasal yapısının analizinde kullanılır.
Derin Dondurucu: Sediment örneklerinin analiz öncesi bütünlüğünü koruyarak saklanmasında kullanılır.
Galvanizli Borular: Sera ana taşıyıcı sistemi ve çerçevesinin inşasında, rüzgara dayanıklılık için kullanılır.
Sera: Bitkilerin dış iklim koşullarından korunarak kontrollü ortamda yetiştirilmesinde kullanılır.
ICP-MS (İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi): Metal konsantrasyonlarının analizinde kullanılır.
İzopropil Alkol veya Etil Alkol: Alg artıklarından sodyum aljinat elde etmek için kullanılır.
Kapılar İçin Metal Profiller: Seranın kapı çerçevelerinin yapılmasında kullanılır.
Mikroskop: Makroalg türlerinin mikroskobik inceleme ile belirlenmesinde kullanılır.
Mikrodalga Parçalama Ünitesi: Organik materyali parçalamak ve metalleri açığa çıkarmak için örneklerin ısı ve basınca tabi tutulmasında kullanılır.
Havan ve Tokmak: Kurutulmuş makroalg örneklerinin ince toz haline getirilmesinde kullanılır.
Motorlu Elek Cihazı: Kurutulmuş sediment örneklerinin elenmesinde kullanılır.
Multiparametre Cihazı: pH, sıcaklık, tuzluluk ve çözünmüş oksijen gibi in-situ fiziksel parametrelerin ölçülmesinde kullanılır.
Etüv: Örneklerin kurutulmasında kullanılır.

Interreg Co-funded by the European Union NEXT Black Sea Basin MACRO CLEAN

Petri Kapları: Alg artığı ve plastikleştirici çözeltilerinin yayılıp biyofilm hazırlanmasında kullanılır.
pH Metre: pH seviyesini ölçmek için kullanılır.
Plastik Torbalar: Toplanan örneklerin taşınması sırasında geçici olarak saklanmasında kullanılır.
Sera Örtüsü (Sera Filmi): Seradaki bitkilerin UV ışınlarından ve çevresel faktörlerden korunmasında kullanılır.
Plastik Kaplar: Örneklerin transferinde ve korunmasında kullanılır.
Plastikleştiriciler (Gliserol, Polivinil Alkol, Polietilen Glikol, Selüloz): Alg artıklarından biyofilm ve biyoplastik üretiminde kullanılır.
Saksılar: Bitkilerin serada yetiştirilmesinde kullanılır.
Kare Çerçeve (Quadrate): Makroalg örnekleme alanının belirlenmesinde kullanılır.
Örnek Toplama ve Taşıma Kapları: Örneklerin uygun koşullarda saklanması ve taşınmasında kullanılır.
SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu): Biyoplastiklerin yüzey morfolojisinin incelenmesinde kullanılır.
Kapalı Kaplar: Asitlendirilen denizsuyu örneklerinin laboratuvara taşınmasında kullanılır.
Deniz Suyu Toplama Kapları: Denizsuyu örneklerinin toplanmasında kullanılır.
Fide/Tohumlar: Dikim için kullanılır.
Duyusal Değerlendirme Araçları: Sebzelerin renk, tat ve koku değerlendirmelerinde kullanılır.
Sürgülü Kapılar: Sera giriş-çıkışını kolaylaştırmak ve havalandırmayı sağlamak için kullanılır.
Sodyum Klorür (%0,5 A/H): Alg biyokütlesinin biyofilm ve biyoplastik üretiminde işlenmesinde kullanılır.
Toprak Örnekleme Araçları: Dikim öncesi ve sonrası toprak örneklerinin alınmasında kullanılır.
Toprak Eleme Ekipmanı: Dikim öncesi toprağın hazırlanmasında, iri parçacıkların uzaklaştırılmasında kullanılır.
Toprak: Bitkilerin yetişmesi için kullanılır.
Toprakta Gömülme Testi: Biyoplastiklerin biyobozunurluğunun değerlendirilmesinde kullanılır.
Spatül: Makroalglerin substrattan manuel toplanmasında kullanılır.
Termogravimetrik Analiz Cihazı (TGA): Üretilen biyoplastiklerin termal dayanıklılığının incelenmesinde kullanılır.
Dikey Destek Boruları ve Çapraz Bağlantı Boruları: Seranın yapısal dayanıklılığının artırılmasında kullanılır.
Su Deposu ve Çıkış Hattı: Sulama için su kaynağıdır, sera dışındadır ve sulama sistemine bağlıdır.
Teraziler: Bitkilerin topraktan çıkarıldıktan sonraki ağırlıklarının ölçülmesinde kullanılır.
X-Işını Kırınımı (XRD) Analizi: Biyofilmlerin kristallik yapısı ve moleküler yapısının belirlenmesinde kullanılır.

interreg Co-funded by the European Union
NEXT Black Sea Basin
MACRO CLEAN

KAYNAKLAR

Bouiadjra, B. B., Ghellai, M., Daoudi, M., Behmene, I. E., & Bouiadjra, M. E. A. B. (2021). Impacts of the invasive species *Caulerpa cylindracea* Sonder, 1845 on the algae flora of the west coast of Algeria. *Biodiversity Data Journal, 9*, e63617. https://doi.org/10.3897/BDJ.9.e63617

ÇŞB-ÇEDİDGM & TÜBİTAK-MAM. (2017). *Sea Monitoring Guidelines*, Gebze-Kocaeli.

Fernández-Aláez, C., & Fernández-Aláez, M. (2011). Seasonal changes in tissue nutrient concentrations of macroalgae and aquatic angiosperms in Mediterranean ponds (North-Western Spain). *Fundamental and Applied Limnology, 179*(3), 179-192. https://doi.org/10.1127/1863-9135/2011/0179-0179

Setthamongkol, P., Tunkijjanukij, S., Satapornvanit, K., & Salaenoi, J. (2015). Growth and nutrient analysis in marine macroalgae. *Agriculture and Natural Resources, 49*(2), 211-218. https://doi.org/10.1016/j.anres.2015.06.006

Srijaya, T. C., Pradeep, P. J., & Chatterji, A. (2010). Effect of seaweed extract as an organic fertilizer on the growth enhancement of black mustard plant. *Journal of Coastal Research, 1*, 137-150. https://doi.org/10.2112/JCR-SI1-137-150

MEASUREMENT AND RESEARCH METHODOLOGY GUIDE

Seawater, Sediment and Macroalgae Sampling: Advanced Applications in Fertilizer and Bioplastic Production

Activity 1.1. & A.1.2
Establishing Research Team and Research Methodology I and II

Project Coordinator
Prof. Dr. Levent BAT
Sinop University /Türkiye
Fisheries Faculty
Telephone: +90 368 287 62 62
Email: leventb@sinop.edu.tr

Communication Manager
Dr. Elif ARICI
E-mail: earici@sinop.edu.tr
Telephone: +90 368 287 62 65 - 3418

Project website: https://www.macroclean.org/

For bibliographic purposes this document should be cited as:

Seawater, Sediment and Macroalgae Sampling: Advanced Applications in Fertilizer and Bioplastic Production. BSB00584 MACRO CLEAN Project.

Corresponding authors:

leventb@sinop.edu.tr[1]& earici@sinop.edu.tr[2]

Disclaimer*: This document has been prepared through the collaboration of the partners of the BSB00584 MACRO CLEAN Project, implemented under the Interreg Next Black Sea Basin Programme. It represents an informal consensus on best practices agreed upon by all partners.*

EXECUTIVE SUMMARY

The MACRO CLEAN (*Research, Cleaning Methodologies, Economic Valorization and Pilot Application for Macroalgal Blooms*) Project, implemented under the Interreg NEXT Black Sea Basin Programme (BSB00584), is a collaborative initiative involving Sinop University (SNU) and Marmara Municipalities Union (MMU) from Türkiye, Batumi State University (BSU) from Georgia, and Shumen University (ShU) from Bulgaria. The project focuses on the economic utilization of macroalgae through research and pilot implementations, while also aiming to prevent and mitigate the impacts of human activities contributing to eutrophication and macroalgae blooms in the Black Sea region.

The main objective of the project is to develop a comprehensive research methodology for macroalgae studies, enhance laboratory capacities, prepare feasibility plans for macroalgae-based applications, raise awareness among stakeholders, and foster collaboration on innovative cleaning technologies. By addressing the regional challenges of eutrophication and algal blooms -largely caused by land-based pollution and changes in marine ecosystems-the project promotes sustainable resource management and seeks to create lasting positive impacts.

This guide outlines the methodology collaboratively developed by Activity 1.1 and Activity 1.2 for sampling macroalgae, seawater, and sediments, as well as for utilizing macroalgae in fertilizer and bioplastic applications. Through stakeholder engagement and the development of a harmonized methodology, A.1.1. and A.1.2 has produced a set of practical guidelines designed to assist policymakers, researchers, and environmental organizations in monitoring and implementing these activities effectively.

While this document reflects the collective efforts and informal consensus of all contributing partners, it does not necessarily represent the official views of the Interreg NEXT Programme.

Prof. Dr. Levent BAT
Project Coordinator
May, 2025

CONTENT

EXECUTIVE SUMMARY 3
INTRODUCTION 5
ACRONYMS 6
PART I – FIELD STUDIES 8
I.I. MACROALGAE BIOMASS SURVEY AND SAMPLING TECHNIQUES 8
I.II. SELECTION OF SAMPLING AREAS FOR MACROALGAE RESEARCH 13
I.III. THE LOCATION OF THE PLANNED STATIONS 14
PART II - SAMPLING TECHNIQUES 16
II.I. MACROALGAE SAMPLING 16
II.II. SEAWATER SAMPLING 17
II.III. SEDIMENT SAMPLING 18
PART III – ANALYTICAL TECHNIQUES 19
III.I. METAL ANALYSIS OF MACROALGAE 19
III.II. METAL ANALYSIS OF SEAWATER 19
III.III. METAL ANALYSIS OF SEDIMENT 21
PART IV- GREENHOUSE 22
IV.I. CONSTRUCTION OF GREENHOUSE 22
IV.II. PLANTS IN GREENHOUSE 23
IV.III. PLANT GROWTH TRIALS 25
PART V- PLANT MATERIALS 26
V.I. VEGETABLE PERFORMANCE 27
V.II. PLANT ANALYSES 27
PART VI- SOIL MATERIALS 29
VI.I. SOIL MATERIAL & ANALYSIS 29
VI.II. IRRIGATION OF PLANTS 29
PART VII- FERTILIZERS 30
VII.I. LIQUID FERTILIZER 30
VII.II. SOLID FERTILIZER 31
VII.III. COMPOST FERTILIZER 33
VII.IV. FERTILIZERS ANALYSIS 34
VII.V. CHEMICAL FERTILIZER APPLICATION (15N, 15P, 15K) 34
PART VIII- BIOPLASTICS 35
VIII.I. EXTRACTION PROCEDURE 35
VIII.II. BIOFILM PREPARATION 35
VIII.III. CHARACTERISTICS OF THE FILMS 36
TOOLS & EQUIPMENT 39
REFERENCES 41

INTRODUCTION

Rationale

The MACRO CLEAN Project was initiated to address pressing environmental challenges through the collaborative efforts of partners from three Black Sea Basin countries: Türkiye, Georgia, and Bulgaria. This project establishes a comprehensive framework for research and pilot applications focused on the sustainable and effective collection, evaluation, and economic valorization of macroalgae, targeting their use as fertilizers and bioplastics.

To this end, a jointly developed methodology provides clear guidelines for sampling macroalgae, seawater, and sediments, as well as for their utilization in various economic sectors. This guide presents an integrated research methodology encompassing four main components: field studies, sampling techniques, analytical procedures, and applied research.

Moreover, it highlights practical applications and innovative approaches to macroalgae utilization, illustrated through case studies and pilot projects related to fertilizers and bioplastics. By ensuring methodological consistency and enhancing data quality, these components aim to facilitate knowledge sharing among researchers, institutions, and stakeholders committed to promoting the sustainable use of marine resources within the Black Sea region and beyond.

Acknowledgment

We hereby extend our sincere appreciation to all individuals who contributed to the preparation of this methodology guide. We are particularly indebted to Prof. Dr. Rıza BAYRAK, Assoc. Prof. Dr. Ömer ELKIRAN, Assoc. Prof. Dr. Dilara KAYA ÖZTÜRK, Asst. Prof. Dr. Ayşah ÖZTEKİN, Asst. Prof. Dr. Orçin UYGUN, Dr. Gökhan YILDIZ, and Agric. Eng. Akın USTAOĞLU for their guidance, expertise, and constructive recommendations throughout the various stages of this study. Their unwavering support and scholarly contributions have played a significant role in enhancing the overall quality and rigor of this publication.

Important Notice: *The responsibility for the content of this material is that of the author(s). The content of this material does not necessarily represent the official position of the European Union. Reproduction is authorized, provided the source is acknowledged, and any changes are indicated.*

ACRONYMS

AAS	Atomic Absorption Spectroscopy
AFM	Atomic Force Microscopy
Al	Aluminum
Ca	Calcium
$CaCl_2$	Calcium Chloride
Co	Cobalt
Cr	Chromium
Cu	Copper
DO	Dissolved Oxygen
E223	Sodium Metabisulfite
EC	Electrical Conductivity
EVA	Ethylene-Vinyl Acetate
Fe	Iron
FTIR	Fourier-Transform Infrared
HCl	Hydrochloric Acid
Hg	Mercury
HNO_3	Nitric Acid
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
IR	Infrared
K	Potassium
KOH	Potassium Hydroxide
Mg	Magnesium
Mn	Manganese
N	Nitrogen
Na	Sodium
Na_2CO_3	Sodium Carbonate
Ni	Nickel
P	Phosphorus
ppm	Parts per million
Sb	Antimony
Se	Selenium
SEM	Scanning Electron Microscope
Sn	Tin
TGA	Thermogravimetric Analysis
UV	Ultraviolet
W/V	Weight/Volume
XRD	X-ray Diffraction
Zn	Zinc

PART I – FIELD STUDIES

I.I. MACROALGAE BIOMASS SURVEY AND SAMPLING TECHNIQUES

A macroalgae biomass survey is conducted at coastal water points, with sampling carried out at a minimum of three different locations within an area of approximately 15x15 meters and at a depth of 0–1 meter to ensure the representation of the region (Figure 1 and 2).



Figure 1. Biomass survey



Figure 2. Macroalgae sampling

To collect the samples, a 20 × 20 cm quadrat (400 cm^2) is used as described in the methodology (Bouiadjra et al. 2021) (Figure 3a). The samples are manually gathered using a spatula, initially placed in plastic bags, and then transferred to plastic jars filled with seawater (Figure 3b). To preserve the samples, a formaldehyde–seawater solution is added at a concentration of 2–5% (ÇŞB-ÇEDİDGM and TÜBİTAK-MAM, 2017) (Figure 3c).

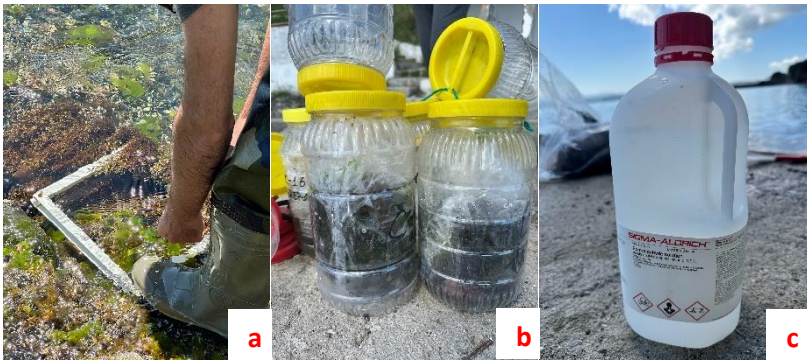


Figure 3. (a) quadrate, (b) plastic jars and (c) formaldehyde

Once in the laboratory, the samples are cleaned to remove any foreign materials such as stones, sand, or epiphytes by rinsing them with distilled water (Figure 4). The cleaned samples are then placed on blotting paper to remove excess water (Figure 5) and subsequently dried in an oven at 60 °C for 48 hours (Srijaya et al. 2010; Fernández-Aláez & Fernández-Aláez 2011; Setthamongkol et al. 2015) (Figure 6). After drying, the macroalgae are weighed, and taxonomic identification is performed, using microscopic examination when necessary, on specimens separated from foreign materials.

For macroalgae intended for chemical analysis, separate collections are made apart from the biomass samples. These samples are briefly rinsed in deionized water, cleaned of macroscopic epizoa and epiphytes, and then dried in a laboratory oven at 60 °C for 48 hours. The dried material is subsequently ground into a fine powder using a mortar and pestle (Figure 7). This process ensures that the macroalgae samples are accurately prepared for both biomass quantification and detailed chemical analysis.



Figure 4. Cleaning and species identification



Figure 5. Removal of excess water from samples on paper



Figure 6. Drying the samples in an oven



Figure 7. Powdered samples

Biomass measurements of the identified algal samples are carried out using an analytical balance with a sensitivity of 0.0001 g. Quantitative samples of macroalgae are converted into biomass per unit area (g dry weight/m^2). To better understand the seasonal distribution patterns of benthic algal communities along the coastline, the mean values of the macroalgal species

data are subjected to statistical analysis. Additionally, in situ measurements of environmental parameters such as pH, temperature, salinity, and dissolved oxygen will be conducted using a multiparameter device (Figure 8).

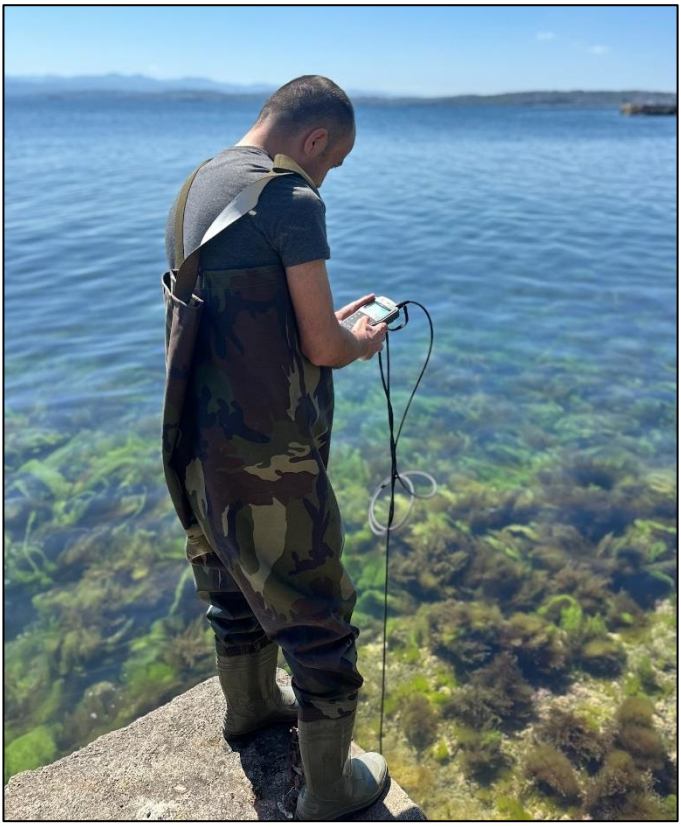


Figure 8. *In-situ measurement of physical parameters*

I.II. SELECTION OF SAMPLING AREAS FOR MACROALGAE RESEARCH

Stations are selected based on the following criteria:

a. Coastal Characteristics: Diverse substrate types, such as sandy, rocky, and muddy environments, are targeted for sampling. These varied substrates play a significant role in the distribution and growth of macroalgae.

b. Proximity to Human Activities: Areas with high anthropogenic influence (e.g., agricultural runoff, urban wastewater discharges) and less impacted, relatively pristine areas are selected. This contrast allows for the evaluation of human-induced effects. In order to understand the full scope of the environmental impact on macroalgal growth and coastal ecosystems, it is crucial to select both areas with high anthropogenic influence and those that remain relatively undisturbed. Areas affected by agricultural runoff and urban wastewater discharges often experience elevated nutrient levels, such as nitrogen and phosphorus, which contribute to eutrophication and macroalgal blooms. These areas offer valuable insights into the direct consequences of human activities on marine ecosystems. In contrast, less impacted and relatively pristine areas serve as reference sites where natural processes dominate, providing a baseline for comparison. By contrasting these two types of environments, it becomes possible to evaluate the extent of human-induced changes and to assess the effectiveness of management strategies aimed at mitigating environmental degradation. This dual approach enhances the understanding of the ecological consequences of human activities and aids in the development of more sustainable coastal management practices.

c. Accessibility and Sampling Feasibility*:* Locations are easily accessible throughout the year and suitable for repeated seasonal sampling efforts to ensure consistent monitoring and data collection.

d. Representativeness*:* The selected stations accurately reflect the general ecological status of the coastline. They are suitable for long-term monitoring, enabling continuous or repeated data collection over extended periods. This long-term approach is essential for tracking changes in the ecosystem, identifying trends over time, and evaluating the effectiveness of management or conservation efforts.

***e. Spatial Variability**:* Stations are distributed at sufficient distances to capture spatial heterogeneity. This helps analyze variability across different regions and environmental gradients.

f. Resource Potential: Areas with macroalgal diversity and biomass are prioritized. Specifically, regions with species suitable for fertilizer and bioplastic production are preferred.

I.III. THE LOCATION OF THE PLANNED STATIONS

This study is designed to investigate the origins and dynamics of macroalgal overgrowth and eutrophication in the region, with a focus on identifying the environmental and anthropogenic factors that contribute to these phenomena.

A key objective of the study is to support the sustainable utilization of macroalgae through applications such as fertilizer and bioplastic production. The research specifically concentrates on the dominant macroalgal species in the region, particularly Ulva spp. and Cystoseira sp. (Figures 9 and 10). These species are sampled to assess various factors, including the density and seasonal growth patterns of macrobenthic algae, as well as the nutrient composition of macroalgae, seawater, and sediment.



Figure 9. *Ulva* sp.



Figure 10. *Cystoseira* sp.

According to the study design, sampling regions were selected based on specific criteria (Figure 11). In Sinop province (Türkiye), the selected regions include Inceburun, Hamsilos, Akliman, Outer Port (Dış Liman), Karakum, Inner Port (İç Liman), Mobil, and Gerze. In Bulgaria, sampling sites are located south of Cape Emine and include the following bays: Burgas Bay, Chengene Skele Bay, Maslen Nos Bay, Petrol Harbor Bay, Sozopol and/or Bamboo Bays and Harmoni Bay. In Georgia, sampling sites will be determined along the Georgian sector of the Black Sea.

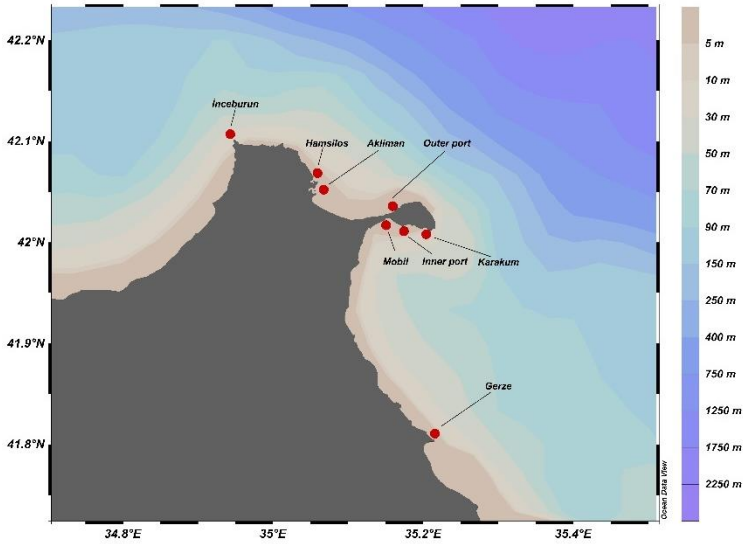


Figure 11. Sampling stations in Sinop Province

PART II - SAMPLING TECHNIQUES

Macroalgae, Seawater & Sediment

II.I. MACROALGAE SAMPLING

Macroalgae samples are collected seasonally from various locations along the coastline to ensure they represent the entire area being studied. The collected samples are carefully labeled and placed in polyethylene bags for transport. To preserve the samples for subsequent metal analysis, 1 ml of concentrated nitric acid (HNO_3) is added to each sample to prevent metal precipitation and maintain the solubility of trace elements. The samples are then stored at -20°C until they are ready for analysis. This method ensures the integrity of the samples, safeguarding them from degradation and contamination before they are processed in the laboratory for metal analysis (Figure 12).

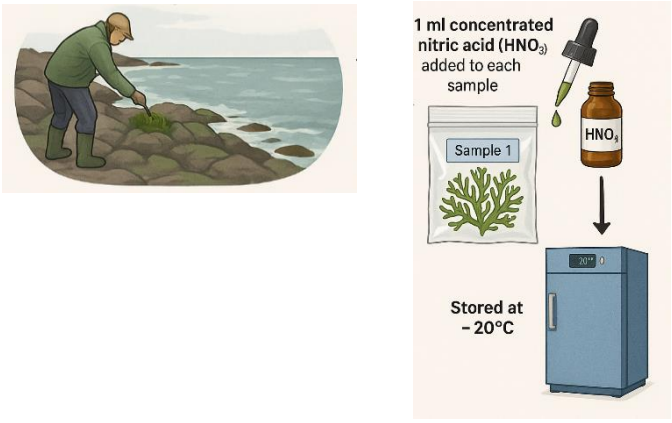


Figure 12. Illustration of macroalgae sampling

II.II. SEAWATER SAMPLING

Seawater samples are collected from locations where macroalgae are present. These locations are selected to better understand the correlation of metal translocation between seawater and the macroalgae. In addition to sample collection, real-time in situ measurements of key physical parameters, such as temperature, salinity, and pH, are recorded using a multiparameter probe. This provides a comprehensive understanding of the environmental conditions at the time of sampling.

The collected seawater samples are transferred into 250 cc polyethylene containers, which are carefully sealed with stoppers to prevent the loss of volatile substances during transportation and storage. To preserve the samples for subsequent metal analysis, 1 ml of concentrated HNO_3 is added to each container. The sealed containers are stored at room temperature, away from direct sunlight and heat sources, to maintain the stability of the samples until they are ready for laboratory analysis.

The samples are analyzed for metal concentrations, providing precise and accurate measurements of trace metal elements. This comprehensive approach offers insights into the levels of metal contamination in the seawater and its potential effects on the surrounding macroalgal communities (Figure 13).

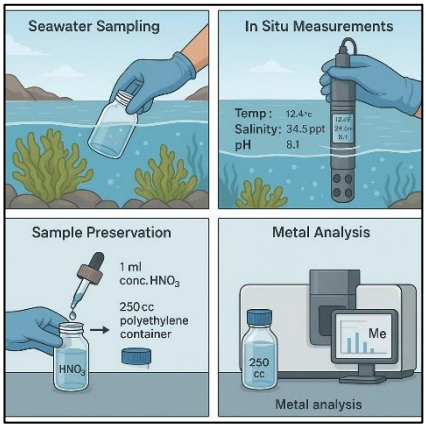


Figure 13. Illustration of seawater sampling

II.III. SEDIMENT SAMPLING

Sediment samples are collected from stations with varying ground structures, using a sediment-core or shovel (Figure 14). Samples are collected from the top 0-5 cm of the sediment surface to study environmental interactions. Once collected, the samples are carefully labeled for identification and stored in a deep freezer at -20°C to preserve their integrity until further analysis.

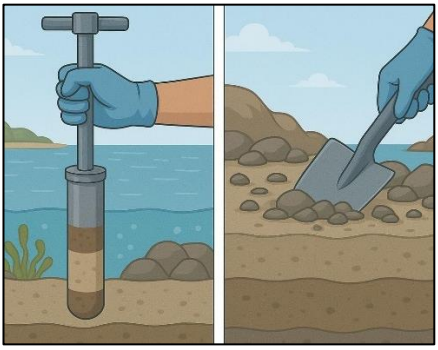


Figure 14. Sediment-core and shovel for sediment sampling

To ensure the accuracy and sensitivity of metal analyses, the sediment samples are preserved in an acidic environment. A small amount (1-2 ml) of concentrated HNO_3 is added to each sample to prevent the precipitation of metals and maintain their solubility. This step is crucial for accurate measurement of trace metals, especially when dealing with complex sediment matrices. Once treated with acid, the samples are stored at low temperatures, typically around 4°C, until they are ready for transportation to the laboratory for further processing.

Upon arrival at the laboratory, the sediment samples are dissolved using acidic solvents, such as concentrated HNO_3 or HCl, in order to break down the sediment and release the metals contained within. This process ensures that the metal content is fully extracted for analysis. The dissolved samples are then analyzed for trace metal concentrations. The analysis is conducted using either an Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer (ICP-MS) or Atomic Absorption Spectroscopy (AAS), both of which are highly effective techniques for detecting and quantifying trace metals in environmental samples.

PART III- ANALYTICAL TECHNIQUES

III.I. METAL ANALYSIS OF MACROALGAE

The process of metal analysis in macroalgae begins with the collection of samples from selected locations where macroalgae are abundant. Once collected, the macroalgae samples are carefully cleaned to remove seawater, debris, and any other contaminants that could interfere with the analysis. This cleaning process is critical to ensure that no external materials influence the results.

After cleaning, the macroalgae are dried in an oven. This drying process removes the moisture content. Once the algae are fully dried, they are ground into a fine powder. Typically, 0.5 to 1 gram of the dried and ground macroalgae is used for the metal analysis.

The ground seaweed is then subjected to an acidic digestion process. The sample is dissolved in concentrated HNO_3 or HCl to break down the organic material and release the metals contained within. After digestion, the solution is filtered to remove any solid residues that may remain.

The filtered solution is then diluted to the appropriate concentration and prepared for metal analysis. If the macroalgae samples need to be stored before analysis, they are kept in an acidified solution and refrigerated at 4°C to maintain their integrity until they are ready for testing.

III.II. METAL ANALYSIS OF SEAWATER

The metal analysis of seawater begins by collecting seawater samples from selected locations, particularly where macroalgae are found. Seawater samples are collected in 250 cc containers that are sealed to avoid contamination or loss of volatile substances during transportation. Once collected, the seawater samples are stored at room temperature, away from direct sunlight and heat, to preserve their integrity until they are ready for analysis. For metal analysis, 1 ml of concentrated HNO_3 is added to each sample to prevent precipitation of metals and ensure that the sample remains in a dissolved state (Figure 15). The acidified samples are stored in a sealed container until they are transported to the laboratory for further analysis. In the laboratory, the seawater samples are analyzed for trace metal concentrations.



Figure 15. Addition of concentrated HNO_3 to the seawater samples

III.III. METAL ANALYSIS OF SEDIMENT

Sediment samples taken from the area where macroalgae are collected are taken from the top 0-5 cm layer of the sediment surface. Once collected, 1-2 ml of nitric acid is added to the samples, and they are labeled and stored at -20°C to preserve their integrity until further analysis.

Before metal analysis, sediment samples are removed from the freezer and the moisture is removed using blotting paper. They are then dried in an oven at 105°C for 24 hours. After drying, the sediment samples are passed through a motorized sieve shaker with varying mesh sizes, and particles with a size of 63 µm or smaller are used for determining element concentrations (Figure 16).

The small-sized samples designated for metal analysis are then combusted in a microwave digestion unit, after which they are analyzed using ICP-MS or AAS devices (Figure 17).



Figure 16. Sieving of dried sediment samples using a motorized sieve shaker

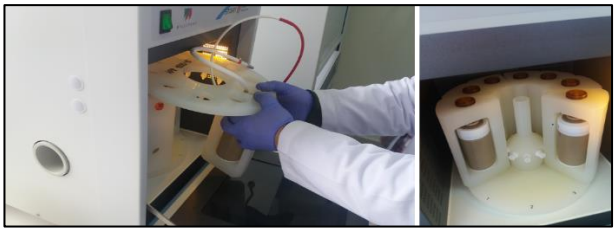


Figure 17. Microwave digestion unit

PART IV- GREENHOUSE

IV.I. CONSTRUCTION OF GREENHOUSE

The greenhouse is designed to be a minimum of 50 square meters (5.5 m x 9.09 m) and is enclosed (Figure 18 and Figure 19). The greenhouse dimensions are 5.5 m x 9.09 m, with a total area of 50 m^2. The minimum height at the center is 270 cm. It features two sliding doors, each with a minimum width of 1 meter, equipped with ventilation grilles (fitted with fly screens, openable and closable, metal, minimum size 45x45 cm).



Figure 18. Visual representation of the greenhouse to be used in the study



Figure 19. Greenhouse installation

The greenhouse structure is constructed using galvanized pipes. The main support poles, which are driven into the ground at each spring connection point, are made of 40 mm galvanized pipe, while the arch poles are made of 32 mm galvanized pipe. Ground connections are spaced appropriately to ensure wind resistance.

Along the side and top surfaces of the greenhouse, three rows of 32 mm galvanized pipe and five rows of evenly spaced galvanized wire (minimum 2 mm thickness) are installed, as shown in the illustration.

The greenhouse has two doors (front and rear), made of metal profiles and covered with nylon sheeting. To increase structural stability, two vertical support pipes and scissor-type cross-braced pipes connected to a horizontal top pipe are used. The greenhouse covering is laid and anchored securely to prevent wind damage, with the edges buried in the soil. The galvanized pipes have a wall thickness of no less than 2.5 mm.

The plastic covering (greenhouse film) is a 36-month durable polyethylene material with UV, IR, EVA, AO, AV, and diffusion-resistant properties.

IV.II. PLANTS IN GREENHOUSE

Plants are cultivated in both pots and directly in soil inside the greenhouse. After the completion of the first and second trial periods, the pots are relocated to the soil area within the greenhouse. This strategy allows for more efficient use of the greenhouse space (Figure 20 and Figure 21). Analyzed soil is placed into the pots before planting.

The study aims to apply liquid fertilizer, solid fertilizer (in both powder and pellet forms), and compost at three different concentrations: 1 g, 3 g, 5 g (for solids) and 1 ml, 3 ml, 5 ml (for liquids).

In addition, 2 pots are used for chemical fertilizer, and 2 pots serve as control in each trial period. Therefore, a total of 14 pots are required per plant species for each period.

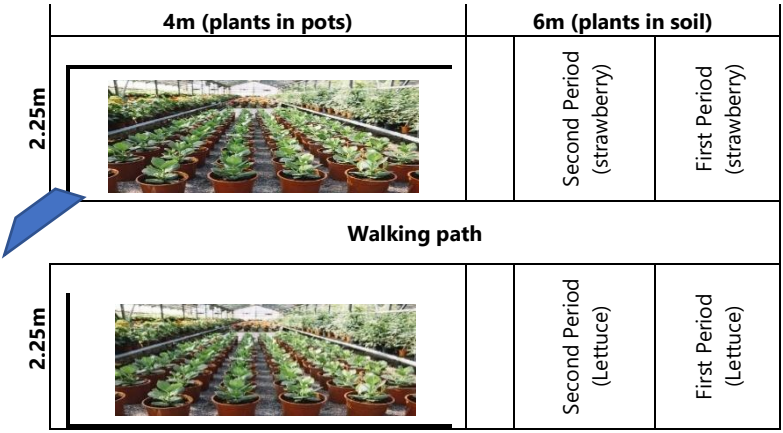


Figure 20. The layout plans of the pots and plants in the greenhouse (First and second periods)

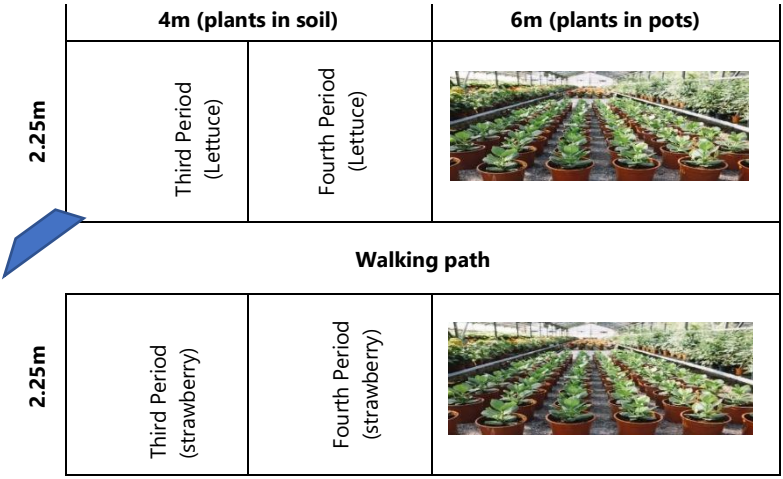


Figure 21. The layout plans of the pots and plants in the greenhouse (Third and fourth periods)

Pot Allocation per Plant (per Trial Period)

- Liquid Fertilizer: 3 pots (1 ml, 3 ml, 5 ml)
- Solid Fertilizer (Powder): 3 pots (1 g, 3 g, 5 g)
- Solid Fertilizer (Pellet): 1 pot (3 g)
- Compost: 3 pots (1 g, 3 g, 5 g)
- Control and Chemical Fertilizer: 4 pots
- Total: 14 pots per plant species per period

IV.III. PLANT GROWTH TRIALS

Plant growth trials are carried out in two stages: pot trials and greenhouse trials. In the pot trials, controlled experiments are conducted using potted plants to examine the effects of macroalgae-based fertilizers on plant growth, yield, and nutrient uptake. These trials provide detailed insights under standardized conditions. In the greenhouse trials, semi-field experiments are performed under more natural conditions, allowing for the evaluation of fertilizer performance on a larger scale.

The pot is of the villa type and rectangular in shape, with a minimum capacity of 62 liters (dimensions: 38 x 86 x 30 cm). The material is UV-resistant and suitable for outdoor use. Each pot has a drainage hole and a base at the bottom.

PART V - PLANT MATERIALS

The study uses strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) and lettuce (*Lactuca sativa L.*) as plant materials.

Strawberry is a widely cultivated hybrid species from the Fragaria genus in the Rosaceae family, grown globally for its fruit. The selected variety is chosen for its broad ecological adaptability and short fruiting period. Strawberry seedlings to be planted in pots are supplied as bare-root plants, pruned to have two or three leaves and root lengths of approximately 10 cm (Figure 22).



Figure 22. Strawberry (*Fragaria x ananassa*) and strawberry seedlings

Lettuce (*Lactuca sativa L.*) is an annual plant belonging to the Asteraceae family (Figure 23). This particular variety is selected for its ability to grow year-round and its short harvest cycle. Initially, lettuce seeds are germinated in vials. Once the seedlings develop 2–3 leaves, they are transplanted into pots. Relevant measurements are carried out during the plant's growth period.



Figure 23. Lettuce (*Lactuca sativa L.*)

V.I. VEGETABLE PERFORMANCE

The performance of vegetables grown with macroalgae-based fertilizers is evaluated through several key parameters. First, crop growth, yield, and quality attributes are measured and compared to those of vegetables grown with conventional fertilizers. This helps determine the effectiveness of macroalgae-based fertilizers in supporting plant development. Additionally, the nutrient content of the harvested vegetables is analyzed to assess how efficiently plants can uptake nutrients from these organic fertilizers. Finally, residue analysis is conducted to detect any potential contaminants or residues in the vegetables that may result from the application of macroalgae-based fertilizers.

V.II. PLANT ANALYSES

The study includes detailed analyses of plant growth, nutrient uptake, and residue levels in strawberry and lettuce plants.

a. Crop Growth and Yield: To evaluate growth and yield, various measurements and observations are performed on at least five samples per treatment group. These include: plant height (above ground), leaf width and length, flower count (for strawberries), fruit count (for strawberries), plant body and leaf color, total plant length including roots, plant weight after removal from soil, as well as sensory evaluations such as color, taste, and smell. For lettuce, diameter measurements are also taken.

b. Nutrient Uptake: Nutrient analysis is conducted by sampling leaves during mid-growth. The following elements are analyzed: Nitrogen (N), Phosphorus (P), Potassium (K), Calcium (Ca), Magnesium (Mg), Iron (Fe), Copper (Cu), Manganese (Mn), and Zinc (Zn).

For strawberries, the optimal sampling time is during active growth, before flowering and fruiting. Around 10–15 leaves (100–150 g) are collected randomly from different parts of various plants. Samples are transported under cold chain conditions.

For lettuce, leaf samples are collected 2–4 weeks before harvest. Again, 10–15 leaves (100–150 g) are taken from different areas of the plants and transported with cold chain preservation.

c. Residue Analysis: Heavy metal residue analysis is performed to detect the presence of metals such as Al, Sb, Cu, Hg, Zn, Fe, Co, Sn, Ca, Cr, Mg, Mn, Ni, K, Se, and Na.

For strawberries, sampling occurs 3–7 days before harvest, when heavy metals are most likely to accumulate in leaves. Approximately 10–15 upper leaves are sampled randomly and preserved under cold chain conditions using hygienic storage materials such as ice boxes and protective packaging.

For lettuce, samples are collected 2–4 weeks before harvest when metal uptake is expected to be highest. 10–15 leaves from different sections of multiple plants are collected, totaling around 100–150 grams. These samples are also kept under strict cold chain and hygiene protocols.

PART VI – SOIL MATERIALS

The soil analysis in the project focuses on assessing soil fertility and microbial activity by analyzing nutrient content and pH before and after applying macroalgae-based fertilizers. It also evaluates the impact of these fertilizers on microbial communities and nutrient cycling, offering insights into their influence on soil health.

VI.I. SOIL MATERIAL & ANALYSIS

The soil to be used in the experiment is sourced from the area surrounding the greenhouse established for the project. Before planting, the soil is prepared by passing it through a 1 cm sieve to remove any large particles. Soil samples are collected both before placing the soil in the pots and after the plants have completed their growth. Similarly, soil analysis is conducted both before and after planting for the plants grown in the greenhouse soil.

Soil Fertility Assessment: Soil fertility is assessed by analyzing nutrient content and pH before and after applying macroalgae-based fertilizers. Samples (nearly 1000 grams) are taken from a depth of 0-20 cm, both before planting and after plant development. pH is measured with a pH meter, and organic matter analysis is conducted to evaluate the soil's nutrient status.

Soil Microbial Activity: The impact of macroalgae-based fertilizers on soil microbial communities and nutrient cycling is assessed. An increase in the total microbial mass indicates an increase in microorganisms, their biological activity, or improved environmental conditions for them. This increase generally has positive effects on agricultural productivity, environmental health, and ecosystem functioning. Microbial activity analyses are conducted for each group in each period, both before and after the experiment.

VI.II. IRRIGATION OF PLANTS

Irrigation is carried out using municipal water. An automatic irrigation system, connected to the outlet line of the water reservoir located outside the greenhouse, provides watering based on climatic conditions. The frequency of watering is determined according to the EC (Electrical Conductivity) levels (Strawberry: 1-2.5; Lettuce: 1.5-3), and the average pH is maintained at 6.

PART VII - FERTILIZERS

Three different types of fertilizers are prepared for the study: liquid fertilizer, compost, and solid fertilizer. Once prepared, the fertilizers are analyzed prior to their application to the plant samples.

VII.I. LIQUID FERTILIZER

The collected macroalgae (*Ulva* spp.) are soaked in tap water at +40 °C for 24 hours before proceeding with fertilizer production studies. The macroalgae are washed with running tap water until the salinity level drops below 1 PSU. Once the desired values are reached, the washing process is terminated, and the next stage is initiated.

Samples, prepared to be 0.5–1 cm in size after being extracted from the sea and pre-processed, will be mixed with pure water at a 1:1 ratio and placed into a fermentation tank (Figure 24). The fertilizer tank to be used has not been previously utilized. Simple mechanisms, such as plastic containers, have been employed. Therefore, minor modifications will be made to the existing fermentation tanks, including the installation of a locking mechanism to prevent air ingress.

The temperature inside the fermentation tank will be maintained between 22-26°C, and the pH should be 7. The pH will be monitored from a special compartment on the tank. If necessary, an acid such as KOH can be added to adjust the pH. A chemist can be consulted for precise pH adjustments. The mixer inside the fermentation tank will run for 2 minutes every 15 minutes. The fermentation period will last 30 days.

Once fermentation is complete, the liquid fertilizer will be transferred to bottles and mixed with pure water at a ratio of 1:5 (1 part fertilizer to 5 parts water). To stop the fermentation process, Sodium Metabisulfite (E223) (5.5 g/20 L) will be added to the bottles, along with Potassium Metabisulfite (2 g/10 L) as a mold and fungus inhibitor. For cleaning the fermentation tank, a mixture of Potassium Metabisulfite (20 g/10 L) and Citric Acid (10 g/10 L) will be used for disinfection. The mixture will be poured into the fermentation tank, and the lid will be loosely secured to allow gases to escape slowly. After waiting for 30 minutes, the solution will be drained without the need for rinsing.



Figure 24. Liquid fertilizer tank

Liquid fertilizer is applied in three different concentrations (1 ml, 2 ml, and 3 ml). The first application is made immediately after the plants are planted in pots or soil. Subsequent applications are carried out at 15-day intervals until the plants complete their development. During each application, the liquid fertilizer is added to 1 liter of water at the specified concentrations (1 ml, 2 ml, and 3 ml) and applied to both pots and open soil.

VII.II. SOLID FERTILIZER

After being collected from the sea, the samples undergo preliminary processing, beginning with a drying process to reduce moisture content to below 10%. (Figure 25). They are then ground into a powder using a mill. From the resulting powder, fertilizers are produced in pellet form with diameters of 2.5 mm and 3 mm. Both the powder fertilizer and the pellets are purified separately.



Figure 25. Drying process in a climate-controlled chamber

Applications are made after the analysis is completed. Propionic Acid (95%) is used as a mold and fungus inhibitor for the solid fertilizer. After spraying, the fertilizer is kept in a closed container for 1 day. Then, the container lid is opened for another day, and the fertilizer is ready for use. A mixture of 20 ml water and 3 ml propionic acid is used per 1 kg of solid fertilizer.

The application of solid fertilizer starts just before planting. In other words, the fertilizer is applied first, and then the plant is planted. After applying the powder fertilizer, the soil is mixed to a depth of 10 cm. Fertilizer is applied at 15-day intervals until the plant completes its development. No fertilizer is applied to the control pot. The second pot receives 1 g of fertilizer, the third pot receives 3 g, and the fourth pot receives 5 g as a starting dose. For pellet application, the soil is mixed to a depth of 3-5 cm from the surface. The pellet is applied as a single dose in 1 pot and mixed into the soil. The application amount for the pellet is 3 g. Solid fertilizers are applied directly to the root areas of the plant.

VII.III. COMPOST FERTILIZER

After being collected from the sea and undergoing preliminary processing, the samples are chopped or cut to a size of 1–3 cm (Figure 26) and then placed in a fermentation device (Figure 27) to prepare compost using the 'Bokashi Method. The prepared compost is applied to the plants after analysis.

Propionic Acid (95%) is used as a mold and fungus inhibitor in the compost. After being applied via spraying, the compost is kept in a closed container for 1 day. The container lid is then opened for another day to allow the compost to air, making it ready for use. Compost fertilizers are applied starting immediately after planting. Fertilizer is then applied at 15-day intervals until the plant completes its development. No fertilizer is applied to the control pot. The second pot receives an initial dose of 1 g, the third pot receives 3 g, and the fourth pot receives 5 g of fertilizer.



Figure 26. Chopped macroalgae samples



Figure 27. Fermentation device

VII.IV. FERTILIZERS ANALYSIS

Before the fertilizers are applied to the plant samples, they undergo a thorough analysis. The analysis assesses various parameters for both liquid and solid fertilizers, as well as compost.

For the liquid and solid fertilizers, the following parameters are examined: moisture content, combustion loss, pH, electrical conductivity (EC), and the levels of essential nutrients such as nitrogen (N), phosphorus (P), potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg), iron (Fe), manganese (Mn), zinc (Zn), and copper (Cu). Additionally, the presence of alginic acid, gibberellic acid, cytokinin, and auxin is also analyzed.

For the compost, the analysis includes moisture content, combustion loss, pH, EC, and the same essential nutrients (N, P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu). In addition, humic acid and fulvic acid are examined, along with alginic acid, gibberellic acid, cytokinin, and auxin.

VII.V. CHEMICAL FERTILIZER APPLICATION (15N, 15P, 15K)

In addition to macroalgae-based fertilizers, chemical fertilizers are also applied to each plant during the study. The chemical fertilizer used has a 15-15-15 composition (15% Nitrogen, 15% Phosphorus, and 15% Potassium).

For strawberries, 30 grams of chemical fertilizer are applied to the pot or soil just before planting. The soil is dug to a depth of 10 cm to plant the strawberries. Then, 15 grams of chemical fertilizer are applied every 30 days until the study is completed.

For lettuce, 25 grams of chemical fertilizer are applied immediately after planting. Subsequently, 15 grams of fertilizer are applied every 15 days until the lettuce plants have fully developed.

PART VIII – BIOPLASTICS

VIII.I. EXTRACTION PROCEDURE

The biomass, sized between 1-5 mm, is boiled with distilled water in a boiling flask using an electric heater for 30 minutes. The algal residue is then cooked for 30 minutes in a solution of $CaCl_2$ (0.5% W/V) in a boiling flask using an electric heater. After that, sodium chloride (0.5% W/V) is added to the algal biomass and boiled for 60 minutes. Finally, the algal residue is boiled with Na_2CO_3 (5% W/V) for 30 minutes with vigorous mixing. Sodium alginate is obtained by adding isopropyl alcohol or ethyl alcohol, followed by drying in an electric oven at 50°C for 28 hours.

VIII.II. BIOFILM PREPARATION

The preparation of biofilms begins by accurately measuring different quantities of algal residues, specifically ulvan or alginate, depending on the desired film properties. These biopolymers serve as the primary raw materials and are initially dissolved in distilled water to create a uniform solution. To enhance the flexibility, mechanical strength, and overall performance of the biofilms, various plasticizers such as glycerol, polyvinyl alcohol (PVA), polyethylene glycol (PEG), or other polymers commonly reported in the literature—such as cellulose derivatives—are incorporated into the solution at predetermined concentrations.

The mixture is subjected to continuous stirring using a magnetic or mechanical stirrer to ensure thorough dispersion of all components and to prevent any aggregation of the polymer chains. The stirring is carried out at controlled temperatures, which may vary depending on the specific protocol but generally ranges from room temperature to moderate heating, facilitating complete solubilization and homogenization of the solution.

Following this homogenization step, the prepared solution is carefully poured or cast onto clean petri dishes to form an even layer, which serves as the mold for the biofilm. These petri dishes are then placed in a drying oven maintained at 45°C, where the solvent (water) gradually evaporates over a 24-hour period. This drying process results in the formation of thin, uniform biofilms adhering to the surface of the dishes.

Once the films have completely dried, they are gently peeled off from the petri dishes to avoid any damage or tearing. To stabilize the physical properties and remove any residual moisture, the biofilms are conditioned for a minimum of 48 hours in a controlled environment with constant temperature and relative humidity. This conditioning step is crucial for ensuring reproducibility and reliability of the biofilm characteristics during subsequent testing or application (Figure 28).

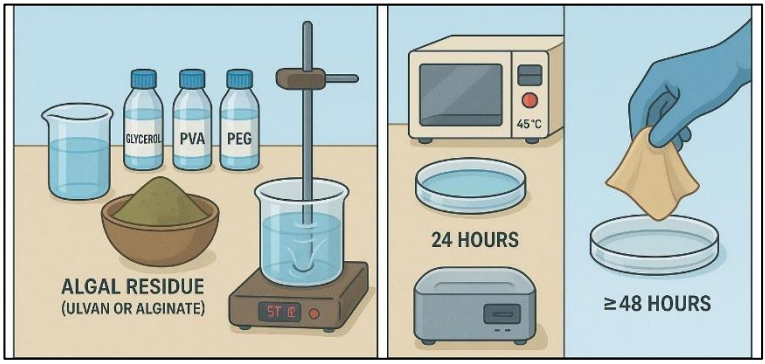


Figure 28. Biofilm preparation

VIII.III. CHARACTERISTICS OF THE FILMS

The characterization and evaluation of the produced bioplastics will be conducted through a series of rigorous tests designed to comprehensively assess their physical, optical, mechanical, morphological, thermal, and biodegradability properties.

These analyses are critical not only for determining the overall quality and performance of the fabricated seaweed-based bioplastics but also for enabling direct comparisons with conventional petroleum-derived plastics. By doing so, the study aims to demonstrate the technical feasibility and environmental advantages of producing bioplastics from sustainable marine biomass, highlighting their potential contribution to the expanding green technology market.

Physical Properties: Key physical parameters are measured to understand the structural integrity and environmental durability of the films. Thickness is evaluated using precise micrometers or thickness gauges to ensure uniformity. Solubility tests examine the film's resistance to water and other solvents, indicating its suitability for various applications. Water vapor permeability (WVP) and water vapor transmission rate (WVTR) measurements are conducted to determine the film's barrier properties against moisture transfer; these properties are especially critical for packaging applications. Moisture content analysis measures the amount of water retained in the bioplastic, considered an important parameter affecting its mechanical and barrier properties.

Optical Properties: The visual quality and light interaction characteristics of the films are examined by measuring transparency, opacity, and light transmittance values at relevant wavelengths using spectrophotometry. These properties are important for applications that require specific optical clarity or light-blocking capabilities, such as food packaging or agricultural films.

Mechanical Properties: Mechanical tests are conducted using a universal testing machine to determine the tensile strength, elongation at break, and Young's modulus of the films. Tensile strength indicates the maximum stress the bioplastic film can withstand before breaking, elongation at break measures the film's flexibility and ductility, and Young's modulus reflects its stiffness and elasticity. These parameters are critical for assessing the durability and performance of the bioplastics in practical applications.

Morphological Study: Advanced analytical techniques are used to investigate the chemical composition and surface morphology of bioplastics. Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy is employed to identify functional groups and chemical bonds, providing information about the molecular structure and interactions within the film. Field Emission Scanning Electron Microscopy (FE-SEM) reveals detailed surface topography and microstructural features, while Atomic Force Microscopy (AFM) provides nanoscale surface roughness and texture information. X-ray diffraction (XRD) analysis is performed to determine the crystallinity and phase composition of the bioplastic materials, which influence their mechanical and thermal behavior.

Thermal Properties: Thermal Gravimetric Analysis (TGA) is performed to evaluate the thermal stability and decomposition patterns of the bioplastics. This technique measures weight loss as a function of temperature, providing valuable data on the temperature ranges within which the bioplastics maintain their integrity and the nature of thermal degradation processes.

Biodegradability: The environmental impact and sustainability of the bioplastics are evaluated through soil burial tests, where samples are buried in natural soil environments and monitored over time for degradation. This test provides empirical evidence of the biodegradation rate and the extent to which the bioplastic materials can be broken down by microbial activity, supporting their classification as eco-friendly alternatives to synthetic plastics.

TOOLS & EQUIPMENT

AAS (Atomic Absorption Spectrophotometry): Used for analyzing metal concentrations.
Analytical Balance: Used to measure samples.
Atomic Force Microscopy (AFM): Used for analyzing the surface properties of biofilms at the nanoscale.
Automatic Irrigation System: Regulates water supply to crops.
Blotting Paper: Used for drying and removing excess water from cleaned samples.
Boiling Flask: Used for boiling algal biomass during processing.
Cold Chain Storage Equipment: Ice boxes and refrigerated transport to maintain sample integrity.
Concentrated HNO_3 (Nitric Acid): Used for acidifying samples to prevent precipitation of metals and preserve the sample's integrity.
Distilled Water: Used for rinsing collected samples to remove foreign materials.
EC Measurement Tools: Tools used to determine the EC levels to regulate irrigation frequency.
Electric Heater: Used for providing heat to the boiling flask.
Field Emission Scanning Electron Microscope (SEM): Used for studying the surface structure of biofilms.
Five Rows of Galvanized Wire: Used for reinforcing the greenhouse structure.
Formaldehyde-Seawater Solution (2–5%): Used for preserving macroalgae samples.
Fourier-Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy: Used for analyzing the chemical structure of the produced bioplastics.
Freezer: Used for storing sediment samples to preserve their integrity before analysis.
Galvanized Pipes: Used for constructing the main framework and support system of the greenhouse, ensuring strength and durability against wind forces.
Greenhouse: Used for providing a controlled environment for plant growth, protected from external weather conditions.
ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry): Used for analyzing the metal concentrations.
Isopropyl Alcohol or Ethyl Alcohol: Used for obtaining sodium alginate from algal residue.
Metal Profiles for Doors: Used for creating the frames for the doors of the greenhouse.
Microscope: Used for identifying macroalgae species through microscopic examination.
Microwave Digestion Unit: Used for digesting samples by applying heat and pressure to break down organic material and release metals for analysis.
Mortar and Pestle: Used to grind dried macroalgae samples into fine powder for chemical analysis.
Motorized Sieve Shaker: Used for sieving dried sediment samples.
Multiparameter Device: Used for measuring in-situ physical parameters such as pH, temperature, salinity, and dissolved oxygen.

Oven: Used for drying samples.
Petri Dishes: Used to spread homogenized solutions of algal residue and plasticizers to prepare biofilms.
pH Meter: Used to measure the pH level.
Plastic Bags: Used for temporarily holding collected samples during transportation.
Plastic Covering (Greenhouse Film): Used for protecting plants inside the greenhouse from UV rays and environmental factors.
Plastic Jars: Used for transferring and preserving samples.
Plasticizers (Glycerol, Polyvinyl Alcohol, Polyethylene Glycol, Cellulose): Used for preparing biofilms and bioplastics from algal residues.
Pots: Used for growing plants inside the greenhouse.
Quadrate: Used for defining the sampling area for collecting macroalgae samples.
Sample Collection and Transport Containers: Used for ensuring proper storage and preservation during transportation.
Scanning Electron Microscope (SEM): Used for examining the surface morphology of the bioplastics.
Sealed Containers: Used to store acidified seawater samples during transportation to the laboratory.
Seawater Collection Containers: Used for collecting seawater samples.
Seedlings/Seeds: Used for planting.
Sensory Evaluation Tools: For evaluating color, taste, and smell of the vegetables.
Sliding Doors: Used for allowing easy access to the greenhouse and proper ventilation.
Sodium Chloride (0.5% W/V): Used for treating algal biomass in the process of making biofilms and bioplastics.
Soil Sampling Tools: Tools for collecting soil samples before and after plant growth.
Soil Sieving Equipment: For preparing the soil before planting by removing large particles.
Soil: Used for providing a growing for plants.
Soil-Burial Test: Used for assessing the biodegradability of bioplastics.
Spatula: Used for manually gathering macroalgae from the substrate.
Thermogravimetric Analyzer (TGA): Used for analyzing the thermal stability of the produced bioplastics.
Vertical Support Pipes and Cross-Braced Pipes: Used for enhancing the structural stability of the greenhouse.
Water Reservoir and Outlet Line: The water source for irrigation, located outside the greenhouse, connected to the irrigation system.
Weighing Scales: To measure plant weight after removal from soil.
X-ray Diffraction (XRD) Analysis: Used for determining the crystallinity and molecular structure of biofilms.

REFERENCES

Bouiadjra, B. B., Ghellai, M., Daoudi, M., Behmene, I. E., & Bouiadjra, M. E. A. B. (2021). Impacts of the invasive species *Caulerpa cylindracea* Sonder, 1845 on the algae flora of the west coast of Algeria. *Biodiversity Data Journal, 9*, e63617. https://doi.org/10.3897/BDJ.9.e63617

ÇŞB-ÇEDİDGM & TÜBİTAK-MAM. (2017). *Sea Monitoring Guidelines*, Gebze-Kocaeli.

Fernández-Aláez, C., & Fernández-Aláez, M. (2011). Seasonal changes in tissue nutrient concentrations of macroalgae and aquatic angiosperms in Mediterranean ponds (North-Western Spain). *Fundamental and Applied Limnology, 179*(3), 179-192. https://doi.org/10.1127/1863-9135/2011/0179-0179

Setthamongkol, P., Tunkijjanukij, S., Satapornvanit, K., & Salaenoi, J. (2015). Growth and nutrient analysis in marine macroalgae. *Agriculture and Natural Resources, 49*(2), 211-218. https://doi.org/10.1016/j.anres.2015.06.006

Srijaya, T. C., Pradeep, P. J., & Chatterji, A. (2010). Effect of seaweed extract as an organic fertilizer on the growth enhancement of black mustard plant. *Journal of Coastal Research, 1*, 137-150. https://doi.org/10.2112/JCR-SI1-137-150



Projenin Başlığı

Makroalg Patlamaları için Araştırma, Temizleme Yöntemleri, Ekonomik Değerlendirme ve Pilot Uygulama

Sinop Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi
Akliman Mevkii Abalı Köyü 57000, Sinop / Türkiye
+90 368 287 6254
suf@sinop.edu.tr

Yayın Tarihi
Eylül 2025

Bu metnin içeriğinden yazar(lar) sorumludur. İçerik, Avrupa Birliği'nin resmi görüşünü yansıtmak zorunda değildir. Kaynak belirtilip yapılan değişiklikler açıkça gösterildiği sürece çoğaltılmasına izin verilmektedir.