

T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***VİCİA FABA* L.'DA DEMİR (FeCl₃) TOKSİSİTESİNİN
ANATOMİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Öğrencinin Adı SOYADI : Temel Batuhan KILIÇOĞLU

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih :

Enstitü Anabilim Dalı : Biyoloji

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Zafer TÜRKMEN

Şubat 2022
GİRESUN

T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***VİCİA FABAE* L.'DA DEMİR (FeCl₃)
TOKSİSİTESİNİN ANATOMİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Temel Batuhan KILIÇOĞLU

Enstitü Anabilim Dalı

:

Biyoloji

Bu tez 10/02/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

**Prof. Dr.
Kültiğın ÇAVUŞOĞLU
Jüri Başkanı**

**Prof. Dr.
Zafer TÜRKMEN
Üye**

**Dr. Öğr. Üyesi
Fatih KUTLUER
Üye**

**Doç. Dr.
Bahadır KOZ
Enstitü Müdürü**

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Temel Batuhan KILIÇOĞLU

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinden, deneysel ve yazım süreçleri de dahil bilimsel katkılarını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Zafer TÜRKMEN ile Genetik ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı ğretim yeleri Prof. Dr. Kltiğın ÇAVUŞOĞLU ve Prof. Dr. Emine YALÇIN'na teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca Yüksek Lisans eğitimim boyunca maddi ve manevi yardımlarını her zaman yanımda hissettiğim aileme de teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	IV
ŞEKİLLER LİSTESİ	V
TABLolar LİSTESİ	VI
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
BÖLÜM 1. GİRİŞ.....	1
1.1. Ağır Metaller.....	1
1.2. Ağır Metal Kirliliği.....	1
1.3. Ağır Metallerin Toksik Etkileri.....	2
1.4. Demir (Fe) ve Toksik Mekanizması.....	3
1.5. Bitkilerde Demir (Fe).....	5
1.6. <i>Vicia faba</i> L.....	5
BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	7
BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM	9
3.1. Biyolojik Materyal ve Kimyasallar	9
3.2. Deney Grupları ve Çimlenme	9
3.3. Fizyolojik Parametre Ölçümleri	9
3.4. Anatomik Yapıdaki Değişim.....	10
BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	11

4.1. Fizyolojik Parametreler.....	11
4.2. Anatomik Parametreler.....	13
 BÖLÜM 5. SONUÇ VE ÖNERİLER	 23
 KAYNAKLAR	 24
ÖZGEÇMİŞ	27



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü

EPA : Çevre Koruma Ajansı

V. faba : *Vicia faba*



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1. Epidermis hücrelerinin normal görünümü (x100).....	15
Şekil 4.2. Hücre nukleusunun normal (oval) görünümü (x100).....	16
Şekil 4.3. Korteks hücrelerinin normal görünümü (x100).....	17
Şekil 4.4. İletim dokunun normal görünümü (x50).....	18
Şekil 4.5. Epidermis hücre hasarı (x100).....	19
Şekil 4.6. Dev hücre çekirdeği (x100).....	20
Şekil 4.7. Korteks hücre çevresinde kalınlaşma (x100).....	21
Şekil 4.8. İletim dokunun belirgin olmayan görünümü (x50).....	22

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 4.1. Fe uygulamasının <i>V. faba</i> fizyolojisine etkileri.....	12
Tablo 4.2. Fe'nin <i>V. faba</i> kök ucu meristem hücrelerinde teşvik ettiği anatomik hasarlar.....	14



***Vicia faba* L.'DA DEMİR (FeCl₃) TOKSİSİTESİNİN ANATOMİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

ÖZET

Bu çalışmada, demir (Fe) ağır metalinin *Vicia faba* L.'da teşvik ettiği fizyolojik ve anatomik toksisite araştırılmıştır. Fizyolojik parametreler olarak çimlenme yüzdesi, kök uzunluğu ve ağırlık kazanımı ele alınmıştır. Anatomik değişimler ise kök ucu hücrelerinden alınan enine kesitlerin mikroskop altında incelenmesiyle belirlenmiştir. *V. faba* tohumları bir kontrol ve üç uygulama olarak, toplam dört gruba ayrılmıştır. 72 saat süresince kontrol grubu tohumlar çeşme suyu, uygulama grubundaki tohumlar ise Fe'nin 25, 50 ve 100 mg/L dozuyla çimlendirilmiştir. Sonuçta, Fe uygulaması doza bağlı olarak, incelenen fizyolojik parametrelerin tamamında istatistiksel olarak anlamlı azalmalara ($p<0.05$) neden olmuştur. Ayrıca Fe kök ucu hücrelerinde epidermis hücre hasarı, dev hücre çekirdeği, belirgin olmayan iletim doku ve korteks hücre çeperinde kalınlaşma şeklinde anatomik hasarları teşvik etmiştir. Sonuç olarak, aşırı miktarlardaki Fe dozlarının bitkiler içinde oldukça toksik olabileceği gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Anatomi, demir, fizyoloji, *Vicia faba* L.

INVESTIGATION OF THE ANATOMICAL EFFECTS OF IRON (FeCl₃) TOXICITY IN VICIA FABA L.

SUMMARY

In this study, the physiological and anatomical toxicity induced by the heavy metal iron (Fe) in *Vicia faba* L. was investigated. Germination percentage, root length and weight gain were considered as physiological parameters. Anatomical changes were determined by examining the cross sections taken from root tip cells under the microscope. *V. faba* seeds were divided into four groups as one control and three treatments. During 72 hours, the seeds in the control group were germinated with tap water, and the seeds in the application group were germinated with 25, 50 and 100 mg/L Fe. As a result, Fe application caused statistically significant decreases ($p<0.05$) in all of the physiological parameters examined, depending on the dose. In addition, Fe promoted anatomical damages as epidermis cell damage, giant cell nucleus, indistinct vascular tissue, and thickening of the cortex cell wall in root tip cells. In conclusion, it has been shown that excessive doses of Fe can be highly toxic to plants.

Keywords: Anatomy, iron, physiology, *Vicia faba* L.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

1.1. Ağır Metaller

Metaller yerkabuğunda doğal olarak oluşan ve ortamdaki içerikleri farklı bölgeler arasında değişebilen moleküllerdir. Metallerin ortamdaki dağılımı ise metalin özellikleri ve çevresel faktörlerin etkileri tarafından yönetilmektedir. *Ağır metal* tanımı ise nispeten yüksek yoğunluğa sahip olan ve düşük konsantrasyonda bile toksik veya zehirli olabilen herhangi bir metalik elementi ifade etmektedir. Ağır metaller atom ağırlığı 40.04'den daha yüksek olan yâda atom yoğunluğu 4 g/cm^3 'den veya sudan 5 kat veya daha fazla olan metaller ve metaloidler için kullanılan genel bir terimdir. Ağır metaller çevreye doğal ve antropojenik yollarla girmektedirler. Bu tür kaynaklar ise yerkabuğunun doğal aşınması, madencilik, toprak erozyonu, endüstriyel deşarj, kentsel akış, kanalizasyon atıkları, bitkilere uygulanan haşere veya hastalık kontrol ajanları ve hava kirliliği serpintilerini içermektedir. Bazı kişiler bu kirleticilere özellikle işyerlerinde maruz kalsalar da, çoğu insan için bu toksik elementlere maruz kalmanın başlıca yolu diyetir (su ve yiyecek). Ağır metallerin bulaşma zinciri ise neredeyse her zaman döngüsel bir sıra izlemektedir (endüstri, atmosfer, toprak, su, gıdalar ve insan). Canlılarda toksik etkilere sahip ağır metallere kurşun (Pb), kadmiyum (Cd), çinko (Zn), cıva (Hg), arsenik (As), gümüş (Ag) krom (Cr), bakır (Cu) ve demir (Fe) örnek olarak verilebilir [1, 2].

1.2. Ağır Metal Kirliliği

Dünya her geçen gün gelişmekte ve insan nüfusu da buna paralel olarak, artış göstermektedir. Bu gelişme, ilerleme ve nüfus artışı sürecinde ise doğal kaynaklar önemli bir rol oynamaktadır. Biyotik ve abiyotik kaynaklar medeniyetin ihtiyaçlarını veya taleplerini karşılamak için hızla tüketilmektedir. Kaynakların bilinçsizce kullanılması, yalnızca gelecekte kıtlığa neden olmayacak, aynı zamanda günümüzde

çevremize biyosferin bir parçası olmayan veya daha önce mevcut olsa bile miktarları önemsiz derece de olan bazı maddelerin eklenmesine yol açmaktadır. Bu istenmeyen maddelerin çevreye eklenmesi olgusuna “Kirlilik”, eklenen maddelere ise “kirleticiler” adı verilmektedir. Çeşitli insan faaliyetleri sonucunda çevreye eklenen bu kirleticiler ekosistem ve özellikle canlılar için tehdit oluşturmaktadır. Bu kirleticiler gaz, sıvı veya katı formlarda ortaya çıkabilirler. Farklı kirleticiler türleri arasında en dikkat çeken ise ciddi sağlık sorunlarına da neden olabilen ağır metallerdir. Ağır metaller her zaman doğanın bir parçası olmuştur. Fakat kaynakların aşırı tüketimi ve diğer antropojenik faaliyetler, bu metallerin biyosferde oldukça artışına neden olmuştur. Örneğin su kaynaklarının bilinçsiz ve aşırı kullanımı yüksek arsenik seviyelerinin ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Çeşitli endüstrilerden ve zirai pestisit kullanımından kaynaklı ağır metallerin, organizmalarda ciddi toksik etkilere neden olduğu kanıtlanmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ve ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA) gibi uluslararası kuruluşlar, başta Cd, Hg, As ve Pb olmak üzere çeşitli ağır metallerin sağlık üzerine etkilerini kapsamlı bir şekilde incelemiş ve gözden geçirmişlerdir. Herhangi bir aktivite sonucu açığa çıkan ağır metaller yok edilemedikleri için de ortamda uzun süre kalmaktadırlar. Bu ağır metallerin bazıları hem bitkilerin hem de hayvanların fizyolojik metabolizması için eser miktarda gerekli olsalar da, yüksek konsantrasyonlarda oldukça toksiktirler [3].

1.3. Ağır Metallerin Toksik Etkileri

Ağır metaller maruziyet dünyanın birçok yerinde artarak, devam etmektedir. Ağır metaller önemli çevresel kirleticilerdir ve toksisiteleri ciddi bir problemdir. Atık sulara en yaygın bulunan ağır metaller As, Cd, Cr, Cu, Pb, Ni, Zn ve Fe olup, insan sağlığı ve çevre için oldukça risk oluşturmaktadırlar. Ağır metaller çevreye doğal yollarla ve insan faaliyetleri sonucunda girerler. Ağır metal kaynakları arasında toprak erozyonu, yerkabuğunun doğal aşınması, madencilik, endüstriyel atıklar, kanalizasyon deşarjı ve pestisitler sayılabilir. Bu metallerden bazıları bitkilerde ve hayvanlarda hayati biyolojik fonksiyonlara sahip olmalarına rağmen, yüksek konsantrasyonları homeostaz, taşınma ve bölünme hasarlarına neden olabilirler. Ağır metaller; orijinal metalleri doğal bağlanma bölgelerinden değiştirerek, hücre hasarına

ve sonucunda toksisiteye neden olarak, kendilerine ait olmayan protein bölgelerine bağlanırlar. Birçok araştırmada, biyolojik makromoleküllerin oksidatif bozulmasının esas olarak ağır metallerin DNA ve nükleer proteinlere bağlanmasından kaynaklandığını bildirilmiştir [4].

1.4. Demir (Fe) ve Toksik Mekanizması

Demir, simgesi Fe ve atom numarası 26 olan bir elementtir. Fe, dünya yüzeyinde en yaygın dördüncü mineral ve yer kabuğunda ise en çok bulunan metaldir. Fe, demir cevherlerinden elde edilir ve doğada nadiren elementel halde bulunur. Fe, tüm metaller içinde en çok kullanılandır ve tüm dünyada üretilen metallerin ağırlıkça %95'ni oluşturmaktadır. Düşük fiyatı ve yüksek mukavemet özellikleri Fe'i otomotiv, gemi yapımı ve inşaat sektöründe vazgeçilmez kılmaktadır. Çelik ise en çok bilinen Fe alaşımıdır. Besin maddeleri, su ve toprak da bol miktarda Fe bileşikleri bulunmaktadır. Bitkiler Fe'i demiri topraktan, hayvan ve insanlar ise bitkilerden almaktadırlar. Fe için en iyi besin kaynakları karaciğer, yumurta sarısı, böbrek, kalp, balık, istiridye, fasulye, ıspanak, buğday, yulaf unu, hurma, ceviz, fındık, kuru kayısı ve pekmezdır. Fe, besinlerde Fe^{3+} şeklinde bulunmaktadır [5].

Hemoproteinler ve demir-kükürt merkezleri şeklindeki Fe vücutta en bol bulunan geçiş metalidir. Hemoglobin, miyoglobin ve solunum enzimlerinin yapısında bulunur. Hem elektron vericisi, hem de alıcısı olarak hizmet etmek için olağandışı esnekliğe sahip olması, canlı organizmalardaki hücresel reaksiyonlara önemli ölçüde katkıda bulunur. Temel bir eser/iz element olduğundan organizma için mutlaka gereklidir. Hücredeki çeşitli işlevlerin sürdürülmesi için gerekli olan diyetle günlük ortalama Fe alımı, günde 3-8 mg arasında değişmektedir. İnsan vücudu için gerekliliği, eksikliği halinde dünya çapında görülen hastalık, sakatlık ve ölümlerin ardındaki, önde gelen faktörlerden biri olmasından kaynaklanmaktadır. Örneğin DSÖ tarafından yapılan bir araştırmada 1-5 yaş grubundaki çocukların %47,4'ü, okul çağındaki çocuklarının %25,4'ü, hamilelerin %41,8'i ve hamile olmayan kadınların %30,2'si, erkeklerin %12,7'si ve yaşlı nüfusun ise %23,9'unun Fe eksikliğinden kaynaklanan anemi hastası olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca hemoglobinin bir

bileşeni olan Fe Pb'nin toksik etkilerine karşı koymaktadır. Fe eksikliği halinde Pb'nin hemopeotik sistem üzerindeki toksisitesinin arttığı rapor edilmiştir. Fe; Cu ve Ca gibi bazı minerallerin emilimi ve kanda oksijeni taşıyan kırmızı kan hücrelerinin ve çeşitli enzimlerin üretimi için gereklidir. Ayrıca, bağışıklık sistemini de güçlendirir. Fe bağırsak yüzeyinde, emilim için zararlı metallerle rekabet ederek, vücudun toksik etkilerden korunmasına yardımcı olmaktadır. Bununla birlikte, yüksek konsantrasyonlardaki Fe ise serbest radikal oluşturan reaksiyonları katalize ederek, potansiyel toksisiteye neden olmaktadır. Geçiş metal iyonları tarafından uyarıldığında, Fe⁺²'in negatif yüklü fosfolipidlere bağlanması işlemi gerçekleşmekte, sonrasında ise fosfolipid çift tabakasının fiziksel özelliklerinin değişmesine neden olan, Fe⁺² aracılı lipid peroksidasyonu meydana gelmekte ve bunu da lipid peroksidasyonunun başlama ve yayılma reaksiyonları takip etmektedir [6].

Emilen Fe proteine bağlanamadığında, çok çeşitli zararlı serbest radikaller oluşturmakta ve bu da memeli hücrelerinde ve biyolojik sıvılardaki Fe konsantrasyonunu oldukça artırmaktadır. Dolaşan yani bu bağlanmamış Fe gastrointestinal sistemin ve biyolojik sıvıların aşındırıcı etkisine neden olur. Hız sınırlayıcı emilim basamağını geçilerek, vücuda son derece yüksek bir Fe seviyesi girmiş olur. Bu serbest Fe kalp, karaciğer ve beyin hücrelerine nüfuz edebilir. Ayrıca serbest Fe tarafından oksidatif fosforilasyonun bozulması nedeniyle, ferröz Fe, hidrojen iyonlarını serbest bırakan ferrik Fe dönüştürülür ve böylece metabolik asitliği arttırır. Diğer yandan, serbest Fe mitokondri, mikrozomlar ve diğer hücrel organellerde ciddi hasara neden olan lipid peroksidasyonuna da yol açabilir. Fe'nin hücreler üzerindeki toksisitesi, hücrel oksitleme ve indirgeme mekanizmalarını içeren Fe aracılı doku hasarına ve bunların mitokondri ve lizozomlar gibi hücre içi organellere karşı toksisitesine yol açabilir. Potansiyel hücrel hasara neden olduğuna inanılan çok çeşitli serbest radikaller, aşırı Fe alımıyla üretilir. Fe tarafından üretilen hidrojen serbest radikalleri, DNA'ya saldırır ve hücrel hasara, mutasyona ve bir dizi hastalığa neden olan malign dönüşümlere neden olurlar [4].

1.5. Bitkilerde Demir (Fe)

Demir (Fe) esas olarak bitki fotosentez sürecinde yer alır. Mikro besin maddelerinin bitki köklerindeki varlığı, düşük pH'lı toprakta daha kolay bulunan Fe ile toprağın pH düzeylerine bağlıdır. Fe ve Mn, bitki büyüme ve gelişmesinde önemli bir rol oynamaktadırlar. Ancak bu mikro besinlerden birinin bolluğu, diğerini bitki kökleri için daha az kullanılabilir hale getirdiğinden, genellikle emilim için rekabet halindedirler. Fe; sitokromlar, katalaz, peroksidaz ve leghemoglobin dahil “hem” proteinleri ile ferredoksin, acontiaz ve süperoksit disumutaz (SOD) dahil olmak üzere Fe sülfür proteinleri gibi hücre redoks sistemlerinin önemli bir bileşenidir. Tüm bitkiler için temel bir element olan Fe; fotosentez, kloroplast gelişimi ve klorofil biyosentezi gibi çeşitli süreçlerde, birçok önemli biyolojik role sahiptir. Mineral toprakların çoğu Fe açısından zengin olmasına rağmen, yaprak dokularında Fe toksisitesi semptomlarının ifadesi, yalnızca çözünmeyen Fe^{+3} 'ün çözünmeyen Fe^{+2} 'e mikrobiyal indirgenmesini içeren su basmış koşullar altında meydana gelmektedir. Tütün, kanola, soya fasulyesi ve *Hydrilla verticillata*'da ki Fe toksisitesine, bitki fotosentezinde ve veriminde azalma, oksidatif stres ve askorbat peroksit aktivitesinde artış eşlik etmektedir. Bitkilerde Fe toksisitesi kökler tarafından yüksek oranda Fe^{+2} alımı ve onun yapraklara terleme akımı yoluyla taşınması ile ilgilidir. Fe^{+2} fazlalığı ise hücresel yapıyı geri dönüşümsüz olarak bozan, membranlara, DNA'ya ve proteinlere zarar veren serbest radikal üretimine neden olmaktadır. Fe toksisitesi yaygın değildir. Ancak bazı bitkiler köklerinden toprak pH'ını düşüren asitler salgılar. Bu nedenle de, bu bitkiler çok fazla Fe alabilir ve bu da toksisiteye neden olabilir [7].

1.6. *Vicia faba* L.

Vicia faba (bakla) gelişmekte olan ülkelerde insan yiyeceği, Akdeniz ve Uzak Doğunun endüstrileşmiş ülkelerinde ise daha çok hayvan yemi olarak tüketilmektedir. Ayrıca tarımda toprak nitrojen artırıcı olarak da kullanılmaktadır. Kurutulmuş yâda taze olarak kullanımı yanında, konserve olarak da işlenebilmektedir. Üreticilerin tohumluk olarak genellikle kendi ürettikleri

tohumlarını kullanması, üretim maliyeti ve gübre ihtiyacının az olması, hastalık ve zararlılarla mücadelesinin kolay olması vb. nedenlerle tercih edilmektedir. Bakla; yüksek konsantrasyonda protein ve karbonhidratlara ek olarak, yüksek oranda lif, vitamin ve kandaki trigliserit ve kolesterol seviyelerini düşüren maddeler de ihtiva etmektedir. Tohumların büyüklüğüne bağlı olarak, *Vicia faba* var. minör, var. equina ve var. majör olarak üç çeşit bakla bulunmaktadır [8, 9].



BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Literatürde *V. faba* türü indikatör olarak kullanılarak gerçekleştirilen çeşitli toksisite çalışmaları ile farklı ağır metal iyonlarının bitkilerin anatomik yapılarına etkileri üzerine gerçekleştirilen bazı çalışmalar bulunmaktadır.

Örneğin;

Çavuşoğlu ve ark. [10] fenolün farklı konsantrasyonlarının (25, 50 ve 75 ppm) sitotoksik etkilerini *V. faba* kök ucu hücrelerinde araştırmışlar,

Çavuşoğlu ve ark. [11] 30 ve 70 ppm dozlarında Cd ve Zn elementlerinin fizyolojik ve genotoksik etkilerini *V. faba* tohumlarında araştırmışlar,

Çavuşoğlu ve ark. [12] Melet (Ordu) ırmağında ölçülen Pb>Al>Ni>Cr>Fe>Cu>Zn>Cd şeklinde ağır metal kirliliğinin toksik etkilerini *V. faba* kök ucu hücrelerinde araştırmışlar,

Çavuşoğlu ve ark. [13] Kızılırmak'ta (Kırıkkale) Pb>Zn>Fe>Cu>Ni>Cd>Hg şeklindeki ağır metal iyonlarının neden olduğu kirliliğin fizyolojik ve genotoksik etkilerini *V. faba* tohumlarını indikatör olarak kullanarak, araştırmışlar,

Çavuşoğlu ve ark. [14] 25, 50 ve 100 mg/L Hg dozlarının *Allium cepa* L. kök anatomisine etkilerini araştırmışlar,

Güler ve ark. [15] 72 saat süresince 2.4, 8.00 ve 12.5 mg/L Cr dozlarına maruz bırakılan *A. cepa* bulblarının kök anatomisindeki değişimleri araştırmışlar,

Girasun ve ark. [16] *A. cepa* köklerinde 50, 100 ve 200 mg/L Pb toksisitesinin anatomik etkilerini araştırmışlar,

Macar ve ark. [17] *A. cepa*'da 20 µM Cu uygulamasının anatomik etkilerini araştırmışlar,

Macar ve ark. [18] 5.5 mg/kg dozunda Co maruziyetin *A. cepa* kök anatomisine etkilerini araştırmışlardır.

Bu çalışmanın amacı, 19. yüzyılın ortalarından itibaren kullanımı aratan ağır metallere biri olan ve doğal yoldan yada insan eli ile oluşturulan çeşitli kaynaklardan maruz kalınabilen Fe ağır metalinin toksik etkilerini fizyolojik ve anatomik parametreler yardımıyla araştırmaktır.



BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Biyolojik Materyal ve Kimyasallar

Biyolojik materyal olarak *Vicia faba* (n=12) tohumları ve test kimyasalı olarak ise demir (III) klorür (FeCl_3) (Merck, CAS Number: 7705-08-0) kullanılmıştır.

3.2. Deney Grupları ve Çimlenme

V. faba tohumlarından her grupta 10 tohum olacak şekilde 4 grup oluşturulmuştur.

Grup I: Kontrol,

Grup II: 25 mg/L FeCl_3 ,

Grup III: 50 mg/L FeCl_3 ,

Grup IV: 100 mg/L FeCl_3 ,

72 saat süresince, kontrol grubu tohumlar çeşme suyu ve uygulama grubu tohumlar ise FeCl_3 'ün 25, 50 ve 100 mg/L dozları ile oda sıcaklığında çimlendirilmişlerdir.

3.3. Fizyolojik Parametre Ölçümleri

Fe ağır metal iyonun *V. faba* kök gelişimine etkisi, radikula oluşumuna göre, uzayan kök uçlarının milimetrik cetvelle, tohum ağırlık kazanımına etkisi ise 72 saatlik uygulama periyodu öncesi ve sonrasında tohum ağırlıklarının hassas terazi yardımıyla ölçülmesiyle belirlenmiştir. Fe'nin tohum çimlenmesine etkisi ise eşitlik (1) yardımıyla tespit edilmiştir [19].

$$\text{Çimlenme Yüzdesi (\%)} = \frac{\text{çimlenen tohum sayısı}}{\text{toplam tohum sayısı}} \times 100 \quad (1)$$

3.4. Anatomik Yapıdaki Değişim

Anatomik hasarların tespiti için, çimlenen *V. faba* kök uçları distile su ile yıkanmış, 1 cm büyüklüğünde kesilerek, köpük materyali arasına yerleştirilmiş ve enine kesitleri alınmıştır. Kesitler lam üzerine konularak, 5 dakika süresince %5'lik Giemsa ile boyanmış, lamelle kapatılarak, IRMECO IM-450 TI marka araştırma mikroskopunda incelenmiştir, anatomik hasarlar tespit edilmiştir [20].



BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Fizyolojik Parametreler

Demir klorür (FeCl_3) uygulamasının *V. faba*'da fizyolojik parametreler üzerine etkisi Tablo 4.1.'de gösterilmiştir. En yüksek çimlenme parametreleri kontrol grubunda ölçülmüştür. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, Fe uygulaması çimlenme yüzdesi, kök uzunluğu ve tohum ağırlık kazanımında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) azalmalara neden olmuştur. Bu azalmaların ise uygulanan Fe dozuna bağlı olduğu, bu bağlamda en fazla azalışın 100 mg/L Fe dozunda olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 100 mg/L dozunda Fe uygulanan Grup IV'de çimlenme yüzdesi yaklaşık 1.82 kat, kök uzunluğu 2.92 kat ve ağırlık kazanımı ise 6.62 kat azalmıştır. Fe uygulaması sonucunda fizyolojik parametrelerde görülen bu azalmanın Fe'nin *V. faba* tohumlarının su ve mineral madde alımını azaltmasından kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir. Zira literatürde toksik düzeyde metal iyonları içeren çözeltilerde yetiştirilen bitkilerin çeşitli organlarında su içeriğinin azaldığı bildirilmiştir. Daha kapsamlı bir şekilde ifade etmek gerekirse, bitki köklerinin temel işlevleri su ve inorganik besin maddelerinin emilmesi, bitki gövdesini desteklemesi, toprağa sabitlenmesi, besin ve besin maddelerinin depolanmasıdır. Kökler aynı zamanda bitkinin ağır metal iyonları ile ilk temas bölgeleridir. Bu nedenle de, toprak üstü bitki kısımlarına göre içlerinde daha yüksek miktarlarda ağır metal biriktirirler. Kök dokularındaki bu ağır metal iyonları da topraktan su emilimini etkileyebilir ve dolayısıyla kökteki su içeriğini azaltabilir. Bu durum Cd, Ni ve Zn'ye maruz kalan kök dokularında deneysel olarak da gösterilmiştir. Ağır metallerin bitki su ilişkileri üzerindeki etkisi, topraktaki su mevcudiyeti, kök gelişimi, su alımını sınırlama ve diğer fitotoksik etkiler üzerindeki etkilerinden ayırt edilmelidir [21, 22]. Litaratürde ağır metal iyonları ve diğer bazı kimyasal maddelerin *V. faba*'da fizyolojik parametrelerde azalmaya neden olduğunu gösteren bazı çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin Çavuşoğlu ve ark. [10] 25, 50 ve 75 ppm dozlarında fenolün fizyo-toksik etkilerini *V. faba* tohumlarında araştırmışlardır.

Sonuçta fenole maruz bırakılan *V. faba* tohumlarında çimlenme yüzdesi, kök uzunluğu ve ağırlık kazanımının, uygulanan fenol dozuna bağlı olarak azaldığını rapor etmişlerdir. Benzer bir çalışmada, Çavuşoğlu ve ark. [11] 30 ve 70 ppm dozlarında Cd ve Zn metallerinin *V. faba* da teşvik ettiği fizyolojik değişimleri araştırmışlardır. Sonuçta, her iki metal için de, uygulama dozuna bağlı olarak çimlenme yüzdesi, kök uzunluğu ve ağırlık kazanımının azaldığını, bu azalışın ise Cd uygulanan tohumlarda daha da belirgin olduğu gözlemlemişlerdir. Bir diğer çalışmada ise Çavuşoğlu ve ark. [12] *V. faba* türünü indikatör olarak kullanarak, Türkiye'nin ekonomik öneme sahip nehirlerinden biri olan Melet (Ordu) ırmağındaki ağır metal kirliliğini ve bu kirliliğin tohum fizyoloji üzerine etkilerini araştırmışlardır. Sonuçta suda Pb>Al>Ni>Cr>Fe>Cu>Zn>Cd iyonlarından kaynaklı bir ağır metal kirliliğin olduğunu, bunun da *V. faba* tohumlarının çimlenme yüzdesi, kök uzunluğu ve ağırlık kazanımında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) azalmalara neden olduğunu tespit etmişlerdir. Bir başka çalışmada ise Çavuşoğlu ve ark. [13] Kızılırmak nehrinin Kırıkkale'den geçen kısmındaki ağır metal kirliliğini ve bu kirliliğin fizyolojik etkilerini *V. faba* türünü indikatör olarak kullanarak araştırmışlardır. Sonuçta suda Pb>Zn>Fe>Cu>Ni>Cd>Hg iyonlarından oluşan bir kirliliğin olduğunu, bunun da *V. faba* tohumlarının çimlenme yüzdesi, kök uzunluğu ve ağırlıklarında azalmaya neden olduğunu belirlemişlerdir.

Tablo 4.1. Fe uygulamasının *V. faba* fizyolojisine etkileri

Fizyolojik parametreler	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
Çimlenme (%)	100 ^a	84 ^b	72 ^c	55 ^d
Kök uzunluğu	3,50±0,78 ^a	2,90±0,63 ^b	2,00±0,55 ^c	1,20±0,44 ^d
Ağırlık kazanımı	+2,78 ^a	+1,80 ^b	+1,10 ^c	+0,42 ^d

*Grup I: kontrol, Grup II: 25 mg/L FeCl₃, Grup III: 50 mg/L FeCl₃, Grup IV: 100 mg/L. Veriler ortalama ± SD olarak gösterilmiştir. Çimlenme yüzdesinin belirlenmesinde 30 adet, kök uzunluğu ve ağırlık kazanımının tespiti için ise 10 adet tohum kullanılmıştır. Aynı satır içerisinde farklı harfler^(a-d) ile gösterilen ortalamalar istatistik olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

4.2. Anatomik Parametreler

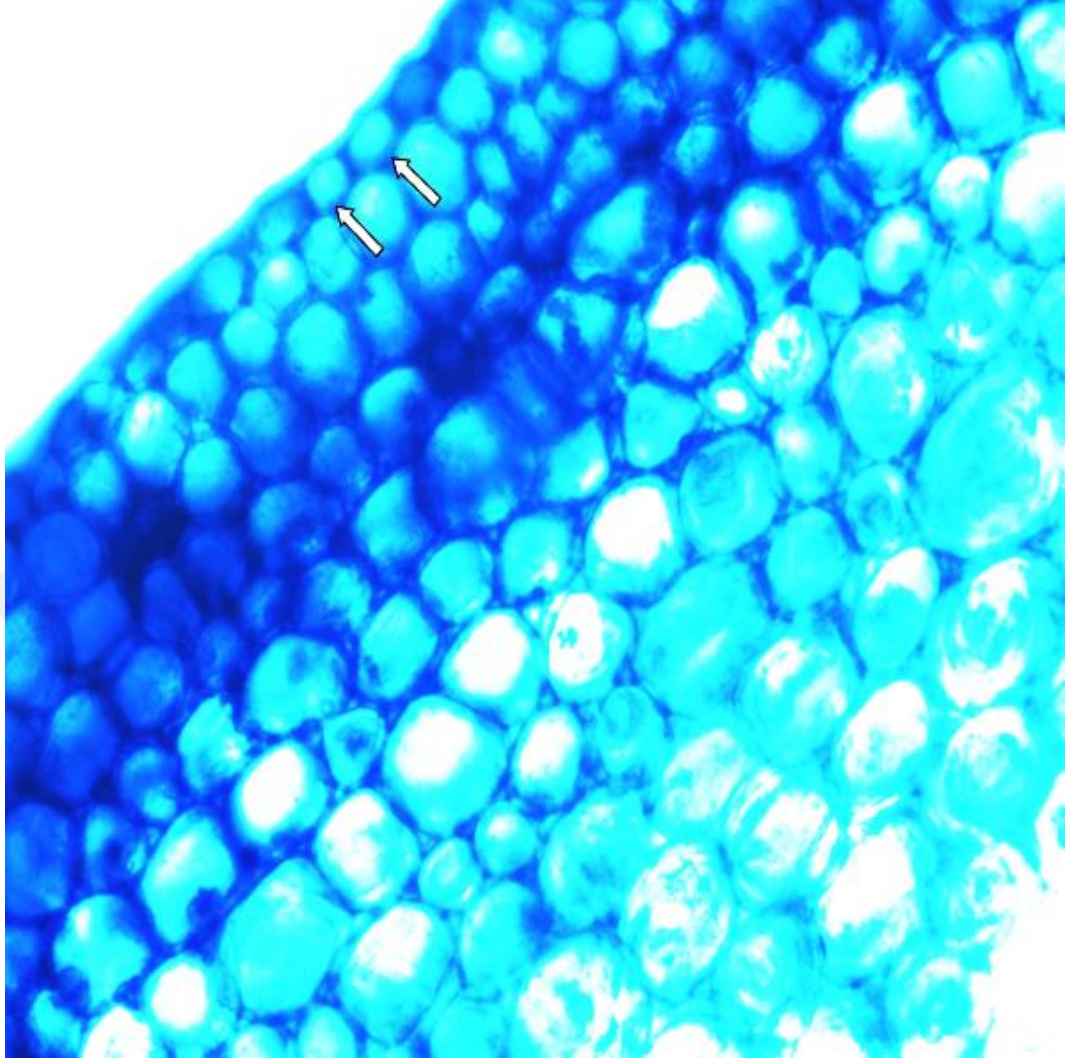
Demir klorür (FeCl_3) uygulamasının *V. faba* kök anatomisine etkileri Tablo 4.2. ve Şekil 4.1.-4.8.'de gösterilmiştir. Kontrol grubu *V. faba* tohumlarının kök anatomisinde her hangi bir meristematik hücre hasarı gözlenmemiştir. Farklı dozlarda (25, 50 ve 100 mg/L) Fe maruz kalan kök ucu meristematik hücrelerinde ise şiddeti uygulanan Fe dozu ile değişmek suretiyle, epidermis hücre hasarı, çekirdek büyümesi (*dev çekirdek*), korteks hücre çeperinde kalınlaşma ve belirgin olmayan iletim doku şeklinde anatomik hasarlar tespit edilmiştir. Bu hasarlardan özellikle korteks hücre çeperinde kalınlaşmanın *V. faba*'nın Fe ağır metalinin toksik etkilerini azaltmak, diğer bir ifadeyle hücre içerisine Fe girişini azaltmak için geliştirdiği savunma mekanizmalarından olduğu, epidermis hücre hasarının ise *V. faba*'nın yine aşırı dozdaki Fe iyonlarını hücre içine almamak için epidermis hücrelerinin sayısını arttırması, bunun sonucu olarak da, hücrelerin bir birlerine mekanik baskı uygulamaları nedeniyle, bu hasarın olduğu düşünülmektedir. Zira literatürde bitkilerin ağır metal iyonları gibi toksik ajanların hücre içerisine girişini azaltmak için fitoşelatin, metallotionein ve prolin sentezini arttırdıkları, ağır metalleri bitki boşluklarında (*kofullarda*) biriktirdikleri, hücre ve tabaka sayısını arttırdıkları ve çeper kalınlaşması meydana getirdikleri rapor edilmiştir [17, 23, 24]. Literatürde ağır metal iyonlarının bitki kök anatomisine etkileri üzerine gerçekleştirilmiş bazı çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin Çavuşoğlu ve ark. [14] 25, 50 ve 100 mg/L dozlarında Hg maruziyetinin *A. cepa* kök anatomisine etkilerini araştırmışlardır. Sonuçta, maruz kalınan Hg dozu ile şiddeti artan şekilde, *A. cepa* kök ucu hücrelerinde belirgin olmayan iletim doku, korteks hücre çeperinde kalınlaşma, hücre deformasyonu, nekroz, yassılaşmış hücre çekirdeği ve korteks hücrelerinde bazı maddelerin birikimi şeklinde anatomik hasarlar rapor etmişlerdir. Benzer şekilde, Güler ve ark. [15] 2.4, 8.00 ve 12.5 mg/L Cr dozlarına maruz bırakılan *A. cepa* bulbarının kök anatomisindeki değişimleri araştırmışlardır. Sonuçta, Cr maruziyetinin *A. cepa* kök ucu meristematik hücrelerinde korteks hücre çeperinde kalınlaşma, nükleus yassılaşması, nekroz ve hücre deformasyonu şeklinde anatomik hasarları teşvik ettiğini belirlemişlerdir. Benzer bir çalışmada, Girasun ve ark. [16] *A. cepa* kök meristematik hücrelerinde 50, 100 ve 200 mg/L Pb toksisitesinin anatomik

etkilerini araştırmışlardır. Sonuçta, kök ucu hücrelerinde, şiddeti uygulanan Pb dozu ile değişen şekilde nekroz, korteks hücre çeperinde kalınlaşma, belirgin olmayan iletim doku ve hücre deformasyonu şeklinde anatomik hasarlar tespit etmişlerdir. Bir diğer çalışmada, Macar ve ark. [17] *A. cepa*'da 20 µM Cu uygulamasının kök anatomisine etkilerini araştırmışlardır. Sonuçta, Cu uygulamasının kök hücrelerinde deformasyon, binukleuslu hücre, yassılaşmış hücre çekirdeği ve korteks hücre çeperinde kalınlaşma gibi anatomik değişimlere neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Yine bir başka çalışmada ise Macar ve ark. [18] 5.5 mg/kg dozunda Co maruziyetinin *A. cepa* kök anatomisine etkilerini araştırmışlardır. Sonuçta, Co maruziyetinin kök meristematik hücrelerinde epidermis hücre hasarı, kortek hücre duvarında kalınlaşma ve yassılaşmış hücre çekirdeği şeklindeki anatomik hasarları teşvik ettiğini göstermişlerdir.

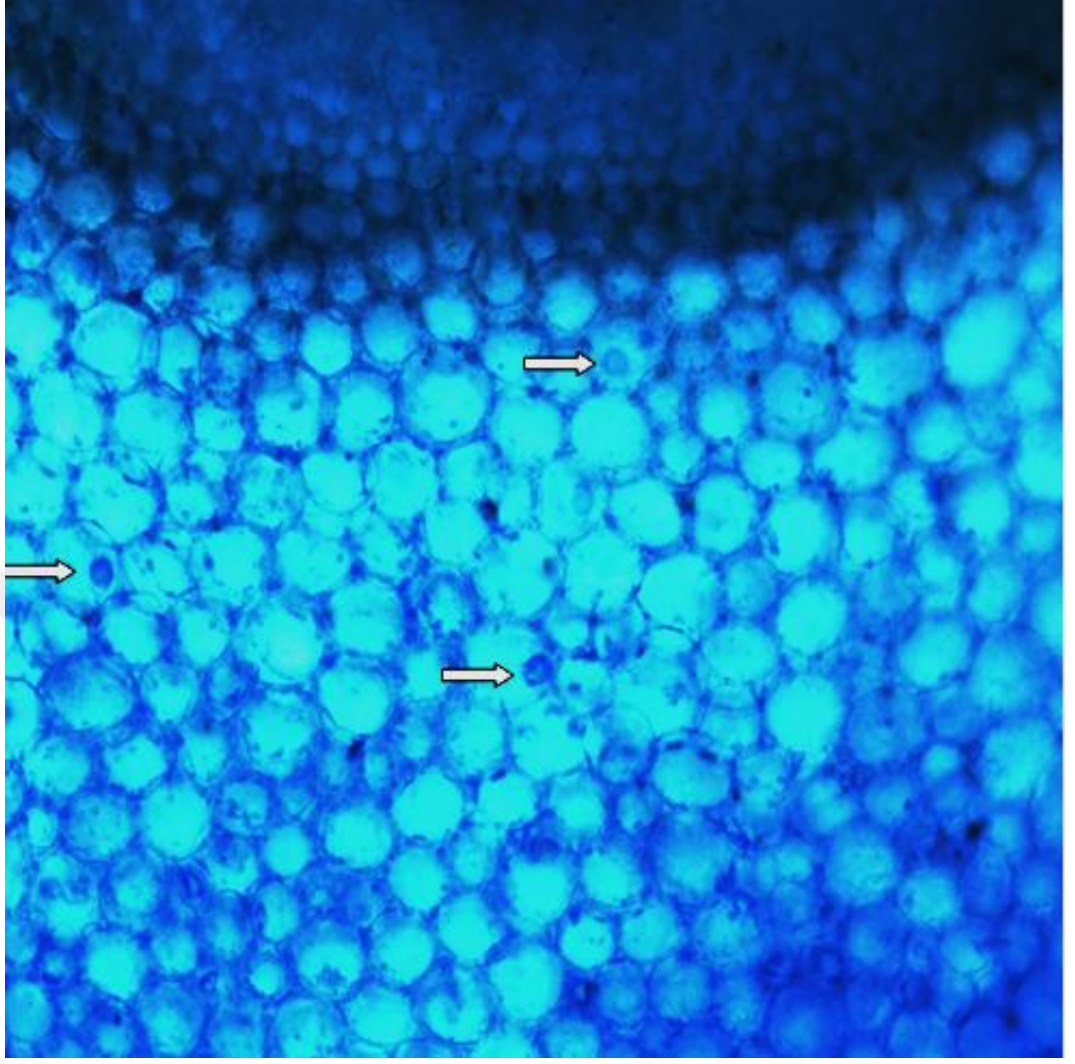
Tablo 4.2. Fe'nin *V. faba* kök ucu meristem hücrelerinde teşvik ettiği anatomik hasarlar

Anatomik Hasarlar	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
Epidermis hücre hasarı	-	+	++	+++
Korteks hücre çeperinde kalınlaşma	-	+	++	+++
Dev hücre çekirdeği	-	+	+	++
Belirgin olmayan iletim doku	-	+	+	++

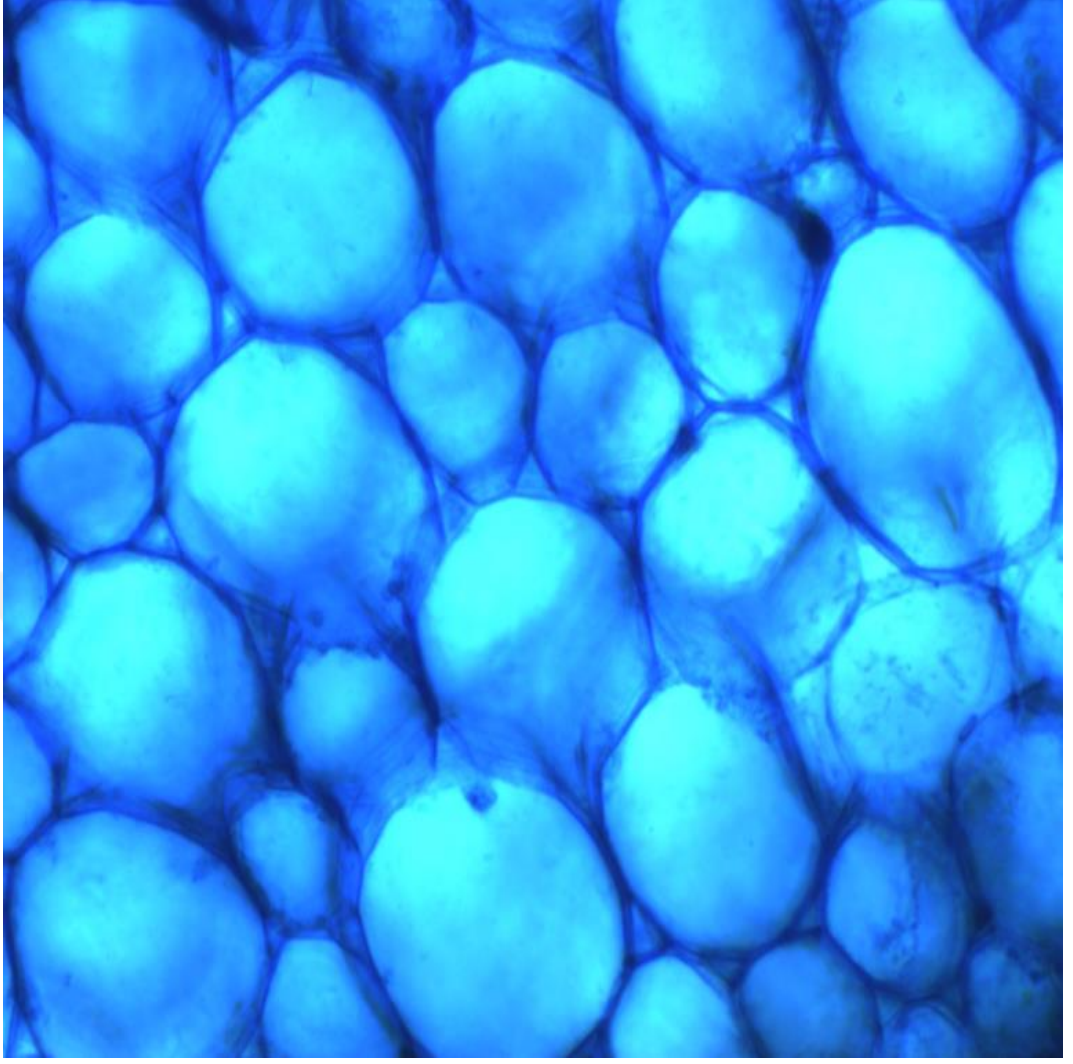
*Grup I: kontrol, Grup II: 25 mg/L FeCl₃, Grup III: 50 mg/L FeCl₃, Grup IV: 100 mg/L FeCl₃. (-): hasar yok, (+): az hasar, (++) : orta hasar, (+++) : şiddetli hasar.



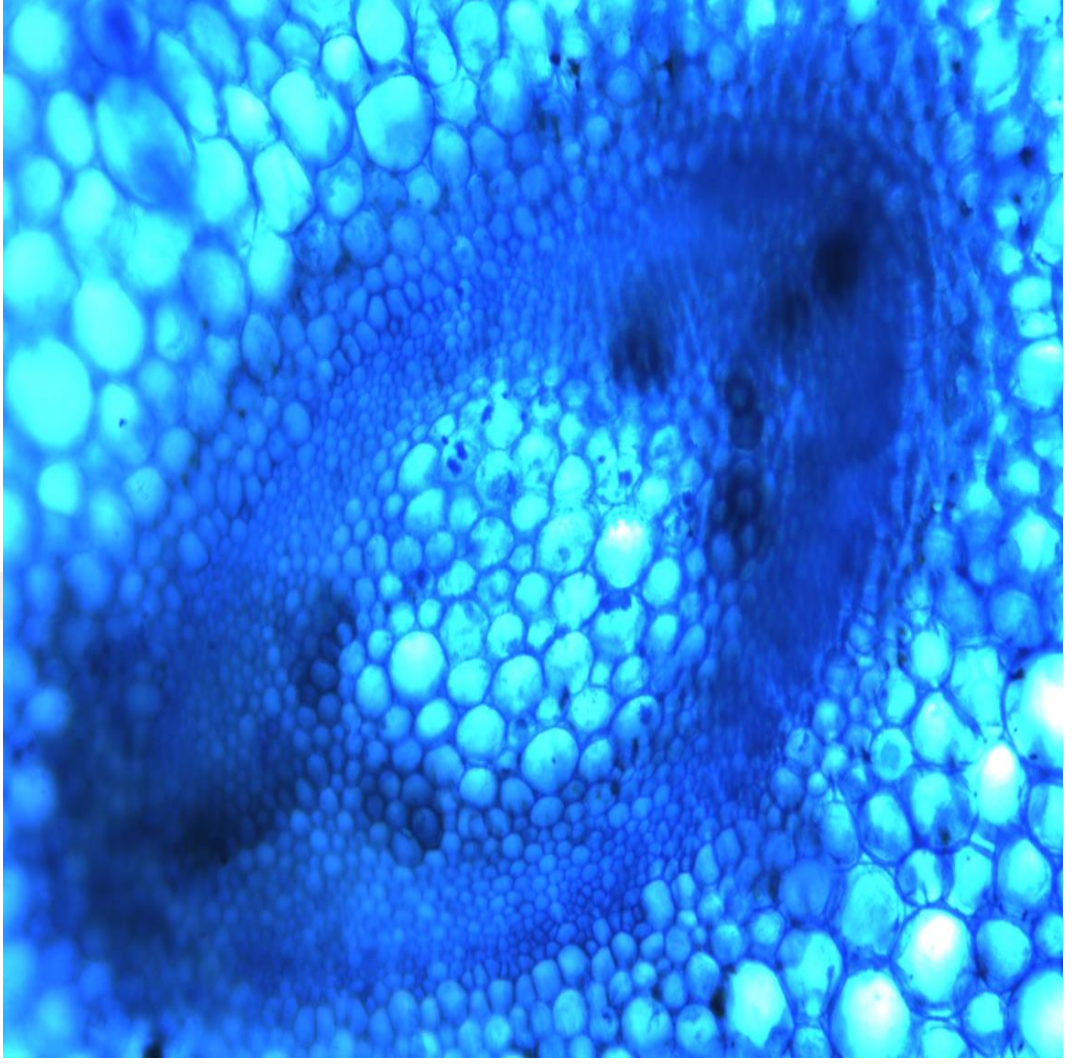
Şekil 4.1. Epidermis hücrelerinin normal görünümü (x100)



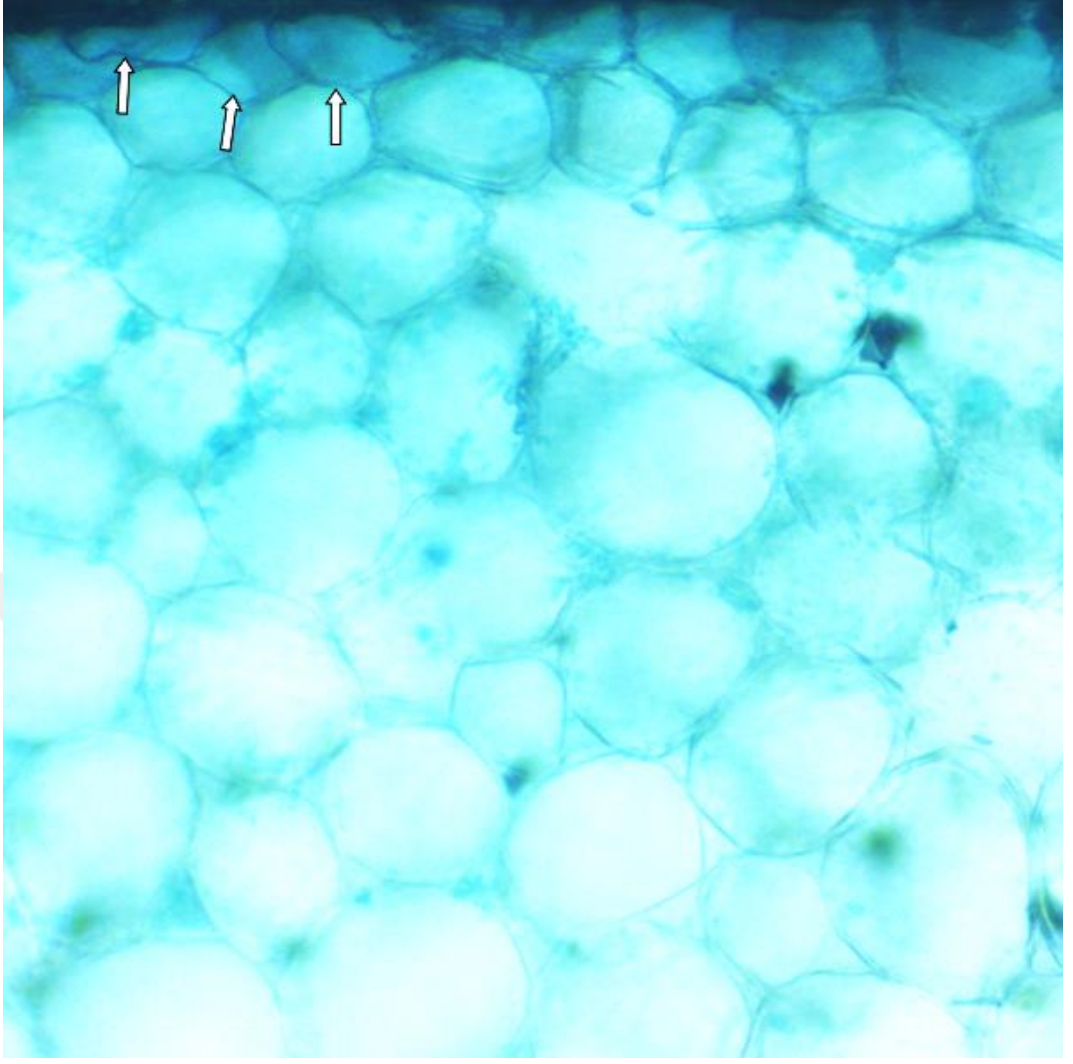
Şekil 4.2. Hücre nukleusunun normal (*oval*) görünümü (x100)



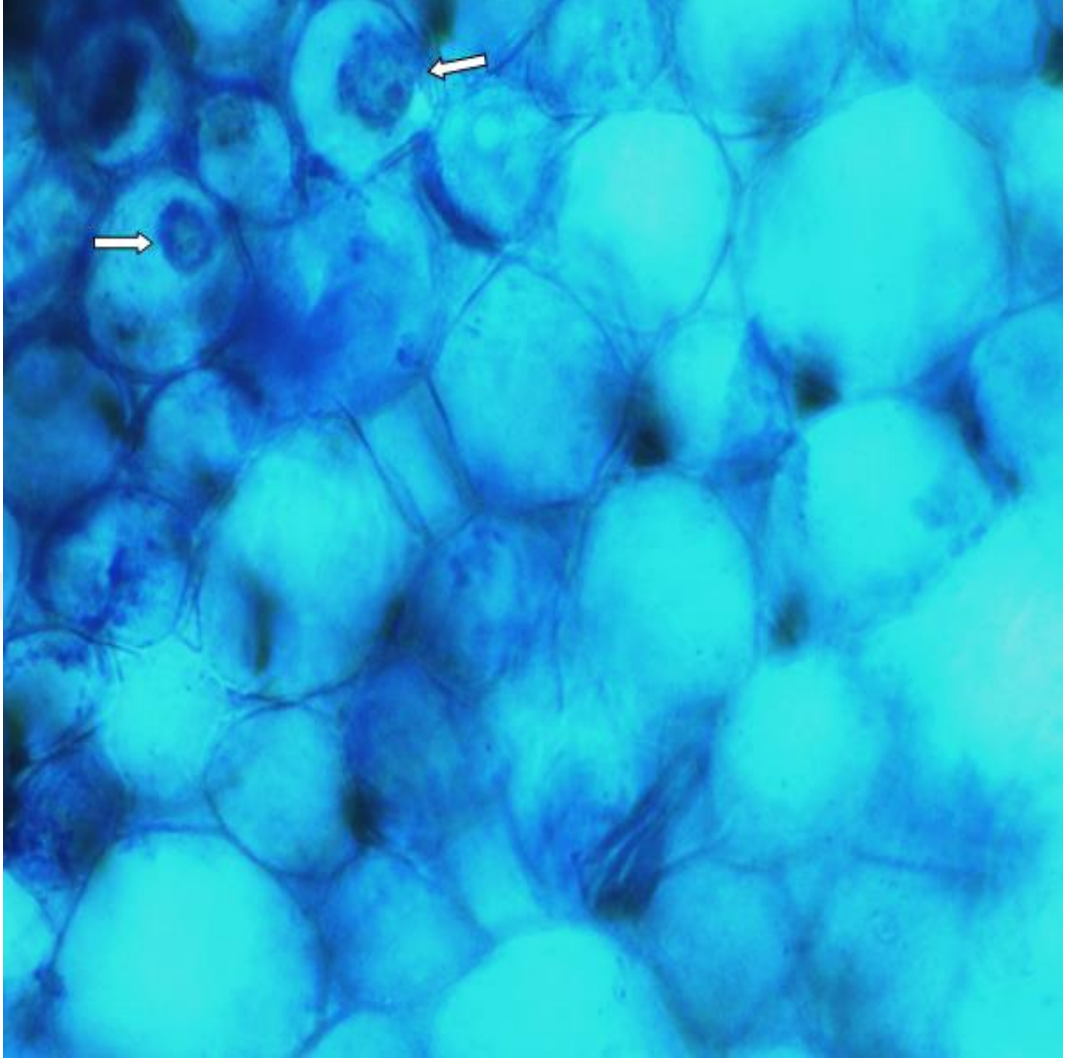
Şekil 4.3. Korteks hücrelerinin normal görünümü (x100)



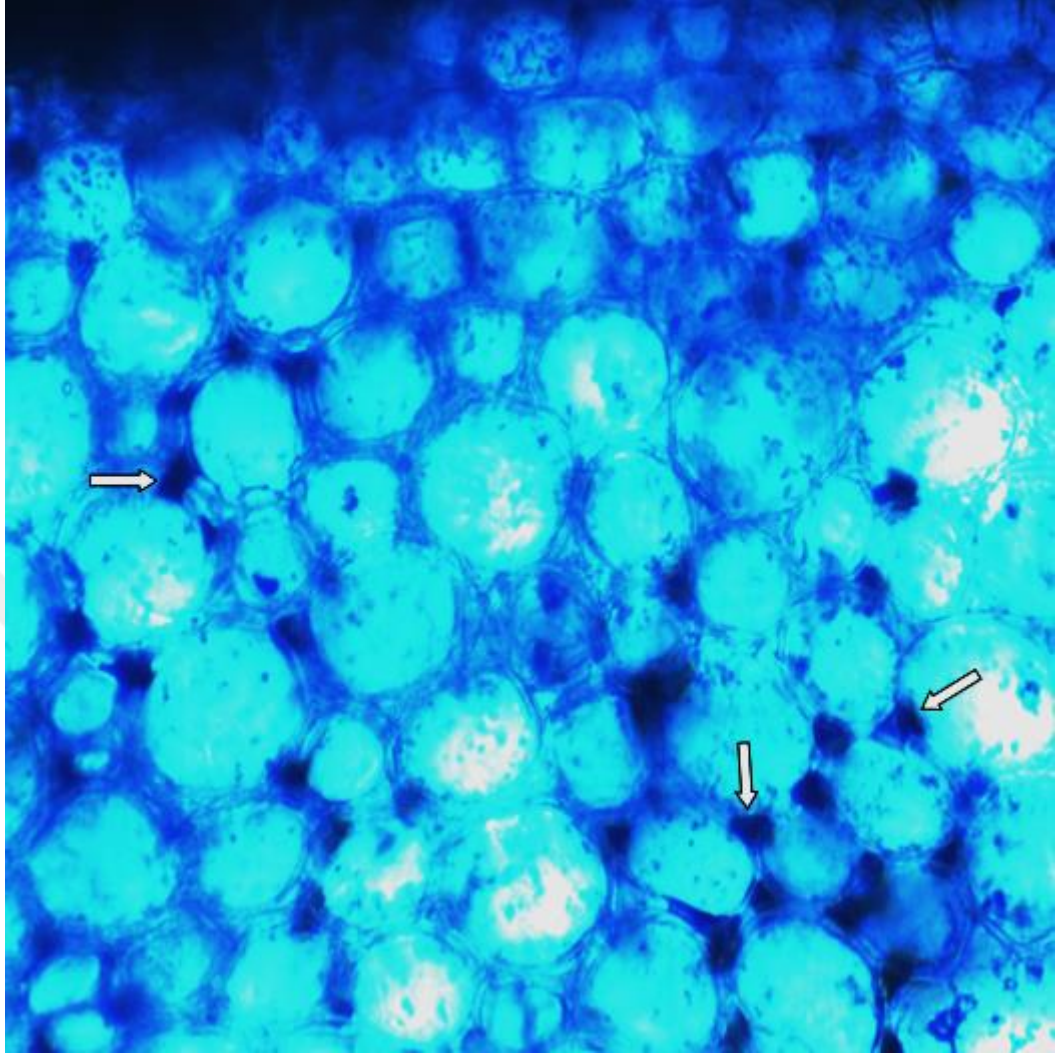
Şekil 4.4. İletim dokunun normal görünümü (x50)



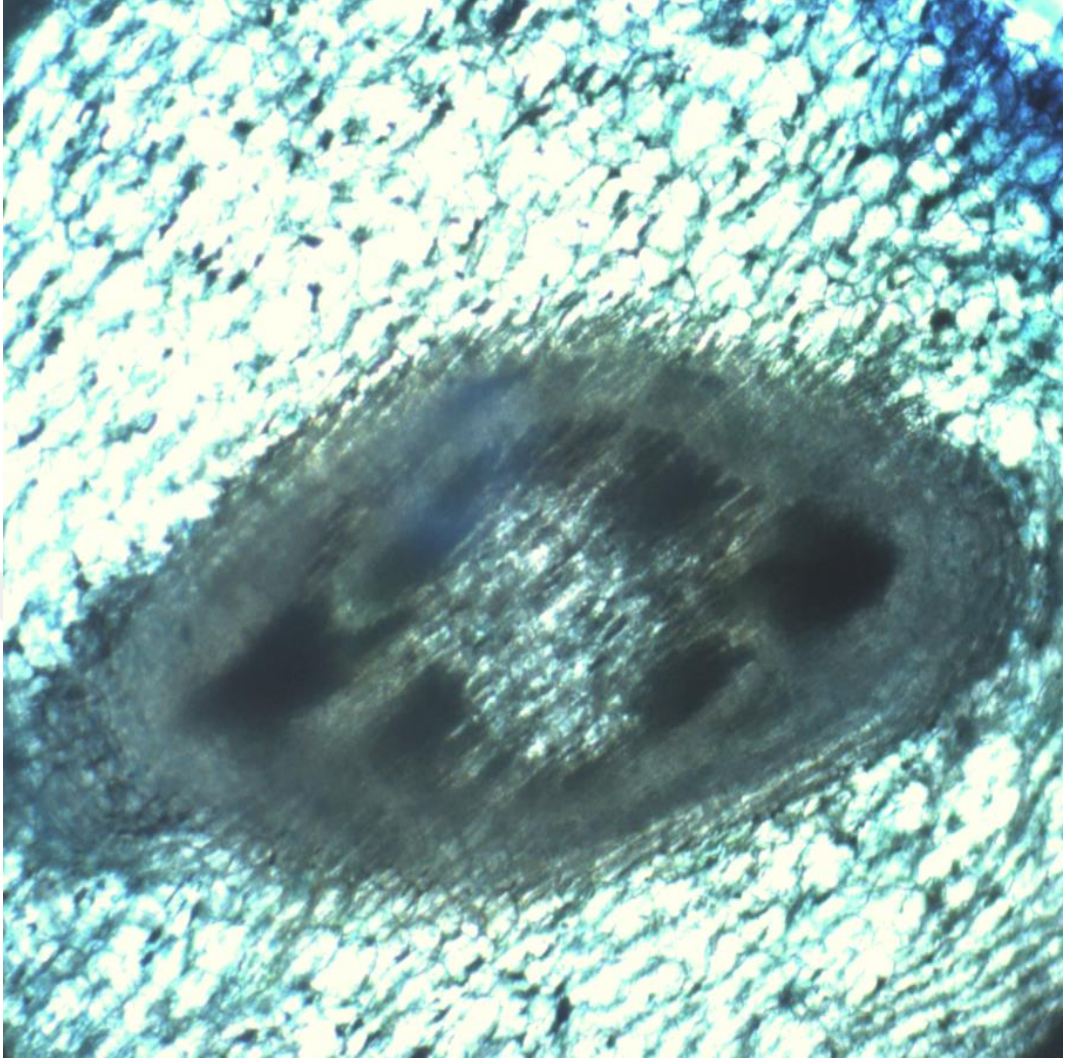
Şekil 4.5. Epidermis hücre hasarı (x100)



Şekil 4.6. Dev hücre çekirdeği (x100)



Şekil 4.7. Korteks hücre çevresinde kalınlaşma (x100)



Şekil 4.8. İletim dokunun belirgin olmayan görünümü (x50)

BÖLÜM 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Fe ağır metali, canlılar için metabolik faaliyetlerin devamında oldukça hayati öneme sahip bir iz element olmasına rağmen, aşırı dozlarının toksisiteye neden olabileceği, *V. faba* test materyali indikatör olarak kullanılarak, fizyolojik ve anatomik parametreler yardımıyla gösterilmiştir.

Bu nedenle, gerek tarım sektöründeki ürünlerin sulanması, yetiştirilmesi ve paketlenmesinde, gerekse de Fe elementinden yararlanan diğer sektörlerde Fe kullanımının azaltılması ve kontaminasyonun önlenmesi büyük önem arz etmektedir. Aksi durumda Fe kaynaklı toksisitenin gözlenmesi, bitkilerde verimin azalması yâda canlılarda çeşitli sağlık sorunlarının ortaya çıkması kaçınılmaz olacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Duruibe J.O., Ogwuegbu M.O.C., Egwurugwu J.N., Heavy metal pollution and human biotoxic effects. Int. J. Physic. Sci., 2(5), 112-118, 2007.
- [2] Morais, S., Costa, F.G., Pereira, M.D.L. (2012). Heavy Metals And Human Health. Environmental Health–emerging Issues and Practice, 10(1), 227-245.
- [3] Sharma, A., Kaur, M., Katnoria, J. K., Nagpal, A. K., Heavy metal pollution: A global pollutant of rising concern. In: Toxicity and Waste Management using Bioremediation. IGI Global, 1-26, 2016.
- [4] Jaishankar M., Tseten T., Anbalagan N., Mathew B.B., Beeregowda K.N., Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. Interdiscip. Toxicol., 7(2), 60-72, 2014.
- [5] <https://tr.wikipedia.org/wiki/Demir.>, Erşim Tarihi: 17.06.2021.
- [6] Jan A.T., Azam M., Siddiqui K., Ali A., Choi I., Haq Q.M., Heavy metals and human health: mechanistic insight into toxicity and counter defense system of antioxidants. Int. J. Mol. Sci., 16(12), 29592-29630, 2015.
- [7] Asati A., Pichhode M., Nikhil K., Effect of heavy metals on plants: an overview. IJAIEEM., 5(3), 56-66, 2016.
- [8] Artik C., Pekşen E., Gama ışınlanmasının M2 generasyonunda bakla (*Vicia faba* L.)'nın stoma özellikleri üzerine etkileri. OMÜ Zir. Fak. Dergisi, 21(2), 195-203, 2006.
- [9] Çavusoğlu K., Yalçın E., Dönmez S., Kaymaz K., Özdemir G., Özgörür Z., Çakır M., *Vicia faba* L.(Fabaceae) kök ucu hücrelerinde fenol tarafından teşvik edilen sitotoksitenin belirlenmesi. SDÜ J. Sci., 3(2), 139-148, 2008.
- [10] Çavuşoğlu K., Yalçın E., Ergene A., The Cytotoxic Effects of Zinc and Cadmium Metal Ions on Root Tip Cells of *Phaseolus vulgaris* L.(Fabaceae). SDU J. Sci., 4(1), 1-11, 2009.
- [11] Cavusoglu K., Yapar K., Kinalioglu K., Turkmen Z., Cavusoglu K., Yalcin E., Protective role of *Ginkgo biloba* on petroleum wastewater-induced toxicity in *Vicia faba* L.(Fabaceae) root tip cells. J. Environ. Biol., 31(3), 319-324, 2010.

- [12] Cavusoglu K., Yalcin E., Ergene A., The investigation of cytotoxic effects of refinery wastewater on root tip cells of *Vicia faba* L. J. Environ. Biol., 31(4), 465-470, 2010.
- [13] Çavuşoğlu K., Acar A., Yalçın E., Cıva (Hg) ağır metal iyonunun *Allium cepa* L. (soğan)'da teşvik ettiği fizyolojik, sitogenetik ve anatomik değişimlerin araştırılması. DÜBİTED., 6(4), 887-892, 2018.
- [14] Gürel N.O., Çavuşoğlu K., Yalçın E., *Allium cepa* L.'da krom (K₂Cr₂O₇)'un toksik etkilerinin araştırılması. GBAD., 7(3), 146-158, 2018.
- [15] Girasun N., Yalçın E., Acar A., Çavuşoğlu K., Çavuşoğlu K., *In vivo* Pb (NO₃)₂ toksisitenin fizyolojik, sitogenetik ve anatomik parametreler ile araştırılması. KSU J. Agric Nat., 22(5), 702-707, 2019.
- [16] Macar O., Macar T.K., Çavuşoğlu K., Yalçın E., Determination of protective effect of carob (*Ceratonia siliqua* L.) extract against cobalt (II) nitrate-induced toxicity. Environ. Sci. Pollut. Res., 27(32), 40253-40261, 2020.
- [17] Macar T.K., Macar O., Yalçın E., Çavuşoğlu K., Resveratrol ameliorates the physiological, biochemical, cytogenetic, and anatomical toxicities induced by copper (II) chloride exposure in *Allium cepa* L. Environ. Sci. Pollut. Res., 27(1), 657-667, 2020.
- [18] Atik M., Karagüzel O., Ersoy S., Sıcaklığın *Dalbergia sissoo* tohumlarının çimlenme özelliklerine etkisi. Mediterr. Agric. Sci., 20, 203-208, 2007.
- [19] Żmudziński D., Goik U., Ptaszek P., Functional and rheological properties of *Vicia faba* L. protein isolates. Biomolecules, 11(2), 178, 2021.
- [20] Akgündüz M.Ç., Çavuşoğlu K., Yalçın E., The potential risk assessment of phenoxyethanol with a versatile model system. Sci. Rep., 10(1), 1-10, 2020.
- [21] Jan, S., Parry, J.A., Heavy metal uptake in plants. In: Approaches to Heavy Metal Tolerance in Plants. Springer, Singapore, 1-18, 2016.
- [22] Rucińska-Sobkowiak R., Water relations in plants subjected to heavy metal stresses. Acta Physiol. Plant., 38(11), 1-13, 2016.
- [23] Emamverdian A., Ding Y., Mokherdoran F., Xie Y., Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. Sci. World J., 2015, 1-18, 2015.
- [24] Emamverdian A., Ding Y., Effects of heavy metals' toxicity on plants and enhancement of plant defense mechanisms of Si-mediation "Review. IJOEAR., 3(4), 41-51, 2017.



ÖZGEÇMİŞ

Temel Batuhan KILIÇOĞLU İlk ve Ortaokul eğitimini Giresun ili Görele ilçesinde ve Lise eğitimini ise Trabzon Beşikdüzü'nde tamamladı. 2010 yılında Beşikdüzü Atatürk Lisesi'nden mezun oldu. 2013 yılında başladığı Giresun Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nü 2016 yılında bitirdi. 2020 yılında başladığı Giresun Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimini Şubat 2022'de başarıyla tamamladı.

