

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**Gonca KESER**

***Nasturtium officinale* R. Br.'DE KURŞUNUN STRESE BAĞLI ENZİMLERİN  
AKTİVİTELERİNE, GELİŞMEYE, MİNERAL VE KLOROFİL İÇERİĞİNE  
ETKİLERİ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ADANA, 2005**

**ÖZ**  
**DOKTORA TEZİ**

***Nasturtium officinale* R. Br.'DE KURŞUNUN STRESE BAĞLI ENZİMLERİN  
AKTİVİTELERİNE, GELİŞMEYE, MİNERAL VE KLOROFİL İÇERİĞİNE  
ETKİLERİ**

**Gonca KESER**  
**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Danışman:** Doç. Dr. Saadet SAYGIDEĞER

**Yıl:** 2005, **Sayfa:** 95

**Jüri:** Doç. Dr. Saadet SAYGIDEĞER

Doç. Dr. Oya IŞIK

Doç. Dr. H. Yıldız DAŞGAN

Yrd. Doç. Dr. Elif ORUÇ

Yrd. Doç. Dr. Nisa ÜNALDI CORAL

Sunulan bu çalışmada, doğal ortamından toplanan *N. officinale* R. Br. kontrollü şartlar altında kurşunun farklı derişimlerinin etkisinde (0, 25, 50, 100, 200, 250 ve 500 ppm) 14 gün boyunca bırakılmıştır. Uygulama periyodu sonunda fotosentetik pigment, su içeriği, lipid peroksidasyonu, Mn, Cu, Mg, Ca, Fe, Zn, Pb miktarları, antioksidant enzimler süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon redüktaz (GR), askorbat peroksidaz (AP) ve katalaz (CAT) aktiviteleri ile belirlenmiştir. *N. officinale*'nin gövde ve yapraklarındaki Pb miktarlarının uygulanan metal miktarıyla artmıştır. Düşük Pb (25-50 ppm) derişimleriyle muamele edilen *N. officinale*'nin yaprak dokularında fotosentetik pigment içeriklerin artmıştır. Uygulanan Pb derişimine bağlı olarak kök, gövde ve yapraklarda su içeriği azalmıştır. 200, 250 ve 500 ppm Pb derişimlerinde Mn ve Cu miktarları azalmıştır. Kurşunun yüksek konsantrasyonları (250-500 ppm) Ca ve Fe miktarlarını arttırırken Mg miktarını azaltmıştır. Dokularda Pb derişimi uygulama miktarıyla artmıştır. Pb muameleli bitkiler yapraklarında malondialdehit içeriğinin artışının kanıtı olan lipid peroksidasyonu artma göstermiştir. Kurşun stresi antioksidant enzimlerin aktivitesinde önemli değişikliklere neden olmuştur. Gövdede SOD, AP, CAT ve GR aktiviteleri 500 ppm derişiminde azalmıştır. Sonuçlar 500 ppm Pb'nin toksik konsantrasyon olduğunu ve Pb toksisitesinin oksidatif stresi ve bitki kısımlarında antioksidant enzimleri farklı şekilde tetiklediğini göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** *Nasturtium officinale*, kurşun, antioksidant enzimler, lipid peroksidasyonu, gelişme.

## ABSTRACT

### PhD THESIS

**EFFECTS OF LEAD ON THE ACTIVITIES OF STRESS RELATED ENZYMES, CONTENTS OF MINERAL AND CHLOROPHYLL, AND GROWTH IN *Nasturtium officinale* R. Br.**

**Gonca KESER**

**UNIVERSITY OF ÇUKUROVA**

**INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

**DEPARTMENT OF BIOLOGY**

**Supervisor:** Assoc. Prof. Dr. Saadet SAYGIDEĞER

**Year:** 2005, **Page:** 95

**Jury:** Assoc. Prof. Dr. Saadet SAYGIDEĞER  
Assoc. Prof. Dr. Oya IŞIK  
Assoc. Prof. Dr. H. Yıldız DAŞGAN  
Asisst. Prof. Dr. Elif ORUÇ  
Asisst. Prof. Dr. Nisa ÜNALDI CORAL

In the present study, *Nasturtium officinale* R. Br. collected from natural environment, was treated with different lead concentrations (0, 25, 50, 100, 200, 250 and 500 ppm) for 14-days in controlled conditions. At the end of the treatment period, contents of photosynthetic pigments, contents of water, lipid peroxidation, amounts of Mn, Cu, Mg, Ca, Zn, Fe, Pb and antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GR), ascorbat peroxidase (AP) and catalase (CAT) were determined. Pb amounts in stems and leaves of *N. officinale* were increased with applied metal concentrations. The increase was determined at photosynthetic pigment contents in leave tissues of *N. officinale* treated with low Pb concentrations (25-50 ppm), while high Pb concentrations (200-500 ppm) resulted in decrease. The water content decreased in the roots, stem and leaves with an increase in Pb supply. The amounts of Mn and Cu were decreased in the stem and leaves at 200, 250 and 500 ppm Pb concentrations. Higher concentration of lead (250-500 ppm) has been attributed to increased amounts of Ca and Fe, while the amounts of Mg was decreased. The tissue concentration of Pb increased with an increasing level of supply. Lead treated plants showed increased levels of lipid peroxidation as evidenced from the increased malondialdehyde content in leaves. Lead stress caused significant changes in the activity of antioxidative enzymes. Activities of SOD, AP, CAT, GR were decreased in the stems at 500 ppm Pb concentrations. The results indicate that a toxic concentration of lead 500 ppm and Pb toxicity induce oxidative stress and differential responses of antioxidant enzymes in plant parts.

**Key words:** *Nasturtium officinale*, lead, antioxidant enzymes, lipid peroxidation, growth.

## **TEŞEKKÜR**

Gerek lisans öğrenimim gerekse yüksek lisans ve doktora çalışmalarım boyunca bana gösterdiği yakın ilgi ve desteğinden dolayı Sayın Hocam Doç. Dr. Saadet SAYGIDEĞER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca benden yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Oya IŞIK'a, Doç. Dr. Levent ÖZTÜRK'e, Yrd. Doç. Dr. Elif ORUÇ'a, Yrd. Doç. Dr. Selim EKER'e, Dr. Muhittin DOĞAN'a ve Uzman Biyolog Sezai SARP KAYA'ya da teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana maddi ve manevi desteğini esirgemeyen başta çocuklarım olmak üzere tüm aileme sonsuz şükranlarımı sunarım.

<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>SAYFA</b>
ÖZ .....	I
ABSTRACT .....	II
TEŞEKKÜR .....	III
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	IX
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XI
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Ağır Metaller .....	2
1.1.1. Ağır Metallerin Genel Özellikleri .....	2
1.1.2. Ağır Metallerin Biyokimyasal Özellikleri .....	3
1.1.3. Ağır metallerin Bitkiler Tarafından Alınması .....	4
1.2. Kurşun .....	5
1.2.1 Özellikleri ve Kullanımı .....	5
1.2.2. Kurşunun Bitkilere Toksik Etkileri .....	8
1.2.3. Kurşunun İnsanlara Toksik Etkileri .....	9
1.2.4. Kurşunun Biyokimyasal Etkileri .....	9
1.3. Oksidatif Stres ve Oksijenin Aktifleşmesi .....	10
1.3.1. Hücrelerde Reaktif Oksijen Üretimi .....	12
1.3.2. Kloroplastlarda Reaktif Oksijen Üretimi .....	12
1.3.3. Kloroplastların Dışında Reaktif Oksijen Türlerinin Üretimi .....	14
1.4. Reaktif Oksijen Türleri .....	15
1.5. Koruyucu Antioksidant Savunma Sistemleri.....	18
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....	24
3. MATERYAL VE METOD .....	28
3.1. Materyal .....	28
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Bitki Materyali .....	28
3.1.2. Kullanılan Çözeltiler .....	30
3.2. Metod .....	30
3.2.1. Bitkilerin Muamele Ortamı ve Düzenegi .....	31

3.2.2. Bitki Örneklerinin Analize Hazırlanması .....	32
3.2.3. Mineral Element Analizleri .....	32
3.2.4. Su İçeriği ve Kuru Madde Miktarının Belirlenmesi .....	33
3.2.5. Fotosentetik Pigment Konsantrasyonunun Belirlenmesi .....	33
3.2.6. Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi .....	34
3.2.7. Enzim Analizleri .....	34
3.2.8. İstatistiksel Hesaplamalar .....	35
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	37
4.1. Bulgular .....	37
4.1.1. <i>N. officinale</i> 'nin Gelişiminde Belirlenen Morfolojik Gözlemler ...	37
4.1.2. <i>N. officinale</i> Yapraklarında Fotosentetik Pigment Miktarı .....	38
4.1.3. <i>N. officinale</i> Kök, Gövde ve Yapraklarında Su İçeriği .....	40
4.1.4. Mineral Madde Derişimi .....	41
4.1.4.1. <i>N. officinale</i> Gövde ve Yapraklarında Mn Miktarı .....	41
4.1.4.2. <i>N. officinale</i> Gövde ve Yapraklarında Cu Miktarı .....	42
4.1.4.3. <i>N. officinale</i> Gövde ve Yapraklarında Fe Miktarı .....	44
4.1.4.4. <i>N. officinale</i> Gövde ve Yapraklarında Ca Miktarı .....	46
4.1.4.5. <i>N. officinale</i> Gövde ve Yapraklarında Mg Miktarı .....	47
4.1.4.6. <i>N. officinale</i> Gövde ve Yapraklarında Zn Miktarı .....	49
4.1.4.7. <i>N. officinale</i> Gövde ve Yapraklarında Pb Miktarı .....	50
4.1.5. <i>N. officinale</i> Yapraklarında Lipit Peroksidasyonu .....	52
4.1.6. Antioksidant Enzim Aktivitesindeki Değişimler .....	53
4.1.6.1. <i>N. officinale</i> Gövde ve Yapraklarında SOD Aktivitesi Değişimleri .....	53
4.1.6.2. <i>N. officinale</i> Gövde ve Yapraklarında GR Aktivitesi Değişimleri .....	55
4.1.6.3. <i>N. officinale</i> Gövdelerinde CAT Aktivitesi Değişimleri.....	56
4.1.6.4. <i>N. officinale</i> Gövdelerinde AP Aktivitesi Değişimleri .....	58
4.2. Tartışma .....	59
5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	72

KAYNAKLAR .....	75
ÖZGEÇMİŞ .....	95

## ÇİZELGELER DİZİNİ

## SAYFA

Çizelge 1.1.	Tatlısu vasküler bitkilerinin element derişimleri ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ [suda] ve $\mu\text{g}/\text{g}$ kuru ağırlık [bitkide]).....	2
Çizelge 4.1.	Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan <i>N. officinale</i> 'de belirlenen morfolojik gözlemler.....	38
Çizelge 4.2.	Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan <i>N. officinale</i> yapraklarında fotosentetik pigment miktarı ...	39
Çizelge 4.3.	Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan <i>N. officinale</i> kök, gövde ve yapraklarında su içeriği .....	40
Çizelge 4.4.	Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan <i>N. officinale</i> gövde ve yapraklarında Mn miktarı .....	42
Çizelge 4.5.	Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan <i>N. officinale</i> gövde ve yapraklarında Cu miktarı .....	43
Çizelge 4.6.	Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan <i>N. officinale</i> gövde ve yapraklarında Fe miktarı .....	45
Çizelge 4.7.	Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan <i>N. officinale</i> gövde ve yapraklarında Ca miktarı .....	46
Çizelge 4.8.	Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan <i>N. officinale</i> gövde ve yapraklarında Mg miktarı .....	48
Çizelge 4.9.	Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan <i>N. officinale</i> gövde ve yapraklarında Zn miktarı .....	49
Çizelge 4.10.	Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan <i>N. officinale</i> gövde ve yapraklarında Pb miktarı .....	51
Çizelge 4.11.	Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan <i>N. officinale</i> yapraklarında Lipit peroksidasyonu .....	52
Çizelge 4.12.	Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan <i>N. officinale</i> gövde ve yapraklarında SOD aktivitesi değişimleri .....	54
Çizelge 4.13.	Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan <i>N. officinale</i> gövde ve yapraklarında GR aktivitesi değişimi	55

Çizelge 4.14.	Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan <i>N. officinale</i> gövdesinde CAT aktivitesi değişimleri .....	57
Çizelge 4.15	Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan <i>N. officinale</i> gövdesinde AP aktivitesi değişimleri .....	58

## ŞEKİLLER DİZİNİ

## SAYFA

Şekil 1.1.	Oksijenin aktivasyon durumları.....	11
Şekil 1.2.	Halliwell- Asada yolu.....	21
Şekil 3.1.	<i>N. officinale</i> 'nin morfolojik kısımları.....	29
Şekil 4.1.	Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan <i>N. officinale</i> yapraklarında kl-a, kl-b ve karoten miktarları .	39
Şekil 4.2.	Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan <i>N. officinale</i> kök, gövde ve yapraklarında su içeriği.....	41
Şekil 4.3.	Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan <i>N. officinale</i> gövde ve yapraklarında Mn miktarı .....	42
Şekil 4.4.	Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan <i>N. officinale</i> gövde ve yapraklarında Cu miktarı .....	44
Şekil 4.5.	Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan <i>N. officinale</i> gövde ve yapraklarında Fe miktarı .....	45
Şekil 4.6.	Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan <i>N. officinale</i> gövde ve yapraklarında Ca miktarı .....	47
Şekil 4.7.	Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan <i>N. officinale</i> gövde ve yapraklarında Mg miktarı .....	48
Şekil 4.8.	Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan <i>N. officinale</i> gövde ve yapraklarında Zn miktarı .....	50
Şekil 4.9.	Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan <i>N. officinale</i> gövde ve yapraklarında Pb miktarı .....	51
Şekil 4.10.	Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan <i>N. officinale</i> yapraklarında lipit peroksidasyonu .....	53
Şekil 4.11.	Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan <i>N. officinale</i> gövde ve yapraklarında SOD aktivitesi değişimleri .....	54
Şekil 4.12.	Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan <i>N. officinale</i> gövde ve yapraklarında GR aktivitesi değişimi	56

Şekil 4.13.	Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan <i>N. officinale</i> gövdesinde CAT aktivitesi değişimleri .....	57
Şekil 4.14.	Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan <i>N. officinale</i> gövdesinde AP aktivitesi değişimleri .....	59

## SİMGELER VE KISALTMALAR

$^1\text{O}_2$	: Singlet Oksijen
$^3\text{Chl}^*$	: Triplet Klorofil
AA	: Askorbik Asit (Askorbat)
ABA	: Absisik Asit
AP	: Askorbat peroksidaz
CAT	: Katalaz
DHA	: Dehidroaskorbat
DHAR	: Dehidroaskorbat Redüktaz
EPA	: Environmental Protection Agency (Çevre koruma Örgütü)
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
Fd	: Ferredoksin
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSH	: İndirgenmiş Glutasyon
GSSH	: Oksitlenmiş Glutasyon
$\text{H}_2\text{O}_2$	: Hidrojen Peroksit
KA	: Kuru Ağırlık
MDHA	: Monodehidroaskorbat
MDHAR	: Monodehidroaskorbat Redüktaz
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
$\text{O}_2^{\cdot-}$	: Süperoksit Radikal
$\text{OH}^{\cdot}$	: Hidroksil Radikal
Pb	: Kurşun
PCB	: Poliklorobifenil
SH	: Tiol Grubu
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TA	: Taze Ağırlık
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
$\mu$	: Mikro

## 1. GİRİŞ

Doğadan ve antropojenik (kültürel ve insan yapımı) kaynaklardan gelen metaller su kütlelerinde birikime neden olmaktadır. Akarsu yataklarında toprağın tipine bağlı olarak zararsız halde bulunabilen metallere bazıları sucul hayat ve insan sağlığı için iz miktarlarda alınmaları zorunludur. Sadece bazı metaller akuatik sistemlerde aşırı miktarlarda bulunabilmekte ve organizmalar için toksik düzeye ulaşabilmektedir. Bunlar da insan aktiviteleri sonucu meydana gelen akıntılarının sulara boşaltılması ile olur. Ayrıca asit yağmurlarındaki artışlar da metalik yüzeylerden ve topraklardan metallerin yıkanmasına böylece ortamdaki toksik metallerin artmasına neden olmaktadır. Böylece toksik metaller (potansiyel olarak) ile akuatik sistemin kirlenmesine hem doğal olaylar hem de insanlar neden olmaktadır.

EPA (1993)'nın tesbit ettiği öncelikli kirleticiler listesinde 129 kirletici bulunmaktadır. Bunlardan 13 tanesi metal, diğerleri organik bileşikler, pestisitler, PCB'ler ile asitler ve siyanidler gibi bazı metal olmayan inorganik bileşiklerdir. Bu metal ve metaloitler; kadmiyum, kurşun, antimon, arsenik, berilyum, krom, bakır, cıva, nikel, selenyum, gümüş, talyum ve çinkodur. Bu metaller dünyanın birçok yerinde çevre koruma örgütleri tarafından öncelikli kirleticiler listesine alınmıştır (Novotny, 1995).

Tatlı su vasküler bitkileri, makroskopik alglerle birlikte makrofitler olarak bilinirler. Makrofitlerin akuatik ortamlardan elementleri toplayabilme özellikleri olduğunu ilk olarak Hutchinson (1975) rapor etmiştir. Hutchinson kadmiyum, kurşun ve cıva gibi toksik elementlerin bitkilerde, sucul ortamlardakinden çok daha fazla düzeylerde olduğunu göstermiştir.

Akuatik bitkilerin yaşam formları çeşitlidir.

1. Kenarda su dışında olan hidrofitler
2. Yarı batık hidrofitler (Emers tipi)
3. Yüzücü yapraklı hidrofitler
  - a. Suda serbest yüzenler
  - b. Kökleri ile tutunup yaprakları su yüzünde yüzenler
4. Su altında yaşayan hidrofitler (submers tipi) (Saygıdeğer, 1996)

Kontamine olmamış tatlı suların element kompozisyonları Turekian (1969) tarafından hesaplanmıştır. Bu değerler tablonun ikinci sütununda gösterilmiştir. Bu değerler tam kesin değildir. Çünkü hesaplamalardaki analitik hatalardan ve birkaç nehirden gelen metaller tatlı su hidrosferine karışmış olabilir.

Çizelge 1.1’de görüldüğü gibi doğal kirlenme olmamış tatlı sularda elementlerin miktarı oldukça düşüktür ve çoğu durumlarda  $\mu\text{g/L}$  düzeyindedir. Bu koşullar altında tatlı su vasküler bitkilerinin, kirlenmemiş sularda bile hiperakümülatör olduğu açıktır (Brooks ve Robinson, 2000).

**Çizelge 1.1.** Tatlı su vasküler bitkilerinin element derişimleri ( $\mu\text{g/mL}$  [suda] ve  $\mu\text{g/g}$  kuru ağırlık [bitkide]).

Element	A	B	C	D	E	C/A
Ag	0.003	0.06	0.15	0.12	67	500
As	0.002	0.20	2.7	1.4	1200	1350
Cd	0.0002	0.64	1.0	1.4	90	5000
Co	0.0002	0.48	0.32	0.37	350	1600
Cr	0.001	0.23	4.0	2,8	65	4000
Cu	0.007	14	7.9	42	190	1128
Hg	0.0001	0,015	0.50	0.58	1000	5000
Mn	0.007	630	370	430	8370	52,857
Mo	0.001	0,90	12	-	-	12,000
Ni	0.0003	2.7	4.2	6.1	290	14,000
Pb	0.003	2.7	6.1	27	1200	2033
Se	0.0002	0.2	1.0	0.30	21	5000
U	0.00004	0.04	0.50	0.05	1,1	12,500
V	0.0009	1.6	3.6	-	-	4000
Zn	0.02	100	52	47	7030	2600

A-Kirlenmemiş nehir suları (Turekian, 1969), B- Karasal bitkiler (Bowen, 1966), C- Kirlenmemiş tatlı su vasküler bitkileri için ortalama değerler, D- Kirlenmiş tatlı su vasküler bitkileri için ortalama değerler, E- Kontamine olmuş tatlı su vasküler bitkileri için maksimum değerler, C/A- Kirlenmemiş sularda büyüyen tatlı su vasküler bitkileri için birikim faktörü (Outridge ve Noller,1991).

## 1.1. Ağır Metaller

### 1.1.1. Ağır Metallerin Genel Özellikleri

Ağır metaller atomik yoğunluğu  $6 \text{ g/cm}^3$ ’ten büyük olan metal ve metaloitler grubu için kullanılan genel bir isimdir. Genellikle kirlilik ve toksisite problemleriyle ilişkili olan Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb ve Zn gibi elementler için kullanılır. Bu grup

elementler için alternatif isim iz elementlerdir (teorik olarak daha kabul edilebilir); ancak yaygın bir şekilde kullanılmaz. Ağır metaller normal olarak, kayaların ve maden cevherlerinin bünyesinde bulunduğu için yaşayan organizmalarda, sularda, sedimentlerde ve toprakta bulunması doğaldır (Alloway ve Ayres, 1993).

Bazı ağır metaller bitki beslenmesi için önemli oldukları halde yüksek konsantrasyonlarda fitotoksiktirler. Bunlar Cu, Fe, Mn, Mo, Zn, Co ve Ni dir. Bununla birlikte Cd, Cr, Hg ve Pb gibi ağır metaller de çeşitli yollardan tarımsal ekosisteme girerler. Bunların bitki bünyesinde bulunmaları derişimlerine ve çözünebilirliklerine bağlıdır (Bergmann, 1992).

Bütün atık su ve çamurlarda rastlanan ağır metallerin başlıca kaynakları endüstriyel ve ticari aktivitelerdir. Evsel atık sularda da önemli miktarlarda metal bulunur. Endüstriden gelen en önemli metaller Cu, Ni, Pb, Zn ve Cd'dur. En önemli sorun bu metallerin besin zincirine girme ve kullanma suyuna karışma olasılığıdır (Dinges, 1982; Jamil ve ark., 1987).

### 1.1.2. Ağır Metallerin Biyokimyasal Özellikleri

Bu gruptaki bazı elementler yaşayan organizmaların çoğu için eser miktarda da olsa gereklidir. Şüphesiz gerekli olan bu metallerin eksikliğinde canlılar zarar görür. Hem bitki hem de hayvanlar için Zn, Fe, Mn, Cu gerekli iken bunlara ek olarak yalnız hayvanlar için Co, Cr, Se, I ve yalnız bitkiler için B ve Mo gereklidir. Biyokimyasal işlevleri bilinmeyen, canlılar için birinci derecede önemli olmayan fakat toksik olan elementler de vardır. Bunlar As, Cd, Pb, Sb, Ti ve U' dur. Bunlar organizmaların toleransını aşan konsantrasyonlarda toksisiteye neden olmaktadır.

Biyokimyasal düzeyde bu metallerin aşırı konsantrasyonlarının neden olduğu olumsuz etkiler ATP ve ADP'nin fosfat gruplarıyla olan reaksiyonları, hücre membranlarının zarar görmesi, SH gruplarıyla olan reaksiyonları, esas iyonların yerine geçmesi ve esas metabolitlerle rekabet etmesidir. Organizmalar sahip oldukları homeostatik mekanizmalarıyla çoğu elementin alınmasında ortaya çıkan bu düzensizlikleri tolere edebilirler (Alloway ve Ayres, 1993).

### 1.1.3. Ağır Metallerin Bitkiler Tarafından Alınması

Bitkilerde ağır metal alınımı üç şekilde olmaktadır.

1. Köklerle alınımlar 2. Ağır metallerin taşınması 3. Ağır metale dayanıklılık

#### *Köklerle Alınım*

Toprakdaki metallerin bir kısmı bitkiler tarafından alınırken bir kısmı da toprakta kalır. Bu metalleri depo eden bitkiler öncelikle metalleri toprakta harekete geçirmelidir. İlk olarak metal şelatlandırıcı moleküller (fitosideroforez) rizosfere salınır. Bunun nedeni toprağa bağlı olan metalleri topraktan çözmek içindir. Örneğin mugineik asit ve avenik asit gramine türlerinin fitosideroforezi olarak görev yaparlar (Kinnersely, 1993). Bu fitosideroforezler Fe ve Zn eksikliğinde serbest bırakılırlar ve Cu, Zn ve Mn'in toprakta hareketini sağlarlar (Romheld, 1991). İkinci olarak kökler spesifik plazma membranına bağlı metal redüktazlar ile metal iyonlarını azaltabilirler. Üçüncü olarak da bitki kökleri saldıkları protonlar ile toprak ortamını asitleştirerek ağır metalleri çözebilirler. Düşük pH toprak içindeki bağlı metal iyonlarının serbest kalmasına neden olur. Kök içine intraselüler veya ekstraselüler yollarla giren metal iyonları spesifik veya genel iyon taşıyıcıları vasıtasıyla yada kanallarla bitki hücrelerine girerler (Clarkson ve Luttge, 1989). Bitki için gerekli olmayan ağır metaller de aynı transmembran taşıyıcılarını kullandıklarından aralarında rekabet ederler (Salt ve ark., 1995).

#### *Ağır Metallerin Köklerle Taşınması*

Metal iyonları köke girdiğinde ya akümüle edilirler yada sürgünlere taşınırlar. Sürgünlere metal geçişi ksilem içinde olursa da kök içindeki floem yoluyla da bitkide ilerleyebilirler (Stephan ve Scholz, 1993). Ksilem kanallarına giren metal iyonları ilk olarak endodermis ve epidermisi bölen kaspari şeridine girerler. Kaspari şeridi nedeniyle ekstraselüler geçiş bloke edildiğinden suyun hareketi engellenir ve metal iyonları intraselüler olarak hareket ederler. ( Salt ve ark., 1995).

Belirli metal akümülatörleri bitkilerin (*Brassica juncea*) ksilem özlerinin analizi yapıldığında metal geçişinde organik asitlerin ilişkisi olduğu ortaya çıkmıştır (Baker ve Brooks, 1989). Floemde de metaller ya organik asitlerle şelatlı olarak yada fitoşelatinlerle veya metallotiyoninlerle taşınabilirler ( Salt ve ark., 1995).

### *Ağır Metale Dayanıklılık*

Toksik etkili ağır metallere dayanıklı olan bir bitki ya hücreye giren ağır metalleri derhal detoksifiye etmeli yada hücreye alınımını sınırlı tutmalıdır (Cumming ve Taylor, 1990). Ağır metallere kirlenmiş topraklardaki bazı endemik bitkilerin asit fosfatazlar gibi ağır metale dayanıklı enzimler içerdiği görülmüştür (Thurman, 1981). Ağır metaller hücre içinde biriktirildiklerinde detoksifiye edilmeleri gerekir. Bu da metale bağlı olan şelatlanma, alınımın sınırlanması ve çöktürme şeklinde olur. Zn organik asitlerle şelatlanıp vakuolde biriktirilebilir (Brooks ve ark., 1981). Kurşun etkisinde bırakılan *Brassica juncea*'nın köklerinde de fitoşelatinlerin üretildiği ve böylece fitoşelatinlerin kurşun detoksifikasyonu ile ilişkisi olduğu ortaya konulmuştur (Salt ve ark., 1995).

## **1.2. Kurşun**

İnsanlar tarafından binlerce yıldan beri kullanılan kurşun, dünyadaki bütün sanayileşmiş ülkelerin ekonomisinde büyük rol oynamıştır. U.S.'de kurşunun endüstriyel tüketimi her yıl için 1.3 milyon ton olduğu tahmin edilmekte ve kirleticiler ile çevreye 600.000 ton Pb yayılımı olmaktadır ( Landis ve Yu, 2004).

Kurşuna dayalı ürünlerin üretimi ve kullanımı olduğu gibi kurşun rafinerisi, madencilik ve kurşunun tasfiye edilmesi işlemleri de çevreye kurşun salınımını yükseltmektedir. Böylece kurşun öncelikle sucul sistemlere ve hava içine toz şeklinde karışmaktadır (Grandjean, 1975).

### **1.2.1.Özellikleri ve Kullanımı**

Düşük erime noktasına ( 326° C ) sahip olan kurşun, yumuşak ve işlenebilen bir metaldir. Kolayca çeşitli şekillere dönüştürülebilir ve diğer metallere alaşım oluşturabilir. Önemli sanayi ürünlerinden borular, boyalar, lehimler, cam, çömlek sırtı, plastik ve insektisitler de Pb içerirler ( Landis ve Yu, 2004).

Kurşunun spesifik adsorpsiyon özelliği nedeniyle diğer tüm metallere göre daha kuvvetli bağlanır. Özellikle Fe oksit, Mn oksit ve Al oksitler kurşun için pH artışıyla beraber artan bağlanma kapasitesi göstermektedir (Özbek ve ark., 1995).

*Atmosferdeki Kurşun*

Atmosferik kurşun kaynakları; kurşun tasfiyehaneleri, kömürün ve kurşun içeren maddelerin yanması, rüzgârla toprakta bulunan kurşunun ayrılması ve kurşunlu benzinin yanması sonucu havaya karışan kurşun alkileridir. Son zamanlara kadar havadaki kurşun kontaminasyonunun yaygın kaynağı otomobillerden çıkan eksoz gazıydı. Tetraetil kurşun 1920 yıllarından beri benzinde vuruntu maddesi olarak kullanılmış ve atmosferik kirletici olarak önemli rol oynamıştır ( Landis ve Yu, 2004).

Vuruntu önleme maddesi (benzinin daha iyi yanmasını sağlayan madde) olarak benzine katılan kurşun tetraalkil yandıktan sonra ekzos gazlarıyla katı formda, özellikle kurşun halojenür olarak az miktarda da kurşun sülfat, kurşun fosfat ve kurşun oksit olarak ortama verilir. Kurşun içeren partiküller 1µm'den küçük toz parçacıkları halinde olduklarından uzak mesafelere taşınabilirler (Özbek ve ark., 1995).

Kurşunsuz benzinin zorunlu hale getirilmesi ve sanayiden dolayı oluşan yayılımın kontrol altına alınması sonucu atmosferik kurşun yayılımı önemli miktarda azalmıştır. EPA'nın raporlarına göre U.S.A.(Amerika Birleşik Devletleri)'da en büyük yayılım kaynaklarından çıkan Pb miktarı 1981- 1990 arası sürekli olarak azalma göstererek 56 000 tondan 7100 tona düşmüştür (EPA, 1991).

*Sulardaki Kurşun*

Yüzey suları bazı özel kontaminasyonların etkisinde kaldığı zaman önemli miktarlarda kurşun içerirler. 1963-1965 yıllarında kurşunlu borularla taşınan içme sularından alınan numunelerin % 14'ünde 10 mg/L'den daha fazla kurşun bulunmuştur. Aynı numunelerin %1'den daha azında 30 mg/L'den daha fazla olduğu bulunmuştur. Diğer yandan trafiğin yoğun olduğu caddelerin yakınlarında toplanan yağmur suları da 50 mg/L kurşun içermektedir (Landis ve Yu, 2004).

*Yiyeceklerdeki Kurşun*

İnsanlar ve hayvanların vücutlarına kurşun girişinin esas kaynağı uzun dönemde kurşun içeren besinlerin yenmesidir. Hayvanlar Pb bulaşmış bitkileri yiyerek zehirlenebilirler. İnsanlarda kurşunu çömlekçilikte kullanılan sırlardan veya Pb bulaşmış varil, şişe gibi kaplardan vücutlarına alabilirler. Araştırmacıların

raporlarına göre bazı Roma İmparatorlarının yüksek düzeyde kurşun ile kontamine olmuş şarapları içerek Pb zehirlenmesinden hasta oldukları hatta öldükleri bildirilmektedir (Landis ve Yu, 2004).

Ana caddelerin yakınlarında bulunan bitkilerin otomobil egzozlarından dolayı yüksek miktarlarda Pb biriktirdikleri açıklanmıştır ( Khalid ve ark., 1996). Kurşun içeriği fazla olan bitkilerin insanlar ve hayvanlar tarafından doğrudan yenilmeleri durumunda tehlikelidirler. Trafiği yoğun olan otoyolların hemen kenarında bulunan bitkiler kuru maddede yaklaşık 60 ppm'lik kurşun içerikleri gösterirler. Bunun büyük bir kısmı sadece yüzeysel olarak bitkilere yapışmış durumdadır. Yola olan mesafe arttıkça kurşun içeriği azalır. Bu yaklaşık 100 m mesafede normal değerlere (kuru maddede 4 ppm Pb) ulaşır. Yumrular ve daneler daha düşük Pb içeriği gösterirler (kuru maddede 0.5 ppm Pb) (Özbekve ark., 1984).

Eski evlerin duvarlarındaki boya parçacıklarını yiyen çocuklar arasında kronik kurşun zehirlenmesinden dolayı doğal olmayan yiyeceklere karşı aşırı bir iştah belirlemiştir (Lin-Fu, 1982). Çocuklar için büyük bir tehdit oluşturan kurşunlu boyalar bir çok ülkenin karşı karşıya olduğu sağlık problemlerine neden olmaktadır. ( Landis ve Yu, 2004).

#### *Topraklardaki Kurşun*

Kurşun ve diğer metaller kirlenmiş havadan toprağa geçebilirler. Ana caddelerdeki araba egzozlarından ve maden tasfiye bacalarından dağılmalar bunun örnekleridir (Little ve Martin, 1972). U.S.A'da yapılan çalışmalarda motorlu taşıtlardan salınan kurşunun % 50'si yolların 30 m içinde birikmekte geri kalanı geniş alanlar üzerine dağılmaktadır. Yolların kenarlarındaki kurşun kontaminasyonu trafik yoğunluğuna göre değişmekte ve yoldan uzaklığa bağlı olarak hızlı bir şekilde azalmaktadır. Minneapolis-St. Poul bölgesinde 12 ana yolun topraklarından alınan örneklerde yapılan çalışmalarda, Pb derişimi 128- 700 ppm bulunmuştur. Bu değerler kirlenmemiş kırsal topraklarda bulunan 10-15 ppm Pb değerlerinden oldukça yüksektir (Ryan, 1976).

Motorlu taşıtlar aracılığıyla trafiğin yoğun olduğu yolların özellikle 10 m uzağında yer alan topraklarda yüksek düzeyde kurşun birikimi olmaktadır. 50-100 m'den itibaren genel olarak topraklarda yüksek kurşun içeriğine

rastlanmamaktadır. Trafik yoğunluğunun artması ve trafikteki devamlılık, yola yakın alanlardaki toprakların kurşun içeriğini arttırmaktadır. Topraklarda kurşunun taşınması ve yıkanması, çözünürlülüğünün düşük olması nedeniyle çok az düzeyde meydana gelmektedir. Yapılan bilanço çalışmaları ortama verilen kurşunun % 80'ninin 20 cm'lik üst toprakta tutulduğunu göstermiştir ( Özbek ve ark., 1995).

### 1.2.2. Kurşunun Bitkilere Toksik Etkileri

Havada ve topraklarda bulunan kurşunun yüksek düzeylerinin etkisi altında kalan bitkiler metali biriktirebilirler ve sonuç olarak toksisite gösterebilirler. Kurşun toksisitesinin büyüklüğü metalin absorpsiyonuna, hareketliliğine ve hücredeki bölgesel birikime bağlıdır. Kurşun yönünden zengin ortamlarda büyüyen hassas bitki türleri organlarında çok fazla kurşun biriktirebilirler (Singh ve ark., 1997). Kurşun toksisitesi diğer metallerde olduğu gibi bitki türlerine göre değişir. İn vitro çalışmalarına dayanan toksisite sonuçları birkaç tür için belirlenmiştir. Arpa bitkisinin Pb'ye Cr, Cd, Ni veya Zn'den daha fazla hassas olduğu gösterilmiştir (Oberlander ve Roth, 1978). Yüksek düzeyde kurşunun etkisinde kalan fasulye tohumlarının çimlenmesinin inhibe edildiği gösterilmiştir (Yu, 1991). Bununla beraber kurşunun çimlenmeye etkisi Cd, As ve Hg gibi birkaç metale göre daha az olduğu bulunmuştur (Koeppel, 1977).

Kurşunun fitotoksik etkisi, aşırı derecede kurşun içeren topraklar üzerinde büyüyen bitkilerde görülmüştür. kurşun kısmen yaprakların stomaları vasıtasıyla bitkinin içine nüfuz ederken büyük bir kısmı yüzeysel olarak yapışır ( Patel, 1967).

Bitkilere kurşun bulaşmasının düzeylerini etkileyen faktörler şunlardır:

- Kurşun yayılımının şiddeti,
- Yayılım kaynaklarından uzaklık,
- Yayılım alanlarında hakim olan rüzgârın kuvveti ve yönü,
- Hasat zamanı ve büyüme döneminin uzunluğu,
- Bitkinin yüzey şekilleri, özellikle yaprakların şekli (düz, pürüzlü, dalgalı, tüylü vs.),
- Yaprak pozisyonları (dikey ve yatay),
- Birikimin dağılım ve miktarı (Grun ve ark., 1985).

Kurşun toprak tarafından oldukça kuvvetli bir şekilde absorbe edildiğinden toprakta kurşun içeriği fazla olsa bile bitkideki kurşun içeriği daha azdır (Heilenz, 1970).

Sonuç olarak, havadaki kurşun miktarına, dağılım kaynağına yakınlığın artmasına, bitki vejetasyon döneminin uzamasına bağlı olarak bitkilerin kurşun içeriği artmaktadır. Bu nedenlerden dolayı ağaçların yaprak ve iğnelerindeki Pb miktarı sebze ve çayır bitkilerine oranla yüksektir. Özellikle yosun ve liken gibi yavaş büyüyen bitkiler yüksek bitkilere göre gram kuru madde başına 100-1000 kez daha fazla ağır metal biriktirme özelliğine sahiptir ve bu nedenle toksik madde birikimi için biyoindikatör olarak tanımlanırlar (Özbek ve ark., 1995).

### 1.2.3. Kurşunun İnsanlara Toksik Etkileri

Kurşun, kadmiyum ve cıvaya oranla çok daha az toksisite göstermektedir. İnsanlar ve hayvanlar tarafından alınan kurşun ciğer, böbrek ve özellikle kemik ve dişlerde birikmektedir. Yarı ömrünün fazla olması nedeniyle (insanlarda 5-20 yıl) endüstrinin yoğun olduğu ülkelerdeki insanlarda yaş ilerlemesine bağlı olarak vücuttaki kurşun miktarı da artmaktadır (Özbek ve ark., 1995).

İnsanlarda kişi başına kurşunun günlük alınımı 20 mg' dan 400 mg'a kadar olduğu hesaplanmıştır. FAO/WHO uzmanları haftalık tolere edilebilir miktarın 3000 mg olduğunu saptamışlardır. Yalnızca bu miktarın yarısının çocuklar için güvenli olduğu açıklanmıştır. Mideye giren kurşunun % 5-15 kadarı absorblanmaktadır. Bu miktar günlük olarak 15-25 mg/gün' dür ve toplam absorblanan kurşunun üçte ikisi kadardır. Aksine solunmayla alınan kurşunun %20-40 kadarı absorblanır ve yaklaşık olarak 8 mg/gün' dür veya toplam absorbe edilen kurşunun üçte biri kadardır.

### 1.2.4. Kurşunun Biyokimyasal Etkileri

Birçok biyokimyasal işleyiş Pb'nin aşırı hareketli olmasından etkilenir. Metal, önemli fonksiyonel grup olarak hareket ettiğinden birçok enzimin (bunların bazıları fotosentez ve azot için önemlidir) aktivitesini etkiler. Kurşunla muamele edilen bitkilerde hidrolitik enzimlerin ve peroksidazların aktivitesinin bozulduğu,

senesenste bir artış olduğu görülmüştür. Kurşun muamelelerinde çözünebilir protein ve serbest aminoasit içeriğinde de artış gözlenmiştir (Lee ve ark., 1976).

Bitkiler tarafından ortamdaki alınan kurşun çok düşük derişimlerde hücre bölünmesini azaltabilir (Cannon ve Bowles, 1962). Kurşunun mısır mitokondrilerinde elektron geçişini inhibe ettiği gösterilmiştir (Koepe ve Miller, 1970).

### 1.3. Oksidatif Stres ve Oksijenin Aktifleşmesi

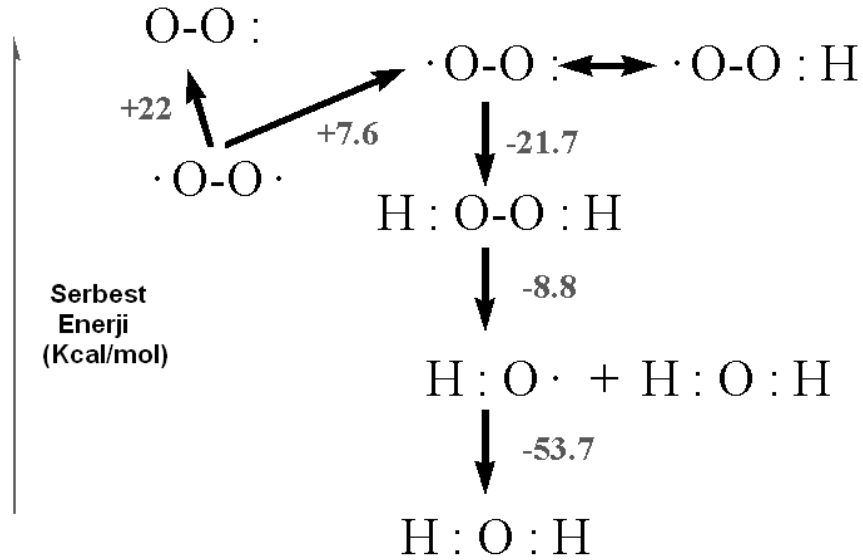
Atomik oksijen; yer kabuğunda çok fazla bulunan elementtir. Su ve atmosferde bulunan oksijen aerobik hayatın bütün formlarının devamı için zorunludur. Mevcut oksijen rezervi, fotosentezin bir sonucu olarak sudaki oksijenin serbest bırakılmasıyla meydana gelir ve solunumda en son elektron alıcısı olarak kullanılmasıyla devamlılığı sağlanır. Ayrıca çeşitli enzimik ve enzimik olmayan prosesler ile oksijen atomları çeşitli organik moleküller içinde de tutulmaktadır (Elstner, 1982).

Aerobik hayat için gerekli olan oksijen molekülü solunum ve enerji metabolizması için zorunlu olmasının yanında birçok olumsuz sonuçlar da meydana getirmektedir. Aerobik organizmalar oksijenin bu olumsuz etkileriyle de savaşmak zorundadırlar. Atmosferik derişim çok fazla olduğunda, moleküler oksijen bazı enzimleri inhibe edebilir veya aktifliğini engelliyebilir. Fakat oksijenin esas toksik etkisi reaktif türevlerini kullanmasıyla oluşmaktadır. Oysaki bazal düzeyindeki moleküler oksijen reaktif değildir ve organik moleküllerle rahatlıkla birlikte bulunabilir. Bu özelliği, moleküler oksijenin eşleşmemiş iki elektronunun paralel dönmesiyle açıklanır ve bu dönme sınırlaması radikal olmayan bileşiklerle onun reaksiyona girmesine etkili bir engel oluşturur. Bunun için moleküler oksijen fiziksel ve kimyasal olarak aktifleştirilmelidir (Perl-Treves ve Perl, 2002).

Fiziksel aktifleşme, uyarılmış bir klorofil molekülü gibi aktifleşmiş bir pigmentten uyarma enerjisinin moleküler oksijene transferi ile meydana gelir ve yeterli enerjiyi absorblayan oksijenin elektronlarından birisinin dönmesi tersine çevrilir. Bu durumda iki elektron birbirine karşıt dönmelere sahip olur ( Şekil 1.1). İlk oluşan etkili ve reaktif bir tür olan oksijenin singlet ( $^1O_2$ ) durumudur.  $^1O_2$

oldukça yüksek düzeyde dağılma özelliğine sahiptir ve organik moleküllerle tepkimeye girebilir. Organik moleküllerde eşleşmiş elektronlar yaygın olduğu için  $^1\text{O}_2$  organik moleküllere karşı triplet durumundan daha fazla reaktiftir.

Kimyasal aktifleşme, dönme sınırlamasının olmadığı bir mekanizmadır. Moleküler oksijenin birer elektronlarının indirgenmesi ile meydana gelir. Moleküler oksijenin tümüyle suya indirgenmesi için 4 elektron ( ve 4 proton) gereklidir. Tek değerli indirgenmenin üç ara ürünü; sırasıyla süperoksit ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ), hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ve hidroksil radikal ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) kimyasal olarak reaktif ve biyolojik olarak toksiktirler. Oksijenin redüksiyonunda birinci basamakta oluşan  $\text{O}_2^{\cdot -}$  endotermiktir, sonraki redüksiyonlar ekzotermiktir (Şekil 1.1), (Mc Kersie ve Leshem, 1994). Bir organik moleküle çarpan reaktif oksijen türleri, ondan bir elektron çıkararak peroksil ( $\text{ROO}^{\cdot}$ ) ve alkoksil ( $\text{RO}^{\cdot}$ ) radikal gibi zincir reaksiyonlar oluşturabilen bir radikale geri verir (Perl-Treves ve Perl, 2002).



Şekil 1.1. Oksijenin aktivasyon durumları (Mc Kersie ve Leshem, 1994).

Farklı stres faktörlerinin yaygın özelliği bitki dokularında reaktif oksijen türlerinin üretilmesini artırma potansiyelinde olmalarıdır. Reaktif oksijen türleri aynı zamanda normal metabolik prosesler süresince de bitki hücrelerinde meydana getirilirler (Fridovich,1995; Alscher ve ark., 1997). Fotosentetik elektron taşıma sistemi bitki dokularında  $^1\text{O}_2$  ve  $\text{O}_2^{\cdot -}$  meydana getirme potansiyeline sahip aktif

oksijenin esas kaynaklarıdır. Aktif oksijen üretimi, oksijen atmosferinde fotosentetik elektron taşıma zincirinin işleminin bir sonucudur (Asada, 1994).

### 1.3.1. Hücrelerde Reaktif Oksijen Üretimi

Bitkilerdeki reaktif oksijen türlerinin birçok olası nedeni vardır. Normal metabolizmanın kapsamı içinde olan reaksiyonlardan birkaçı fotosentez ve solunumdur. Reaktif oksijen ara ürünlerinin diğer kaynakları abiyotik stresler süresince fotorespirasyon (ışıklı ortamdaki solunum) ve peroksizomlardaki glikolat oksidaz gibi yollara aittir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda da reaktif oksijen ara ürünlerinin nedenleri belirlenmiştir. Bunlar NADPH oksidazlar, amino oksidazlar ve hücre duvarına bağlı peroksidazlardır. Bunlar programlanan hücre ölümleri ve patojen savunması gibi işleyişler süresince reaktif oksijen ara ürünleri oluşumuna katılırlar ( Dat ve ark.,2000 ; Hommond ve Jones,1996 ; Grant ve Leake 2000 ).

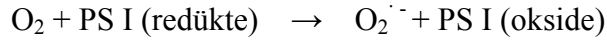
Oysaki normal büyüme koşulları altında hücrelerdeki reaktif oksijen ara ürünlerinin üretimi düşüktür ( $240 \mu\text{M s}^{-1}\text{O}_2^-$  ve  $0.5 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  değerleri kloroplastlardaki değişmez düzeylerdir). Birçok stres faktörü reaktif oksijen ara ürünlerini arttırarak hücrelerin homeostasisini hasara uğratar (  $\text{O}^-$  için  $240-720 \mu\text{M s}^{-1}$  ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  için  $5-15 \mu\text{M}$  ) (Polle, 2001). Bu stres faktörleri kuraklık, su eksikliği, tuz stresi, donma, sıcaklık şoku, ağır metal stresi, ultraviyole yayılımı, ozon ve  $\text{SO}_2$  gibi hava kirleticileri, besin eksikliği, patojen saldırılar ve yüksek ışık stresi gibi mekanik streslerdir (Bowler ve ark.,1992 ; Allen, 1995; Dat ve ark.2000). Bu stresler mitokondrial solunumda, kloroplastlarda ve fotorespirasyonda reaktif oksijen ara ürünlerini meydana getirir.

### 1.3.2. Kloroplastlarda Reaktif Oksijen Üretimi

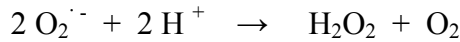
Klorofil molekülü tilakoit membranlardaki fotokimyasal reaksiyon merkezinde ışık enerjisini absorbladığı zaman yüksek potansiyelli oksidatif güç ve düşük potansiyelli indirgeyici güç oluşturulur. Fotosentetik elektron transport zincirinde fotosistem II (PS II)'nin oksitleyici bölgesinde su, oksijene oksitlenir. Fotosistem I (PS I)'in indirgen bölgesinde ise demir-sülfür proteini ferredoksin (Fd)

indirgenir. İndirgenmiş Fd, CO<sub>2</sub> tutulması ve kloroplastlardaki diğer reaksiyonlar için elektron sağlar. Kloroplastlarda reaktif oksijen türlerinin iki oluşum yeri bulunur. Birincisi fotosistem I'ın diğeri fotosistem II'nin indirgen bölgesidir.

Fotosistem I'ın ucundaki FeS merkezlerinin redoks potansiyeli oksijenden tek değerli O<sub>2</sub><sup>·-</sup> radikali üretecek kadar düşüktür.

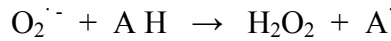


Oksijenin süperokside fotoredüksiyonu PS tarafından zorunlu olarak meydana getirilir ve fotosentetik elektron akışının % 10-20'sini kullanır (Asada ve Takahashi, 1987). Süperoksit, stromada bulunan süperoksit dismutaz (SOD) ile katalizlenerek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub>'ye dismutasyonu sağlanır (Asada ve ark., 1973).



Bu reaksiyonlar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in çoğunun kloroplastlarda oluştuğunu açıklamaktadır (Mehler reaksiyonu; Mehler, 1951).

Hidrojen peroksit, glutatyon (GSH) ve askorbat (AA) ile O<sub>2</sub><sup>·-</sup> in enzimatik olmayan indirgenmesi ile de üretilir.

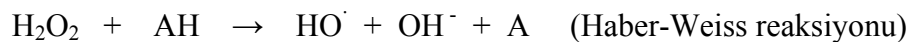


Reaksiyonda AH, GSH veya AA'nın olduğu bir indirgen, diğeri ise bir radikaldir. Bununla beraber normal fiziksel koşullar altında bu mekanizma önemli değildir. Çünkü üretilen O<sub>2</sub><sup>·-</sup> oluştuğu yerin yakınında bulunan SOD ile derhal farklılaştırılır (Ogawa ve ark., 1995).

Oksijenin O<sub>2</sub><sup>·-</sup>'e fotoredüksiyonu zararlı değildir fakat kloroplastların fotoinhibisyonu açısından oldukça zorunludur ve aşırı uyarılma enerjisini ısı olarak dağıtan emniyet valfi gibi hareket eder (Laisk ve Edwards, 1998).

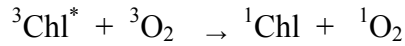
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sadece süperoksitin dismutasyonu ile değil aynı zamanda kloroplast dışında, divalent oksidasyonlar süresince çeşitli oksidazlar ile katalizlenen oksijenin divalent indirgenmesi yoluyla da üretilir (Perl-Treves ve Perl, 2002).

İndirgenler ve uygun bir katalizör (geçiş metal iyonları, kinonlar ve Fd; Jakob ve Heber, 1996) sağlandığı zaman H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, oldukça toksik hidroksil radikal (OH<sup>·</sup>) şekline dönüşür.



AA, GSH ve  $O_2^{\cdot -}$  bu reaksiyonda indirgen olabilirler. Katalizör olarak PSI'in reaksiyon merkez kompleksindeki FeS merkezleri (Sonoike, 1996) de  $OH^{\cdot}$  üretebilir. Fe, Cu ve Mn geçiş metal iyonları olarak etkili katalizörlerdir.  $OH^{\cdot}$  oldukça yüksek oksitleyici güce sahiptir ve organik molekülleri devamlı olarak  $10^9 M^{-1} s^{-1}$  de oksitler, bundan dolayı reaktif oksijen türleri arasında en fazla toksik olan moleküldür (Halliwell ve Gutteridge, 1989).

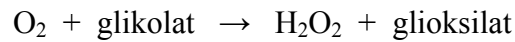
Elektron transport zincirinin diğer yanında oluşturulan triplet klorofil molekülü hızlı bir şekilde bazal düzeydeki oksijenle tepkiyerek singlet oksijen ( $^1O_2$ ) oluşturur (Perl-Treves ve Perl, 2002).



$^1O_2$ ,  $H_2O_2$ 'den ve süperoksitten çeşitli reaksiyonlar yoluyla da üretilir (Halliwell ve Gutteridge, 1999). PS II'nin reaksiyon merkezlerinde başlıca akseptör olan kinon  $Q_A$  tamamen indirgendiğinde de  $^1O_2$  üretilir (Vass ve Styring, 1993).

### 1.3.3. Kloroplastların Dışında Reaktif Oksijen Türlerinin Üretimi

Reaktif oksijen türlerinin en büyük üretim reaksiyonları yalnızca kloroplastlardaki oksijenin oksijene univalent indirgenmesi değil aynı zamanda kloroplast dışındaki kısımlarda da  $O_2$ 'nin  $H_2O_2$ 'ye divalent indirgenmesi reaksiyonlarında da oluşurlar. Peroksizomlar divalent reaksiyonlar için oksidazlar içerirler ve ışık ortamdaki solunum ve lipidlerin  $\beta$ - oksidasyonu gibi oksidatif metabolizma ile beraber  $H_2O_2$  üretirler.  $C_3$  bitkilerindeki  $H_2O_2$ 'nin önemli miktarı peroksizomal glikolat oksidaz yoluyla fotorespirasyonla sırasında üretilir (Perl-Treves ve Perl, 2002).



$O_2^{\cdot -}$  de peroksizomlarda ve plazma membranlarında üretilir. Bitki peroksizomlarında süperoksit ksantin oksidaz ve üç ayrı NAD(P)H oksidazlar yoluyla üretilir. Peroksizomal  $O_2^{\cdot -}$  üretimi senesens süresince artmış ve oluşan reaktif oksijen türleri hücre bileşenlerini çürütmüştür (Del Rio ve ark., 1998).

#### 1.4. Reaktif Oksijen Türleri

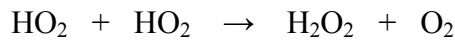
##### *Süperoksit Radikali*

Süperoksit radikali mikrozomal ve mitokondrial elektron taşıma sistemlerinin dahil olduğu birçok hücrel yollarda meydana getirilir.  $O_2^{\cdot -}$  radikali hem oksitleyici hem de indirgeyici özelliklere sahiptir (Fee ve Valentine, 1977).  $O_2^{\cdot -}$  radikali bir elektron alarak moleküler oksijenin indirgenmiş şeklidir.  $O_2^{\cdot -}$  anyonu mitokondrial elektron taşıma sisteminde meydana gelen başlangıç serbest radikalidir. Mitokondri dört elektron zincir reaksiyonu kullanarak oksijenin suya indirgenmesiyle enerji üretir. Mitokondrinin zincir reaksiyonlarından çıkan elektronların bazıları doğrudan oksijen ile tepkimeye girer ve süperoksit anyonu meydana gelir (Harman, 2000).

$O_2^{\cdot -}$  kısmen stabildir ve reaktif oksijen türleri arasında reaktif olmayan bir moleküldür. Bununla beraber protonlanmış,  $HO_2$  şekli ( $pK_a = 4.8$ ) daha çok reaktifdir ve lipid peroksidasyonunu başlatabilir. Oysaki  $O_2^{\cdot -}$  başlatamaz. Buna ek olarak  $HO_2$  lipid bariyerlerini geçebilir fakat  $O_2^{\cdot -}$  geçemez. Sulu çözeltilerde  $O_2^{\cdot -}$  kendiliğinden  $H_2O_2$  ve  $O_2$ 'ye farklılaşır.



Düşük pH'da aşağıdaki reaksiyonlar meydana gelir.



$O_2^{\cdot -}$  radikali Haber-Weiss reaksiyonunda  $H_2O_2$ 'den  $HO^{\cdot}$  üretmek için geçiş metal iyonlarının bir indirgeni olarak görev yapar. Aynı zamanda kinonların bulunduğu ortamda özellikle radikal zincir reaksiyonları oluşturur. Kinonlar bitki hücrelerinde çok fazla bulunan kinon redüktazlar tarafından semikinonlara indirgenir. İndirgenmiş semikinonlarda moleküler oksijeni indirgeyerek süperoksit üretirler.  $O_2^{\cdot -}$ , semikinonların farklılaştırılmasıyla üretilen kinonları yeniden semikinon oluşturmak için oksitler. Bu zincir reaksiyonlar SOD ile etkili bir şekilde sonlandırılır (Mano ve ark., 2000).

$O_2^-$  radikali sülfür bileşiklerini, o-difenollerini, AA'i (Asada ve Kiso, 1973) veya NADPH'ı (Bielski ve Chan, 1973) oksitleyebilir. Metal komplekslerini, metal iyonlarını ve sitokrom C yi indirgediği gösterilmiştir (Mc Cord ve Fridovich, 1969).

#### *Hidrojen Peroksit*

Hidrojen peroksit, SOD enziminin katalizlediği bir reaksiyonla  $O_2^-$  anyonunun dismutasyonu sonucu meydana gelir. Amino oksidaz ve ksantin oksidaz gibi enzimler de  $O_2^-$  anyonundan  $H_2O_2$  oluştururlar.  $H_2O_2$  pH 10'un altında radikal olmayan nötral bir moleküldür ve suda olduğu gibi biyomembranları geçerek dağılılabılır. Bir stres işareti olarak  $H_2O_2$ 'nin görevi hücre içi ve hücreler arası dağılılabirliğine dayanır (Karpinski ve ark., 1999). Hidrojen peroksit Cu ve Fe elementlerinin varlığında süperoksit radikali ile reaksiyona girebilir ve daha reaktif  $OH^\cdot$ 'e dönüşür (Thompson ve ark.,1987). Kloroplastik askorbat peroksidaz (AP) izozimleri, elektron donörü olmadığında  $H_2O_2$  ile oksitlenir (Hossain ve Asada, 1984). Cu/Zn SOD,  $Cu^{+2}$  iyonlarının, reaksiyon merkezinde  $Cu^+$  ya indirgenmesi yoluyla  $H_2O_2$  ile işlevsiz duruma getirilir ve  $OH^\cdot$  oluşumu gerçekleşir ( Hodgson ve Fridovich, 1975).

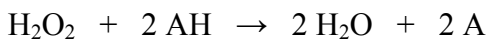
Buğday yaprağının kloroplastlarından izole edilen Cu/Zn SOD zayıf ışık ile hareketsiz duruma getirilmiştir. Çoğunlukla bunun nedeni ışık karşısında  $H_2O_2$  üretilmesidir (Casano ve ark., 1997). Aynı şekilde FeSOD 'da  $H_2O_2$  ile hareketsizleştirilir (Beyer ve Fridovich, 1987). Bu enzimlerin işlevsiz hale getirilmesi mikromolar ve milimolar  $H_2O_2$  düzeylerinde meydana gelir. Hidrojen peroksit temizleyen enzimler etkili bir şekilde işlemediğinde bu oranlar artabilir .

$H_2O_2$ , katalaz (CAT) ve peroksidazlar tarafından temizlenir. CAT,  $H_2O_2$ 'yi  $O_2$  ve  $H_2O$ 'ya dönüştürür.

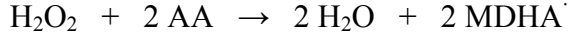


CAT peroksizomlarda yerleşmiştir ve lipidlerin  $\beta$ - oksidasyonunda ve solunumda üretilen  $H_2O_2$ 'yi temizleme işinden sorumludurlar (Scandalios ve ark., 1997).

Peroksidazlar bir elektron donörü (AH) kullanarak  $H_2O_2$ 'i  $H_2O$ 'ya indirgeyerek temizlerler.



Kloroplastlardaki başlıca peroksidaz, elektron donörü olarak AA kullanan ve monodehidroaskorbat radikali(MDHA $\cdot$ ) oluşturan AP'dır..



AP tilakoitlere bağlı ve çözünebilen izoformları belirlenmiştir (Asada, 1997). Kloroplastlardaki AA konsantrasyonu (yaklaşık 10 mM) AP'ın Km (Enzim maksimal hız ile çalışırken yüzeyine bağlı substrat konsantrasyonunun yarısını gösteren sabite) değerinden çok daha yüksektir (0.5 mM). Bu nedenle kloroplastlarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> temizleme kapasitesi AP içeriğinin kontrolü altındadır. Kloroplastlar (tilakoitlere bağlı ve çözünebilen) 70 µM AP içerdiğinden dolayı aydınlatma altında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu 0.5 µM gibi düşük düzeyde tutulur (Asada, 1994). AP hareketsiz durumda olduğunda üretilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yeterli bir şekilde temizlenemez ve kloroplast dışına yayılır (Nakano ve Asada, 1981). AP sitosolde, peroksizomlarda ve mitokondride bulunur (Jimenez ve ark., 1997).

#### *Hidroksil Radikal*

Yüksek oksitleyici gücünden dolayı HO $\cdot$  organik ve inorganik moleküllerle hidrojen çıkarma veya elektron transferi yoluyla reaksiyona girer. Reaksiyon aynı zamanda genellikle HO $\cdot$ 'dan daha uzun ömürlü ve daha az reaktif olan radikaller de üretir. Böyle uzun ömürlü radikaller O<sub>2</sub> ile tepkimeye girdiklerinde radikal zincir reaksiyonları oluşturulur (Perl-Treves ve Perl, 2002).

HO $\cdot$  üretildiği yerin yakınındaki çoğu moleküllerle seçici davranmadan tepkimeye girer. Böylece uzak mesafelere dağılamaz. Başka bir deyişle OH $\cdot$  için spesifik tutucular yoktur. HO $\cdot$  toksisitesinden hücrelerin etkili şekilde korunması ancak O<sub>2</sub> $\cdot^-$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve geçiş metal iyonlarının düşük düzeyde tutulmasıyla olur. Hücrelerde meydana geldiği anda HO $\cdot$  bir reaksiyon kümesi ile temizlenirler. Her hücre bölümünde bol miktarda bulunan indirgenler olan AA ve GSH, OH $\cdot$  üretildiği yerde bulduklarında ilk savunular olarak hareket ederler. Su stresi sırasında mannitol ve trehalose gibi bazı uygun bileşiklerin HO $\cdot$  temizledikleri ve stres toleransına katkıda buldukları işaret edilmiştir (Smirnoff, 1993).

#### *Singlet Oksijen*

Singlet oksijen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği

gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da neden olur. Oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitalle yer değiştirmesiyle oluşur (Akkuş, 1995).

Yüksek enerji ve dönme durumundan dolayı  $^1\text{O}_2$ 'nin organik moleküllere karşı reaktifliği moleküler oksijenden çok daha fazladır.  $^1\text{O}_2$  nükleofiliktir ve sıklıkla diğer molekülleri divalent olarak oksitler, hidroperoksit ve endoperoksit şekillerine çift bağlar ekler, proteinleri oksitleyerek zarar verir (Halliwell ve Gutteridge, 1999).  $^1\text{O}_2$  bir radikal olmadığı için bu reaksiyonlar radikal üretmez ve doğrudan zincir reaksiyonlar başlatmaz. Bununla beraber peroksitlerin indirgenmesi durumunda oldukça reaktif alkoksil radikaller meydana gelir.

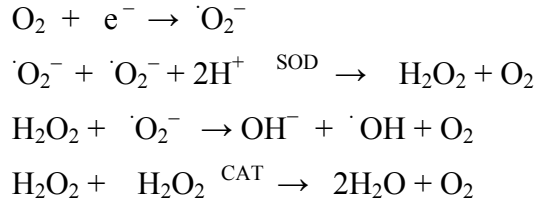
En çok etkili  $^1\text{O}_2$  temizleyen molekül  $\beta$ -karotendir.  $\beta$ -karoten doğrudan  $^1\text{O}_2$  ile tepkimeye girer ve ısı olarak uyarılma enerjisini dağıtır. Bunun yanında triplet klorofil ( $^3\text{Chl}^*$ ) ile reaksiyona girer ve onu  $^1\text{Chl}$ 'ye dönüştürür. Böylece  $^1\text{O}_2$  oluşması önlenmiş olur. Tilakoit membranların çift lipit tabakalarında bulunan  $\alpha$ -tokoferol de  $^1\text{O}_2$ 'leri temizler. AA ve GSH da milimolar düzeyde olduklarında  $^1\text{O}_2$  toplayabilirler (Perl-Treves ve Perl, 2002).

### 1.5. Koruyucu Antioksidant Savunma Sistemleri

Aerobik organizmalar çeşitli dış kaynaklı çevresel etkilerin sonucu olarak veya normal metabolik aktiviteleri süresince meydana gelen toksik oksijen ara ürünlerini etkili bir şekilde detoksifiye etmek ihtiyacı duyarlar. Hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan enzim yapısında olan ve enzim yapısında olmayan çok sayıda savunma mekanizmaları vardır. Enzimatik olmayanlar arasında glutatyon, sistein, hidrokinonlar, mannitol, vitamin C ve E, flavonoidler, bazı alkoloidler ve  $\beta$ - karoten sayılabilir (Larson,1988).

Enzim yapısında olan antioksidant savunma sistemleri oksijen ara ürünlerini ve serbest radikalleri toplama, nötralize etme ve ortamdaki uzaklaştırabilme işlevlerini yaparlar. Enzim yapısında olan antioksidant savunma sistemleri kloroplast ve mitokondrilerdeki  $\text{H}_2\text{O}_2$  yi topladığı kabul edilen askorbat peroksidaz (AP) ve glutatyon redüktaz (GR)'dir. (Foyer ve Halliwell, 1976).  $\text{H}_2\text{O}_2$  yi etkili bir şekilde ortamdaki uzaklaştıran CAT ve peroksidazlar,  $\text{O}_2^-$  anyonunu toplayan SOD'dır. CAT

ve SOD en etkili antioksidant enzimlerdir. İki enzimin kombine çalışması, potansiyel tehlikeli  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$ 'i suya ( $H_2O$ ) moleküler oksijene ( $O_2$ ) çevirirler. Böylece hücrel hasarı önlerler.



SOD ve CAT kombine çalışması oldukça toksik ve reaktif oksidant olan ve bütün makromoleküllere saldıran  $OH^\cdot$  oluşumunu azaltır (Scandalios, 1993).

#### *Süperoksit Dismutaz*

Süperoksit dismutaz (SOD; süperoksit: süperoksit oksidoredüktaz; EC 1.15.1.1) antioksidatif stres savunma mekanizmasının anahtar enzimidir ve  $O_2^-$ 'i  $O_2$  ve  $H_2O_2$  ye dönüştürdüğünden  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$ 'nin hücre derişimlerini doğrudan belirler (Van Camp ve ark., 1994).



Birkaç istisna hariç tutulursa SOD' lar bütün aerobik organizmalarda bulunur ve aktifleşmiş oksijen araürünleri ile zorunlu olarak temas halinde olan bütün hücre bölümlerinde yer alır. SOD'lar bakır/çinko (Cu/Zn), demir (Fe) ve mangan (Mn) içeren izoenzimler olarak metal kofaktörlerine göre sınıflandırılırlar. FeSOD ve MnSOD proteinleri yapı olarak benzemelerine rağmen Cu/ZnSOD'lar farklıdır (Bowler ve ark., 1994). Deneysel metotla üç tip SOD,  $H_2O_2$  ve KCN'e hassasiyetlerine göre birbirlerinden kolayca ayrılabilirler. Cu/ZnSOD'un hem KCN hem de  $H_2O_2$ 'ye hassas olduğu, FeSOD'un sadece  $H_2O_2$ 'ye ve MnSOD'un ise her iki inhibitöre karşı dayanıklı olduğu gösterilmiştir (Kaminaka ve ark., 1999).

SOD'ların inhibitörlere karşı farklı hassasiyetleri yanında hücredeki dağılımları da ayırt edici bir özelliktir. SOD izozimlerinin miktarı da her bir organizma için farklıdır. Kontrollü gelişim ve çevresel stresler (UV, ozon, atmosfer kirleticileri, düşük sıcaklık, tuz stresi, kuraklık, sıcak şoku, patojen enfeksiyonları gibi) aktif oksijen türlerini meydana getirerek bitkinin SOD aktivitesini tetiklediği gösterilmiştir (Van Camp ve ark., 1994). MnSOD bütün ökaryotik hücrelerin

mitokondrilerinde, Cu/ZnSOD'lar yüksek bitkilerin kloroplastlarında, peroksizomlarda ve sitosolde bulunur. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda FeSOD'lar sadece prokaryotlar ve bitkilerin kloroplastlarında bulunmuştur (Perl-Treves ve Perl, 2002).

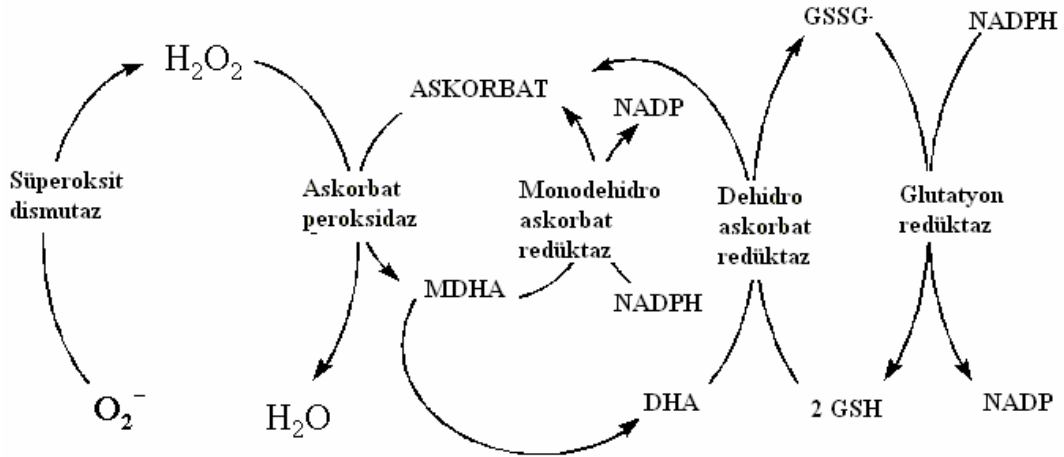
#### *Askorbat Peroksidaz*

Peroksidazlar, bitkilerde bulunan aktif oksijen türlerine karşı savunma sisteminin ikinci sınıf enzimlerini oluştururlar (AP; EC 1.11.1.11). AP'lar bitkilerin sitosol ve kloroplastlarında, alg ve bazı siyanobakterilerde askorbat-glutasyon döngüsü yoluyla zararlı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi yıkarlar (Şekil 1.5.). Askorbat-glutasyon yolu özellikle fotosentetik dokularda oksidatif strese karşı korumayı birbirine bağlı redoks reaksiyonları ile sağlar (Foyer ve Halliwell, 1976). Bunun yanında mitokondri ve peroksizomlarda da AP oksidasyon-redüksiyon reaksiyonunda bir elektron donörü olarak AA kullanarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi yıkar ve ardından askorbat, MDHA'a oksitlenir (Jimenez ve ark., 1997).



AA kloroplast membranında Fd tarafından yeniden MDHA'dan (Miyaka ve Asada, 1994) yada NADPH harcanarak stromada monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) ile yeniden oluşturulur. MDHA aynı zamanda kendiliğinden askorbata ve dehidroaskorbata (DHA) ayrışır. DHA, dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) tarafından yeniden indirgenir. DHAR, elektron donörü olarak, GSH kullanır. Oluşan okside glutasyon (GSSG) NADPH tüketen glutasyon redüktaz (GR) ile yeniden kullanılacak hale dönüştürülür (Şekil 1.2.).

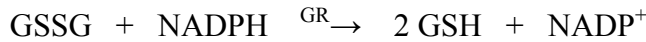
Kloroplastlarda bulunan SOD ve AP enzimleri hem çözülebilir halde hem de tilakoid membranlara bağlı olarak bulunurlar. Membran yüzeyinde oluşan O<sub>2</sub><sup>-</sup> tutulabilir ve derhal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ye çevrilir ve membrana bağlı AP tarafından ortamdaki temizlenir. İzole edilen bozulmamış kloroplastlar dışardan verilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i süratli bir şekilde metabolize etmişlerdir. (Neubauer ve Schreiber, 1989).



**Şekil 1.2.** Halliwell- Asada yolu (Foyer ve Halliwell, 1976).

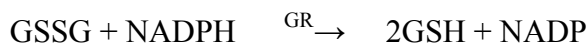
#### *Glutatyon Redüktaz*

Glutatyon redüktaz (GR) elektron donörü olarak NADPH ile birlikte GSH havuzunun yenilenmesini sağlayan “Halliwell-Asada” yolunu tamamlar.



GR bir flavoproteindir. GR aktivitesi bitkilerde en fazla kloroplastlarda bulunurken mitokondrial ve sitosolde de izozimleri tanımlanmıştır (Cressien ve ark., 1994).

GSH enzimler üzerindeki tiyol (SH) gruplarını koruyan, bir disülfid redüktant olarak askorbatın rejenerasyonunda işlev görür. <sup>1</sup>O<sub>2</sub> ve OH’ lerle tepkir (Klapheck, 1988). DHAR (E.C. 7.8.5.1) (Şekil.1.5.) enzimi aracılığıyla DHA’dan AA rejenerasyonuna katılır. Böyle reaksiyonlarda GSH, glutatyon disülfide (GSSG ) oksitlenir. GSH, NADPH bağımlı bir reaksiyonda GR tarafından rejenere edilir (Şekil 1.5.). Creissen ve ark. (1996) GR’ın kloroplastlarda, mitokondride ve sitosolde bulunduğu mısırdaki yaptıkları çalışmada açıklamışlardır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda bunu doğrulamıştır (Hernandez ve ark., 2000).



#### *Katalaz*

Katalaz (CAT) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’in suya ve oksijene dismutasyonunu katalizleyen hem-içerikli bir enzimdir. Bu enzim bütün aerobik ökaryotlarda bulunur ve peroksizomlarda meydana getirilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’i uzaklaştırılmasında önemlidir. CAT

oldukça yüksek düzeyde izole edilebilen ilk enzimlerden biridir. Enzimin bütün formları tetramerdirler ve molekül ağırlığı 220.000 den fazladır. CAT'ın birçok çoklu formları bazı bitkilerde tanımlanmıştır. Bu formlar mısırdan klonlanmış (Redinbaugh ve ark. 1988; Scandalios, 1990) ve homolog genler de diğer birçok bitkiden klonlanmıştır. CAT-1 ve CAT-2 peroksizomlarda ve sitosolde lokalize olurken CAT-3 mitokondrilerde lokalize olur. Yalnızca bitki CAT'ı patateste araştırılmış ve NADPH içermediği bulunmuştur (Beaumont ve ark.,1990). Bu konuda ilginç olan nokta CAT ışığa karşı çok hassastır ve PS II' nin D 1 proteinine benzer bir şekilde hızlı bir turnovıra sahiptir. Bu belki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in CAT'ı inaktive etmesinin veya hem grubunun ışığı absorblamasının bir sonucu olabilir. Şok sıcaklık ve soğukluk gibi protein turnovırının oranını azaltan stres koşulları CAT aktivitesinin azalmasına neden olmaktadır (Hertwig ve ark., 1992). Bu, bitkilerdeki çevresel stresin oksidatif bileşenlerini tolere edebilme yeteneğine sahip olmasından ileri gelmektedir. Kloroplastlarda CAT ya çok az yada hiç bulunmaz (Asada, 1994).

CAT izozimlerinin biyokimyasal özellikleri birbirinden farklıdır. CAT ışık engellemesine uğradığı için devamlı olarak sentezlenmesi gerekir. Protein sentezini engelleyen stres faktörleri CAT'ın aktivasyonunu engeller. Bu olumsuz etki AA, GSH ve AP'da meydana gelen artışlarla telafi edildiği gibi PS II' nin fotoinhibisyonu süresince H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin üretimini azaltarak da telafi edilebilir (Volk ve Feierabend, 1989).

#### *Karotenoitler*

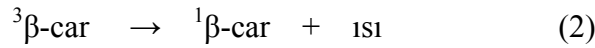
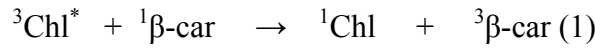
Karotenoitler hem bitkileri hem de hayvanları oksidatif hasara karşı koruyan ve yağda çözünebilen moleküllerdir. β-karoten, vitamin A'nın esas öncül maddesidir. Bitki karotenoitleri kloroplastlarda ve kromoplastlarda isopentenil difosfattan meydana gelir. (Beyer, 1989).

Hem fotosentetik hem de fotosentetik olmayan dokularda bulunan karotenoitler kloroplastlarda ışık toplama özelliği olan yardımcı pigment olarak görev yaparlar. Fakat çok daha önemli rolü fotosentetik kompleksin ışıkla uyarılması üretilen <sup>3</sup>Chl\* ve aktif oksijenin çeşitli şekillerini detoksifiye etme özelliğidir. Uyarılmış bir karoten molekülü enerjiyi antenlerdeki diğer pigmentlere ya transfer

ederek yada ısı olarak dağıtarak tekrardan temel durumuna dönebilir (Parker ve Joyce, 1967).

Antioksidant özellikleriyle ilgili olarak karotenoitler dört yoldan birisiyle fotosistemleri koruyabilirler. Lipit peroksidasyon ürünleri ile tepkime vererek zincirleme reaksiyonları bitirirler (Burton ve Ingold, 1984);  $^1O_2$ 'i toplar ve ısı olarak enerjiyi dağıtır;  $^3Chl^*$  veya uyarılmış klorofil molekülleri ile tepkime verip,  $^1O_2$ 'in oluşmasını önler (Mathis ve Kleo, 1973) yada ksantofil çevrimi sırasında oluşan fazla uyarma enerjinin dağıtarak fotosistemleri korurlar.

Fotosentetik dokularda  $\beta$ -karotenin asıl koruyucu rolü  $^3Chl^*$ 'i doğrudan temizlemesi ve bunun sonucu olarak  $^1O_2$ 'in oluşmasını önlemesidir, böylece oksidatif stresten tamamen sakınılmış olunur.



1 ve 2 deki denklemlerdeki reaksiyonlarda enerji klorofilden bir karotenoite aktarılır ve sonuç olarak karotenoit enerjiyi ısı şeklinde dağıtır (Mc Kersie ve Leshem, 1994).

Bu çalışmada, besin çözeltisi içeren Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan *N. officinale*'de Pb birikiminin fizyolojik etkileri, kök, gövde ve yapraklarda besin elementlerinin miktarı, lipit peroksidasyonu ve Pb'nin dağılımı ve Pb'nin oluşturduğu strese bağlı antioksidant enzimlerin aktivitelerindeki değişiklikler araştırılmıştır.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### *Ağır Metaller*

Ağır metaller karasal ekosistemin farklı kısımlarında bulunan doğal elementlerdir. Bunların çoğu insan, hayvan ve bitkiler için gerekli olan mikrobeyimlerdir. Jeolojik işlevlerin sonucu olarak toprakların metal düzeyleri bazen yüksek miktarlarda bulunur. Bununla beraber yüksek metal konsantrasyonları genellikle tarımsal ve sanayi aktivitelerinden kaynaklanır (Freedman ve Hutchinson, 1981).

Bütün bitkiler büyüme ve gelişmeleri için gerekli olan ağır metalleri topraktan ve sudan alıp biriktirebilme yeteneğine sahiptirler. Bu metaller Fe, Mn, Zn, Cu, Mg, Mo ve Ni'dir. Bazı bitkilerin de biyolojik fonksiyonları bilinmeyen Cd, Cr, Pb, Cu, As, Se ve Hg gibi metalleri biriktirdikleri yapılan araştırmalarda gösterilmiştir (Baker ve Brooks, 1989; Raskin ve ark., 1994).

Vasküler sucul bitkilerin dokularında yapılan metal birikimi araştırmalarında bu bitkilerin yakınlarındaki su ortamından 10 ve 10<sup>6</sup> kat daha fazla metal biktirdiği bulunmuştur (Kovacs ve ark., 1984). Bundan dolayı makrofitler doğrudan ve dolaylı olarak akuatik ekosistemlerdeki ağır metal döngüsünde önemli rol oynarlar (St-Cyr ve ark., 1994). Metal akümülyasyonu bitki türüne, organlarına, su içindeki metal iyonlarına, metal kontamineli partiküllerin geçişine, pH ve sıcaklık gibi abiyotik faktörlere bağlıdır (Lewis,1995 ; Lewander ve ark., 1996).

### *Kurşunun Bitkilere Toksik Etkileri*

Dünyanın her yerindeki doğal kaynaklarda bir çok formda bulunan Pb iz elementlerin en çok yaygın olanlardan birisidir (Nriagu,1992). Pb sanayi atıklarından ve araba eksozlarından çevreye yayılarak toprak ve bitkilere bulaşabilir. Organik madde ve besin içeriği bol olan yerlerde büyüyen bitkilerde Pb toksisitesi meydana gelmediğini gösteren çalışmalar vardır (Baumhardt ve Welch, 1972). Fakat maden atıklarının bulunduğu yerlerde toprağın besin içeriği ve organik madde miktarı da yeterli değilse Pb toksisitesi meydana gelmektedir (Woolhause, 1983).

Kurşun toksisitesine toleransı olmayan bitkilerde, Pb toksisitesinin mitoz hasarı (Levan,1945; Ramel,1973), çekirdek hasarı (Liu ve ark.,1994), kök

büyümesinin inhibisyonu (Lane ve Martin, 1980), klorozisin ortaya çıkması (Johnson ve Proctor, 1977), enzim aktivitelerinin inhibisyonu (Hampp ve ark.,1973) ve fotosentezin azaltılması (Bazzaz ve ark., 1974) ile ilişkili olduğunu gösteren birçok çalışma vardır.

Ağır metaller üzerine yapılan bir çalışmada kurşun ve kadmiyumun domates ve patates bitkilerinde kuru madde ve besin derişimlerine etkisine bakılmış, düşük dozlarda kurşun ve kadmiyumun olumlu etkisi, yüksek dozlarda toksik etkisi olduğu ayrıca domatesin patatesten ağır metallere karşı daha toleranslı olduğu görülmüştür. Her iki bitki için toksisite sıralaması Cd>Pb şeklinde olmuştur (Khan ve Khan, 1983).

Besin çözeltisi ile çeşitli bitkilerde yapılan deneyler toksisite başlangıcı için bitkideki 20-35 mg / kg kuru madde kurşun miktarının kritik değer olduğunu ortaya çıkarmıştır (Sauerbeck, 1983).

#### *Bitki Organlarında Pb Dağılımı*

Kontamine olmamış topraklarda bitkilerin kurşun içeriği genellikle <10 µg/g kuru maddedir. Besin çözeltisi ve toprak ile yapılan saksı denemelerinde, ortamdaki kurşun artışına bağlı olarak bitkinin kurşun içeriğinin de arttığı bulunmuştur (kg kuru maddede birkaç yüz mg'a kadar). Kurşun önce bitkinin kök yüzeyinde ya da içinde birikmekte ve ancak yüksek kurşun uygulamasında üst organlara doğru taşınmaktadır. Yüksek kurşun içeriğine sahip topraklarda yetişen bitkilerde de ekstrem kurşun değerlerine rastlanmıştır. Yapılan çalışmalarda pancar yaprağında 100 mg/kg kuru maddenin üzerinde (Koster ve Merkel, 1983), kurşun içeriği yüksek topraklarda yetişen bitkilerin gövdelerinde 480 mg/kg kuru madde ve köklerinde 720 mg/kg Pb ölçülmüştür (Horak, 1979).

#### *Lipit Peroksidasyonu*

Bitkilerde metallerin birikimi metal tolerans kapasitesi ile ilişkili olarak doğrudan bazı hücrel değişiklikleri de beraberinde getirir. *P. crispus*'da civa akümülyasyonu lipit peroksidasyonuna neden olmuş ve MDA düzeyinde artma belirlenmiştir (Ali ve ark.,2000). Somashekaraiah ve arkadaşlarının (1992) yaptığı çalışmada *Phaseolus vulgaris*'in kadmiyum muameleli çimlenme denemesinde MDA düzeyinde artma meydana gelmiştir.

*Serbest Oksijen Radikalleri*

Reaktif oksijenin türleri atmosferik oksijenin ( $O_2$ ) kısmen indirgenmiş ara ürünleridir. Bunlar ya atmosferik oksijenin ( $O_2^1$ ) formuna dönüşmesi sırasında ya da bir, iki veya üç elektronun oksijene transferi sırasında meydana gelen  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  veya  $OH^-$ 'dir. Atmosferik oksijenin aksine, reaktif oksijen türleri çeşitli hücrel bileşenleri sınırsız oksitleme yeteneğine sahiptirler ve hücrenin oksidatif hasarına neden olurlar (Asada ve Takahashi 1987; Hommond-Kosack ve Jones, 1996 ).

*Serbest Oksijen Radikallerine Karşı Savunma Mekanizmaları*

Bitkiler, oksijen türleri tarafından başlatılan hasarı tamir etmek ve hafifletmek için kompleks antioksidant (hem enzim hem de enzim olmayan) sistemler geliştirmişlerdir. Zn'nun toksik düzeylerine maruz bırakılan *B. juncea* fidanlarında SOD aktivitesinde artış görülmüştür ( Prasad ve ark. 1999). Artan SOD aktivitesi Cu, Mn ve Fe gibi ağır metallerin toksik düzeylerine maruz bırakılan bitkilerde de gözlenmiştir ( Del Rio ve ark., 1985). Bununla beraber Zn ve Cd'nin toksik düzeylerine bırakılan fasulye ve arpa bitkilerinde SOD aktivitesinde artış gözlenmemiştir (Weckx ve Clijsters 1997 ; Patra ve Panda, 1998).

Bitki hücrelerinde fotorespirasyon ve SOD aktivitesinden dolayı meydana gelen  $H_2O_2$  (Corpas ve ark., 1993; Hernandez ve ark., 1995) hızlı bir şekilde membranların karşı tarafına geçerek yayıldığı (Corpas ve ark., 1993 ) hem redüktant hem de oksidant gibi hareket ettiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir ( Gille ve Singler, 1995 ; Foyer ve ark., 1997).

Bezelye kök hücrelerinin 1mM  $Pb(NO_3)_2$  etkisine 96 bırakılması sonucu yapılan çalışmada antioksidant sistemin iki bileşeni olan SOD ve CAT aktivitesindeki değişiklikler eşzamanlı olarak belirlenmiştir. SOD aktivitesinde 24 saatin sonunda kontrolün 3 katı kadar bir artış gözlenmiş ve artma devam etmiştir. 96. saatin sonunda ise %17 oranında bir azalma gözlenmiştir. Aynı süre içinde CAT aktivitesinde de sürekli bir artış gözlenmiş, 72 saat sonra yapılan ölçümde artışın kontrolün 6 katı kadar olduğu görülmüştür. Kalan 24 saat sonra ise CAT aktivitesi %33 oranında düşmüştür (Malecka ve ark., 2001).

Rucinska ve arkadaşlarının (1999) Lupin (acı bakla) köklerinde yaptıkları çalışmada  $150 \text{ mg L}^{-1}$  Pb derişiminde serbest radikallerin kontrol düzeylerinde

kaldığını, oysaki 350 mg L<sup>-1</sup> Pb derişiminde önemli miktarda artıklarını göstermişlerdir. Kök ucu özütlerinden yapılan analizde SOD aktivitelerinde artış gözlenirken CAT ve AP aktivitelerinde yüksek derişimlerde azalma bulmuşlardır. Bu sonuçlardan elde ettikleri bulgularla, yüksek kurşun derişimlerinde hem serbest radikallerin hem de reaktif oksijen türlerinin antioksidant sistem kapasitesinin üstünde olduğunu ve bu sıralamanın kök büyümesinin azalmasına katkıda bulunduğunu ileri sürmüşlerdir.

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Çalışmada Kullanılan Bitki Materyali

Su teresi (*Nasturtium officinale* R. Br.) ekolojik ve ekonomik öneme sahip tatlı su makrohidrofitlerinin en önemlilerinden biridir. Uzun yıllardan beri insanlar tarafından besin olarak kullanılmakla beraber tıbbi bir bitki olarak da değerlendirilmektedir (Lee ve Newman, 1997; Stern, 1994). Yaprakları iskorbüt hastalığının, tüberkülozun ve şeker hastalığının tedavisinde, nezle ve gripde balgam söktürücü, astım, bronşit, guatr, iktidarsızlık ve hepatit tedavisinde de yöresel olarak kullanılmaktadır (Duke, 1992). Bu kullanımlarının yanısıra su teresi atık suların arıtılmasında da kullanılmaktadır (Ji ve ark., 1990; Midlen ve Redding, 1998). Sistematikteki yeri aşağıda verilen, botanikçiler tarafından Rorippa ve Radicula gibi alternatif isimler de konulmuş olan su teresi (*Nasturtium officinale* R. Br.) *Nasturtium* cinsine ait çok yıllık, rizomlu, emers (yarı batık hidrofit) bir tatlı su bitkisidir (Günlü ve Kesici, 2002).

Alem : Plantae  
Altalem : Embryophyta  
Bölüm : Spermatophyta  
Altbölüm : Angiospermae  
Sınıf : Dilleniidae  
Takım : Capparales  
Familya : Brassicaceae – Cruciferae  
Cins : *Nasturtium*  
Tür : *Nasturtium officinale* R.Br.  
(Cook, 1996; Seçmen ve ark. 1995).

Araştırma materyali olan *N. officinale* Adana ili, Ceyhan ilçesi, Narlık köyü civarında otoyola yaklaşık 10 metre uzaklıkta bulunan dere yatağından Aralık-2003 tarihinde vejetatif dönemlerinde iken toplanmıştır. Dereye kanalizasyon ve sanayi atığı karışmamaktadır. Otoyolda trafik akışı yoğun değildir.



Şekil 3.1. *N. officinale*'nin morfolojik kısımları ([http://caliban.mpiz-koeln.mpg.de/~stueber/thome/band2/tafel\\_116\\_small.jpg](http://caliban.mpiz-koeln.mpg.de/~stueber/thome/band2/tafel_116_small.jpg)).

### 3.1.2. Kullanılan Çözeltiler

#### *Kurşun Asetat [Pb(CH<sub>3</sub>COOH)<sub>2</sub>] Çözeltisi*

Çalışma materyali *N. officinale*'nin Pb alınımının belirlenen parametrelerdeki değişiklikleri belirlemek amacıyla Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> kullanılmıştır. Bu amaçla 500 mg/l'lik Pb stok çözeltisi hazırlanmış ve bu stok çözeltden 10, 25, 50, 100, 200 ve 250 mg/l'lik derişimli çözeltiler oluşturulmuştur. Kontrol çalışması için kurşunsuz ortam hazırlanırken 500 mg/l Pb için ayrı çözeltiler hazırlanmıştır.

#### *Hoagland Besin Çözeltisi*

<b><u>TUZ</u></b>	<b><u>g/l</u></b>
KNO <sub>3</sub> .....	1,02
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .....	0,492
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,23
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O .....	0,49

<b><u>TUZ</u></b>	<b><u>mg/l</u></b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	2.86
MnCl <sub>2</sub> . 5H <sub>2</sub> O .....	1. 81
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O .....	0.08
ZnSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O .....	0.022
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O .....	0.09
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O .....	% 0.5
Tartarik Asit .....	% 0.4

FeSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O ve Tartarik asit çözeltileri karıştırılarak 0.6 ml/l olacak şekilde hazırlanmıştır (Hasman, 1972). Bu çözeltden 1000 ml'lik stoklar hazırlanmış ve yetiştirme ortamlarına litreye % 10 ölçüsünde kullanılmıştır.

#### *pH Ayarlama Çözeltileri*

Besin çözeltilerinin pH'sını ayarlamak için 0.1 N NaOH (Merck) ve 0.1 N Asetik asit (CH<sub>3</sub>COOH<sub>2</sub>) (Merck) hazırlanmıştır.

*Aseton Çözeltisi*

*N. officinale* yapraklarındaki klorofil-a, klorofil-b ve total karoten miktarlarını ölçmek için % 100' lük aseton (Merck) kullanılmıştır.

*Örnek Islama Çözeltisi*

HNO<sub>3</sub> (Merck) ..... Derişik

HCL (Merck) ..... Derişik

HCL (Merck) ..... 10 N

Bitki organlarında bulunan metal miktarlarını belirlemek amacıyla kullanılmıştır.

**3.2. Metod****3.2.1 Bitkilerin Muamele Ortamı ve Düzenegi**

Doğal ortamlarından laboratuara getirilen bitkiler itina ile artık maddelerinden temizlenip kültür ortamlarına yerleştirilmiştir. Kültür ortamı için % 10 luk Hoagland besin çözeltisi hazırlanmıştır. Çeşme suyu ile yıkanan bitkiler ardından saf su ile yıkanıp 5 gün süresince kültür ortamında adaptasyona bırakılmıştır. Laboratuar sıcaklığı 18 °C olarak ayarlanmış, ışıklandırma koşulları ise 10 saat gündüz, 14 saat gece olarak belirlenmiş, aydınlanma olarak sadece gün ışığından yararlanılmıştır.

Bitkilerin, içerisinde 14 gün bırakılacakları Pb'nin farklı derişimlerdeki yetiştirme ortamları için 2.5 litrelik pet şişeler kullanılmış ve şişelerin etrafları köklerin ışık almaması için siyah naylon poşetlerle kaplanmıştır. Stres faktörü olarak kullanılan Pb(CH<sub>3</sub>COOH)<sub>2</sub> ile 500 mg/l Pb stok çözelti hazırlanmış ve diğer derişimler (10, 25, 50, 100, 200 ve 250 mg/l Pb) stok çözeltilerden seyreltilerek hazırlanmıştır. 500 mg/l Pb için ayrıca çözelti hazırlanmıştır. Hoagland besin çözeltisinden her yetiştirme ortamına % 10 olacak şekilde eklenmiştir. Her farklı derişim 4 paralel olarak çalışılmıştır. Bazı parametreler 3 paralel olarak hesaplanmıştır. Kültür ortamları, pH 7±0.1 olacak şekilde asit-baz ayarlamaları 0.1N NaOH ve 0.1N asetik asit (CH<sub>3</sub>COOH<sub>2</sub>) kullanılarak ayarlanmıştır. Deney süresi 14 gün olarak belirlenmiş ve bu süre içerisinde yetiştirme ortamlarının çözeltileri iki

günde bir değiştirilmiş, her derişim ortamının pH'sı yeniden ayarlanmış ve günlük morfolojik gözlemler kaydedilmiştir.

### 3.2.2. Bitki Örneklerinin Analizlere Hazırlanması

Laboratuarda belirlenen koşullar altında 14 gün süreyle  $Pb(CH_3COOH)_2$  etkisine bırakılan bitki örnekleri bu süre sonunda ortamlarından çıkarılmış, önce çeşme suyu ardından bolca saf su ile itina ile yıkanıp kaba filtre kağıdı ile suları alındıktan sonra kök, gövde ve yaprak kısımlarına ayrılmıştır. Bitkinin tepesinde bulunan ilk yapraktan itibaren 4. yapraklar fotosentetik pigment analizi için 0.1 g taze yaprak örneği alınmıştır. Enzim analizleri ve lipit peroksidasyonu için 0.5 g gövde ve yaprak kısımları alınarak sıvı azotta dondurulmuş ve  $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 'de derin dondurucuda saklanmıştır. Bitkinin tepesinden itibaren 4. yaprağa kadar olan gövde ve yaprak kısımları ayrılarak taze ağırlıkları ölçülmüş ve  $70\text{ }^\circ\text{C}$  ye ayarlanmış etüvde 24 saat süresince kurutulmuştur. Etüvden çıkarılan bitki kısımları desikatöre konulmuş ve oda sıcaklığına gelince kuru ağırlıkları ölçülmüştür. Bu değerlerden bitki kısımlarının kuru madde ve su içerikleri belirlenmiştir.

### 3.2.3. Mineral Element Analizleri

Desikatöre alınan kurutulmuş örnekler öğütüldükten sonra 1g örneğe 10 ml konsantre  $HNO_3$  olacak şekilde 50 ml' lik erlenlerde ağızları balonlarla kapatıldıktan sonra birkaç gün bekletilmiştir. Isısı ayarlanabilen ( $400^\circ\text{C}$ ) hot plate üzerinde renkli buharlar kayboluncaya kadar yavaş yavaş ısıtılmış sonra ısı biraz yükseltilmiş erlenlerin üzerindeki balonlar alınmış, tortu kalıncaya kadar yavaş yavaş buharlaştırılmıştır. Erlenlere 10 ml konsantre HCL ilave edilerek aynı işlem yenilenmiştir. Örneklerin tümü buharlaştıktan ve dipteki tortu kuruduktan sonra erlene konan 1g örnek için 10 ml 10 N HCL ile sulandırılmıştır. Sulandırılan örnekler atomik absorpsiyon spektrometresinde (Perkin Elmer-3100) okunmuştur (Horwitz,1970).

Tüm bitki kısımlarındaki metal birikim düzeylerini saptamak için standart metal çözeltileri ile absorbanları arasındaki doğrusal ilişkiyi gösteren regresyon

doğrusu kullanılmıştır. Bu doğrular Excel programı kullanılarak bitki kısımlarındaki Cu, Mn, Mg, Zn, Fe, Ca ve Pb derişimleri belirlenmiştir.

#### 3.2.4. Su İçeriği ve Kuru Madde Miktarının Belirlenmesi

Bitkilerin 14 gün süresince Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde yetiştirme işleminin sonucunda hasat edilen bitki kısımları çeşme suyu, ardından saf su ile itinalı bir şekilde yıkanmıştır. Kaba suları filtre kağıdı ile alınarak tartılmış ve taze ağırlıkları kaydedilmiştir. Daha sonra bitki kısımları 70 °C'ye ayarlanmış etüvde 24 saat bırakılmıştır. Etüvden çıkarılan örnekler desikatöre alınarak oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. Ardından kurutulmuş örneklerin kuru ağırlıkları ölçülmüş ve bu değerlerden yüzde su içeriği hesaplanmıştır (Horwitz, 1970).

% Su içeriği : Taze Ağırlık- Kuru Ağırlık / Taze Ağırlık X 100

#### 3.2.5. Fotosentetik Pigment Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Taze yaprak örnekleri (100 mg) 10 ml % 100' lik asetonla porselen havanda homogenize edilmiş ve mavi bant filtre kağıdı kullanılarak filtre edilmiş ve son hacim 10 ml olacak şekilde % 100'lük asetonla (Merck) tamamlanmıştır. Ölçüme hazır hale getirilen örnekler 662 nm' de klorofil-a, 645nm'de klorofil-b ve 470 nm'de total karoten için UV Spektrofotometresinde (Shimadzu UV mini 1240) % 100 asetona (tanık) karşı absornans değerleri okunmuştur. Hesaplamalar Lichtenhaler ve Wellburn (1985) tarafından aşağıda verilen formüllere göre yapılmıştır .

$$\text{Klorofil-a ( Kl-a) } = ( 11.75 \times A_{662} - 2.35 \times A_{645} ) \times 10 / \text{mg T A}$$

$$\text{Klorofil-b (Kl-b) } = ( 18.61 \times A_{645} - 3.96 \times A_{662} ) \times 10 / \text{mg T A}$$

$$\text{Karotenoit} = ( 1000 \times A_{470} - 2.27 \times \text{Kl a} - 81.4 \times \text{Kl b} / 227 \times 10 / \text{mg T A}$$

A: Ölçülen absorbans değeri

### 3.2.6. Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi

Lipit peroksidasyonu ölçümü Hodges ve ark. (1999)' na göre yapılmıştır. Bu amaçla yaklaşık 1g taze yaprak örneği % 80'lik etil alkol ile homogenize edilip ardından 3000 g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra elde edilen ekstrakta analiz iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada, santrifügattan alınan 1 hacim ekstrakt üzerine 1 hacim % 20'lik (ağırlık / hacim) TCA ( trichloroacetik acid) ve 1 hacim % 0.01' lik BHT (Butylated Hydroxytoluene) eklenmiştir. İkinci aşamada, santrifügattan alınan 1 hacim ekstrakt üzerine 1 hacim % 0.65 TBA (2- Thiobarbituric acid) içeren % 20'lik TCA ve bunun da üzerine 1 hacim % 0.01' lik BHT eklenmiştir. Daha sonra karıştırıcıda karıştırılan örnekler 95°C'ye ayarlı su banyosunda 25 dakika inkübe edilmiş ve ardından şok soğutma yapılmıştır (hemen buz banyosuna alınmıştır). Soğutulan örnekler tekrar 3000 g'de santrifüj edilmiş ve santrifügatta birinci aşama örneklerinde 532 ve 600 nm'de, ikinci aşama örneklerinde ise 532, 600 ve 440 nm'de spektrofotometre ile absorbans okumaları yapılmıştır. Sonuçlar aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (ABS : Absorbans, MDA : Malondialdehid).

1.  $ABS_{532+TBA} - (ABS_{600+TBA}) - (ABS_{532-TB} - (ABS_{600-TB})) = A$
2.  $[(ABS_{440+TBA} - ABS_{600+TBA}) \times 0.0571] = B$
3.  $nmol\ MDA / ml = (A - B / 157\ 000) \times 10^6$

### 3.2.7. Enzim Analizleri

Yaklaşık 1 gram taze yaprak örneği sıvı azot ve kuvars kumu yardımıyla, 0.1 mM Na EDTA içeren 50 mM (pH 7.6) fosfor tampon çözeltisi ile (10 ml) homogenize edilmiştir. Homogenize edilen örnekler 15 dakika 15000 g ve +4°C' de santrifüj edildikten sonra elde edilen santrifügatlar enzim ve protein analizlerinde kullanılmıştır.

Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi Cakmak ve Marschner (1992) ve Cakmak (1994)' a göre yapılmıştır. SOD aktivitesi, nitro blue tetrazolyum kloridin

ışık altında  $O_2^-$  tarafından indirgenmesi yöntemine göre ölçülmüştür. Bu amaçla son hacmi 5 ml olan cam şişeler içinde oluşan reaksiyon ortamına 0.1 mM Na-EDTA içeren 50 mM'lık (pH 7.6) fosfor tamponundan koulduktan sonra üzerine (50-150  $\mu$ l), 0.5 mM  $Na_2 CO_3$  (pH 10.2), 0.5 ml 12 mM L-metyonin, 0.5 ml 75  $\mu$ M p-nitro blue tetrazolyum chlorid (NBT) ve 10  $\mu$ M riboflavin eklenmiştir. Nitro blue tetra zolyum' un  $O_2^-$  tarafından indirgenmesi örneklerin 24°C ve 400  $\mu$ mol  $m^{-2} s^{-1}$  ışık intensitesi altında 15 dakika tutulması ile oluşturulmuştur. Bir SOD aktivitesi ünitesi, 560 nm'de ölçülen NBT'nin indirgenme oranının % 50'sinin engellenebilmesi için gereken enzim miktarı olarak ifade edilmiştir.

Askorbat peroksidaz (AP) aktivitesi, Cakmak ve Marschner (1992) ve Cakmak (1994)'a göre 290 nm'de ( $E=2.8 \text{ mM cm}^{-1}$ ) AA'nın oksidasyon hızı ölçülerek saptanmıştır. Buna göre, son hacmi 1 ml olan reaksiyon ortamına, 0.1 mM EDTA içeren 50 mM'lık fosfor tamponu (pH 7.6), 0.1 ml 10 mM EDTA içeren 12mM  $H_2O_2$  , 0.1 ml 0.25 mM L(+) Askorbik asit (AA) ve enzim ekstratı ilave edilmiş ve AA oksidasyonu 290 nm'de ölçülmüştür.

Glutatiyon redüktaz (GR) enzim aktivitesi Cakmak ve Marschner (1992) ve Cakmak (1994)'a göre 340 nm'de ( $E=6.2 \text{ mM cm}^{-1}$ ) NADPH'in oksidasyonu esas alınarak ölçülmüştür. Buna göre, son hacmi 1 ml olan reaksiyon ortamına 0.1 mM EDTA içeren 50 mM'lık fosfor tamponu (pH 7.6), 0.1 ml 0.5 mM okside glutatiyon (GSSG), 0.1 ml 0.12 mM NADPH ve enzim ekstratı ilave edilmiştir ve NADPH oksidasyonu 340 nm' de ölçülmüştür.

Katalaz (CAT) aktivitesi, spektrofotometrede  $H_2O_2$ 'nin 240 nm'de ( $E=39.4 \text{ mM cm}^{-1}$ ) degradasyonu esas alınarak ölçülmüştür. Buna göre, son hacmi 1 ml olan reaksiyon ortamını, 0.1 mM EDTA içeren 50 mM'lık fosfor tamponu (pH 7.6), 0.1 ml 100 mM  $H_2O_2$  ve enzim ekstratı oluşturmaktadır (Cakmak ve Marschner, 1992; Cakmak, 1994).

### 3.2.9. İstatiksel Hesaplamalar

Bu araştırmada tanımlanmış gruplar arasında fark var mıdır hipotezi test edilmiştir. Bu amaçla  $\alpha = 0,05$  alınmıştır.

Kurulan hipotezde:

$H_0$  : Gruplar arasında fark yoktur.

$H_1$  : En az bir grup diğerlerinden farklıdır.

Bu hipotezler SPSS paket programı kullanılarak yapılmıştır. Analizler sonucunda  $H_0$  hipotezi reddedilmiştir. Çünkü gruplardan en az biri farklı bulunmuştur. Hangi grubun yada grupların farklı olduğunu belirlemek amacıyla One-Way ANOVA LSD testi uygulanmıştır. İstatistik analiz sonucunda çıkan  $P < 0.05$  ve  $P < 0.01$  önem dereceleri çizelge ve şekillerde farklı harf ve yıldız konularak belirtilmiştir.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Bulgular

Bu çalışmada, bir emers sucul makrofit olan *Nasturtium officinale* pH 7±1 de; 0, 25, 50, 100, 200, 250 ve 500 ppm Pb(CH<sub>3</sub>COOH)<sub>2</sub> derişimlerinde 14 gün süreyle yetiştirilmiş, bitkinin kök, gövde ve yapraklarında yapılan fizyolojik ve biyokimyasal parametrelerin analiz sonuçları aşağıda verilmiştir. Bitkinin kök kısımları sadece çeşme suyu ve ardından saf suyla yıkandığından dolayı yanlış değer vereceğinden enzim ve metal birikimi analizlerinde çalışılmamıştır. Deneyler sonucunda ortaya çıkan değerlerin istatistiksel analizleri yapılarak P<0.05'e göre önem dereceleri belirlenmiştir.

#### 4.1.1. *N. officinale* Gelişiminde Morfolojik Gözlemler

Pb'nin farklı derişimlerinde 14 gün bırakılan *N. officinale*'nin kök, gövde ve yapraklarındaki morfolojik gelişim periyodik olarak kaydedilmiştir. Pb'nin etkisindeki ilk günlerinde belirlenen bütün derişimlerde olumsuz bir gelişim görülmemesine rağmen yüksek Pb derişimlerinde (100-500 ppm Pb) 5. günden sonra metalin toksik etkileri görülmüştür. Kök gelişiminde zayıflık, dökülmeler ve ek köklerin gelişmemesi gibi belirtiler görülürken gövdedeki nod aralıkları kısalmış ve tepedeki yaprak ayalarında küçülme meydana gelmiştir. Aynı zamanda 3. ve 4. yapraklarda sararmalar ortaya çıkarken tepede bulunan küçük yapraklar donuk yeşil renkte olmuştur.

Bitkide görülen morfolojik gözlemler, kontrol bitkisi ve diğer Pb derişimlerdeki bitkilere göre yapılmıştır.

**Çizelge 4.1.** Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan *N. officinale*'de morfolojik gözlemler.

Derişim (ppm)	Bitki Gelişimi	Yeni yaprak oluşumu	Yaprak boyutları	Yaprak sararması	Kök gelişimi	Nod mesafeleri
Kontrol	+++	+++	+++	-	+++	+++
25	+++	+++	+++	-	+++	+++
50	+++	+++	+++	-	+++	+++
100	++	++	++	-	++	++
200	+	+	+	+	+	+
250	+	+	+	+	+	+
500	+	+	+	+	+	+

+++ : Normal ++ : Az + : Çok az - : Yok

#### 4.1.2. *N. officinale* Yapraklarında Fotosentetik Pigment Miktarı

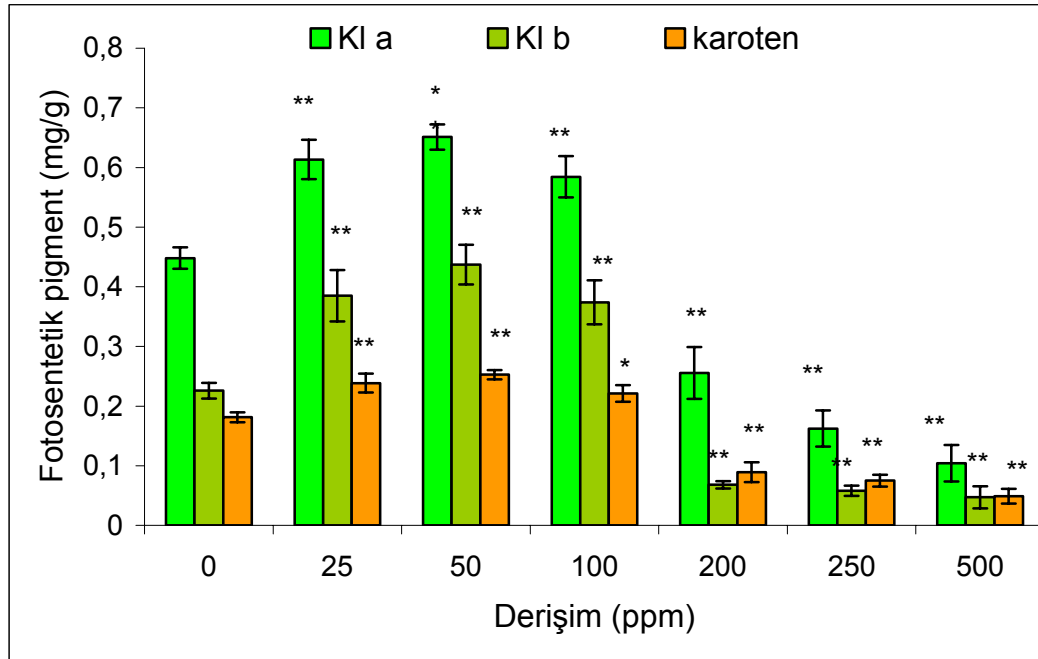
Pb'nin farklı derişimlerinin etkisine 14 gün bırakılan *N. officinale* yapraklarında fotosentetik pigment miktarı Çizelge 4.2 verilmiştir.

Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde *N. officinale* yapraklarında kl-a, kl-b ve karoten miktarlarında kontrole göre önemli derecede artma ve azalmalar bulunmuştur ( $P<0.05$ ). 25, 50 ve 100 ppm Pb derişimi etkisinde artmalar ve 200, 250 ve 500 ppm Pb derişimindeki azalmalar önemli görülmüştür. ( $P<0.01$ ). 200, 250 ve 500 ppm Pb derişimlerinin etkisindeki bitki yapraklarında önemli düzeyde azalmalar belirlenmiştir ( $P<0.01$ ).

**Çizelge 4.2.** Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan *N. officinale* yapraklarında fotosentetik pigment miktarı.

Derişim (ppm)	Fotosentetik pigment (mg/g T A)		
	Kl-a	Kl-b	Karoten
Kontrol	0.448±0.01 a	0.226±0.01a	0.181±0.008 a
25	0.613±0.03 b*	0.384±0.04 b*	0.238±0.01 b*
50	0.651±0.02 b*	0.437±0.03 b*	0.252±0.007 b*
100	0.584±0.03 b*	0.373±0.03 b*	0.221±0.01 b
200	0.255±0.04 c*	0.068±0.006 c*	0.089±0.01 c*
250	0.162±0.03 d*	0.058±0.008 c*	0.075±0.009 c*
500	0.104±0.03 d*	0.047±0.01 c*	0.049±0.01c*

Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harf ile gösterilen veriler arasında P < 0.05 ayırım vardır. \* P< 0.01 düzeyinde önemlidir.



**Şekil 4.1.** Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan *N. officinale* yapraklarında kl-a, kl-b ve karoten miktarı. Değerler aritmetik ortalama± standart hata olarak verilmiştir( n=4). \*P<0.05, \*\*P<0.01 düzeyinde önemlidir.

#### 4.1.3. *N. officinale* Kök, Gövde ve Yapraklarında Su İçeriği

Pb'nin farklı derişimlerinin etkisine 14 gün bırakılan *N. officinale* kök, gövde ve yaprağında su içeriği ve istatistiksel değerlendirmeleri Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde *N. officinale* köklerinde belirlenen su içeriği kontrole göre önemli derecede artma göstermiştir ( $P<0.05$ ). En fazla artma 25 ppm Pb derişiminin etkisinde görülmüştür ( $P<0.01$ ). Farklı derişimler arasında önemli derecede azalma bulunmuştur ( $P<0.05$ ). En fazla azalma 200, 250 ve 500 ppm Pb derişimlerinin etkisindeki *N. officinale* kökünde görülmüştür. ( $P<0.01$ ).

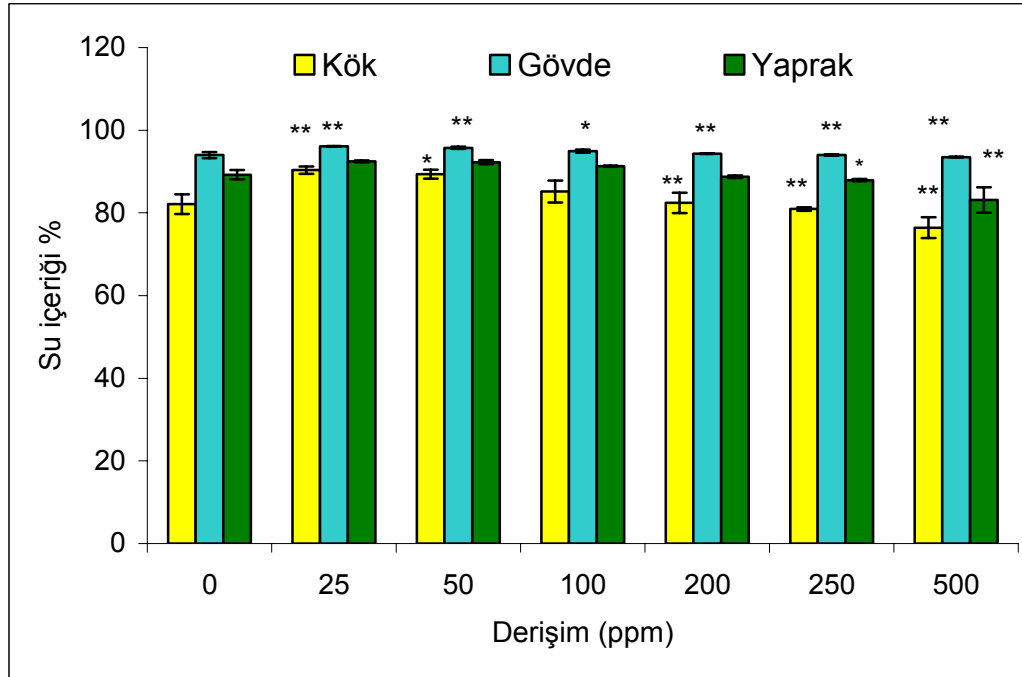
Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde *N. officinale* gövdesinde su içeriği kontrole göre 25 ve 50 ppm Pb derişiminde önemli düzeyde artma göstermiştir ( $P<0.01$ ). Farklı derişimin etkisindeki bitki gövdesinde belirlenen su içeriğinde 200, 250 ve 500 ppm Pb derişiminde önemli derecede azalma belirlenmiştir ( $P<0.01$ ).

Kontrole göre Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde *N. officinale* yaprağında belirlenen su içeriğinde önemli derecede azalma bulunmuştur. En fazla azalma 500 ppm Pb derişiminin etkisinde görülmüştür ( $P<0.01$ ). 250 ppm Pb derişimindeki azalma 25 ve 50 ppm Pb derişimindeki artışa göre önemli bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Diğer derişimlere göre en fazla azalma 500 ppm Pb etkisinde görülmüştür ( $P<0.01$ ).

**Çizelge 4.3.** Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan *N. officinale* kök, gövde ve yapraklarında su içeriği.

Derişim (ppm)	Su İçeriği (%)		
	Kök	Gövde	Yaprak
Kontrol	82.1±2.4 acde	93.9±0.73 acd	89.2±1.10 ab
25	90.3±0.87 bc*	96.1±0.09 b*	92.4±0.24 a
50	89.3±1.07 bc	95.7±0.27 bc*	92.2±0.46 a
100	85.1±2.64 cd	94.9±0.38 cd	91.2±0.14 ab
200	82.4±2.45 d*	94.3±0.10 de*	88.7±0.32 ab
250	80.9±0.41 de*	94±0.16 de*	87.9±0.29 b
500	76.4±2.49 e*	93.5±0.11 e*	83.1±3.10 c*

Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harf ile gösterilen veriler arasında  $P < 0.05$  ayırım vardır. \*  $P < 0.01$  düzeyinde önemlidir.



**Şekil 4.2.** Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan *N.officinale* kök, gövde ve yapraklarda su içeriği. Değerler aritmetik ortalama± standart hata olarak verilmiştir (n=4). \* P<0.05, \*\* P<0.01 düzeyinde önemlidir.

#### 4.1.4. Mineral Madde Derişimi

##### 4.1.4.1. *N. officinale* Gövde ve Yapraklarında Mn Miktarı

Kurşunun farklı derişimlerinin etkisine 14 gün bırakılan *N. officinale* gövde ve yaprağında Mn miktarı ve istatistiksel değerlendirmeleri Çizelge 4.4.'de verilmiştir.

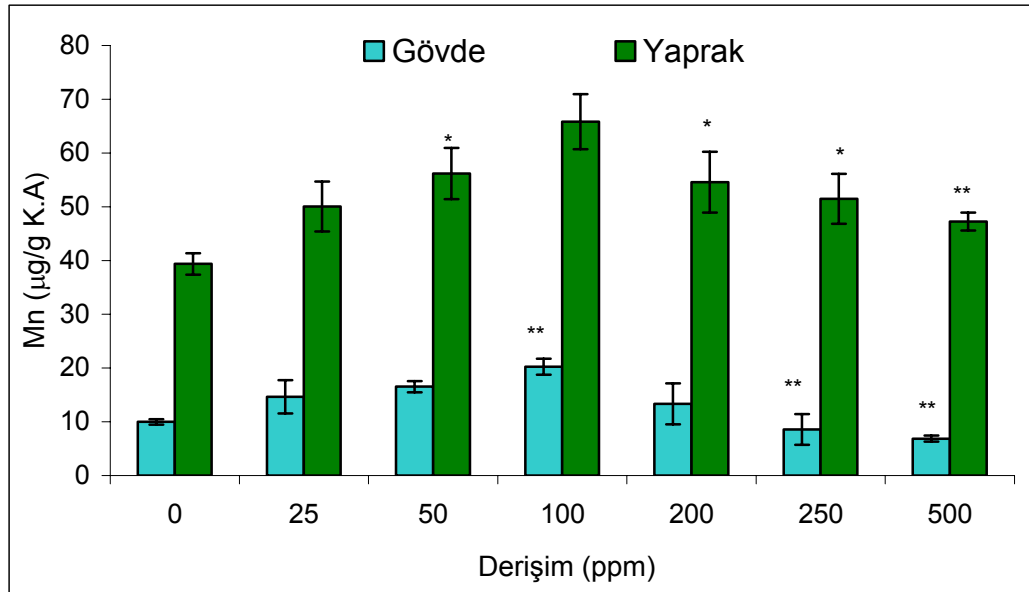
Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde *N. officinale* gövdesinde Mn miktarında kontrole göre önemli düzeyde artma bulunmuştur (P<0.05). En fazla artma 100 ppm Pb derişimi etkisinde olmuştur (P<0.01). 100 ppm Pb etkisinde bulunan artma ve 250 ile 500 ppm Pb etkisinde görülen azalmalar önemli bulunmuştur (P<0.01).

*N. officinale* yapraklarında kontrole göre farklı derişimlerde önemli düzeyde artma olmuştur (P<0.05). En fazla artış 100 ppm Pb derişimi etkisinde görülmüştür (P<0.01). Derişimler arasında 100 ppm Pb etkisinde artma önemli bulunurken (P<0.01), en fazla azalma 500 ppm Pb etkisinde görülmüştür (P<0.01).

**Çizelge. 4.4.** Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan *N. officinale* gövde ve yapraklarında Mn miktarı.

Derişim (ppm)	Mn ( $\mu\text{g/g K A}$ )	
	Gövde	Yaprak
Kontrol	9.98 $\pm$ 0.4 ac	39.38 $\pm$ 2 ae
25	14.66 $\pm$ 3 ab	50.05 $\pm$ 4.62 ade
50	16.53 $\pm$ 1 ab	56.19 $\pm$ 4.76 bcde
100	20.22 $\pm$ 1.4 b*	65.86 $\pm$ 6.1 cd*
200	13.33 $\pm$ 3.8 bc	54.59 $\pm$ 5.6 de
250	8.57 $\pm$ 2.8 c*	51.47 $\pm$ 4.6 e
500	6.85 $\pm$ 0.5 c*	47.24 $\pm$ 2.1 e*

Değerler aritmetik ortalama $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Farklı harfler ile gösterilen veriler arasında P<0.05 ayırım vardır, \*P<0.01 düzeyinde önemlidir.



**Şekil 4.3.** Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan *N. officinale* gövde ve yapraklarında Mn miktarı. Değerler aritmetik ortalama $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). \*P<0.05, \*\*P< düzeyinde önemlidir.

#### 4.1.4.2. *N. officinale* Gövde ve Yapraklarında Cu Miktarı

Pb'nin farklı derişimlerinin etkisine 14 gün bırakılan *N. officinale* gövde ve yapraklarında Cu miktarı Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

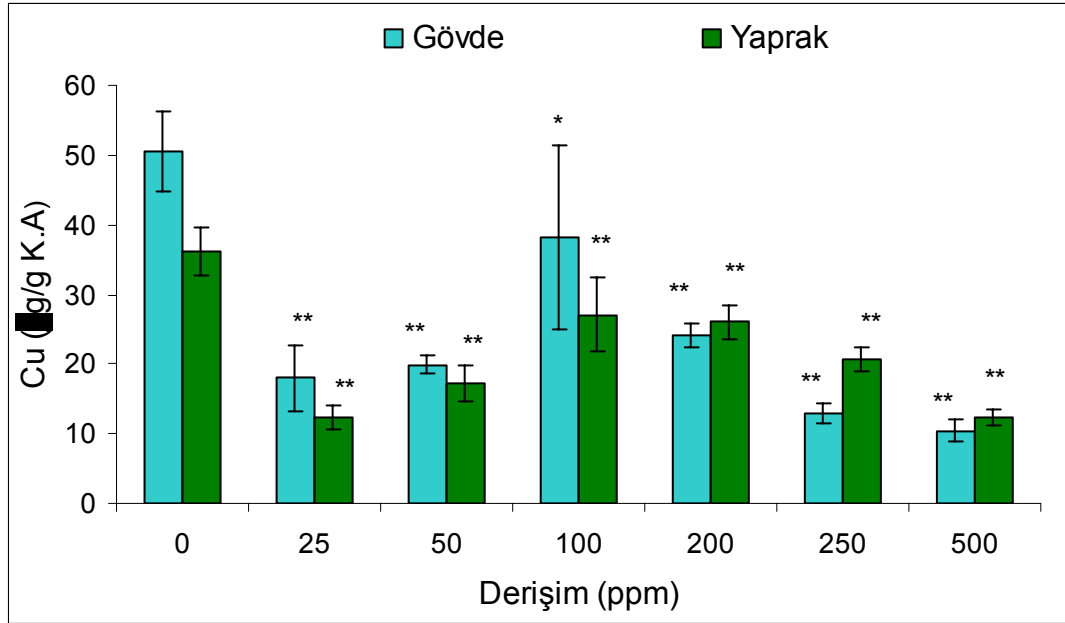
Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde *N. officinale* gövdesinde Cu miktarında kontrole göre önemli azalmalar bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Azalmalar 25, 50, 200, 250 ve 500 ppm Pb derişimlerinin etkisinde görülmüştür ( $P<0.01$ ). Derişimler arasında 250 ve 500 ppm Pb etkisinde *N.officinale* gövdesinde azalma önemli bulunmuştur ( $P<0.01$ ).

Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde *N.officinale* yaprağında kontrole göre Cu miktarında tüm derişimlerde önemli azalmalar belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). En önemli azalmalar 25, 50, 250 ve 500 ppm Pb derişimlerinin etkisinde görülmüştür ( $P<0.01$ ). Farklı derişimler arasında *N. officinale* yapraklarında en fazla Cu miktarı 100 ve 200 ppm Pb derişimlerinin etkisinde görülmüştür ( $P<0.01$ ).

**Çizelge 4.5.** Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan *N. officinale* gövde ve yapraklarında Cu miktarı.

Derişim (ppm)	Cu ( $\mu\text{g/g K A}$ )	
	Gövde	Yaprak
Kontrol	50.48 $\pm$ 5.6 ac	36.30 $\pm$ 3.4 a
25	18 $\pm$ 4.6 bde*	12.37 $\pm$ 1.8 bde*
50	19.93 $\pm$ 1.2 bde*	17.12 $\pm$ 2.5 bde*
100	38.16 $\pm$ 13.2 cd	27.11 $\pm$ 5.2 cd*
200	24.08 $\pm$ 1.6 cd*	26.04 $\pm$ 2.4 e*
250	12.79 $\pm$ 1.4 e*	20.60 $\pm$ 1.7 de*
500	10.45 $\pm$ 1.4 e*	12.22 $\pm$ 1.1 e*

Değerler aritmetik ortalama $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler arasında  $P<0.05$  ayırım vardır. \* $P<0.01$  düzeyinde önemlidir.



**Şekil 4.4.** Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan *N. officinale* gövde ve yapraklarında Cu miktarı. Değerler aritmetik ortalama± standart hata olarak verilmiştir (n=4). \*P<0.05, \*\*P<0.01 düzeyinde önemlidir.

#### 4.1.4.3. *N.officinale* Gövde ve Yapraklarında Fe Miktarı

Pb'nin farklı derişimlerinin etkisine 14 gün bırakılan *N. officinale* gövde ve yapraklarında belirlenen Fe miktarları ve istatistiksel değerlendirmeleri Çizelge 4.6'da verilmiştir.

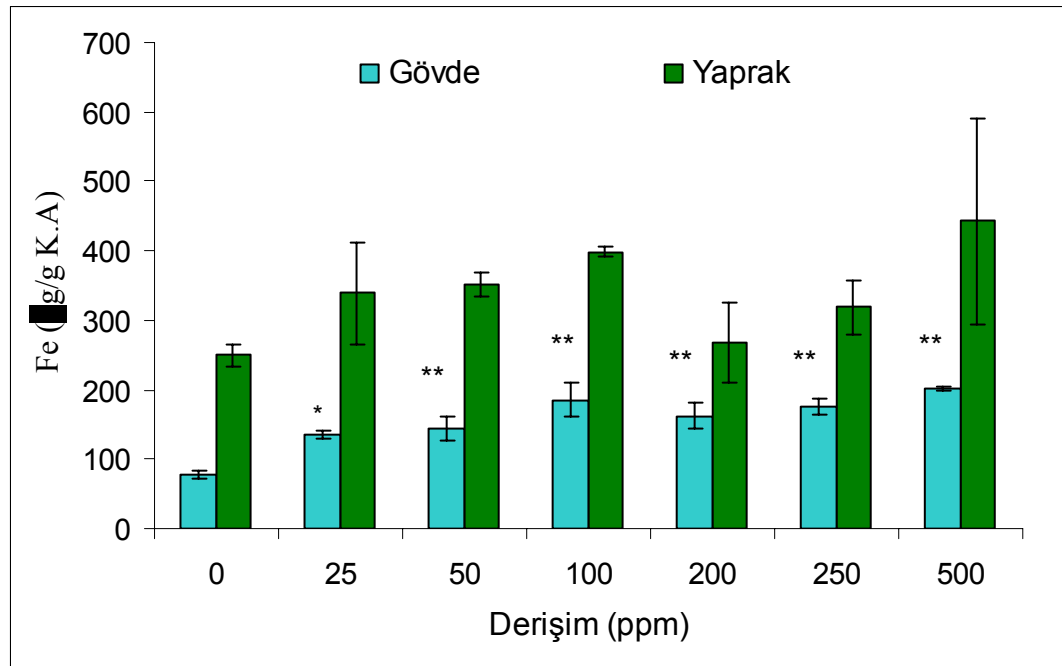
Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde *N. officinale* gövdesinde kontrole göre önemli derecede artma bulunmuştur (P<0.05). En fazla artma 25 ppm Pb dışındaki Pb derişimlerinin etkisinde belirlenmiştir (P<0.01). 100 ve 500 ppm Pb etkisindeki derişimlerde görülen artma diğer derişimlere göre önemlidir (P<0.05). Derişimler arasında en fazla artma 500 ppm Pb etkisinde görülmüştür (P<0.01).

*N. officinale* yapraklarında kontrole göre Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde görülen Fe miktarında görülen artma önemsiz bulunmuştur (P<0.05). Derişimler arasında fark yoktur (P<0.05).

**Çizelge 4.6.** Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan *N. officinale* gövde ve yapraklarında Fe miktarı.

Derişim (ppm)	Fe ( $\mu\text{g/g K A}$ )	
	Gövde	Yaprak
Kontrol	76.79 $\pm$ 5.98 a	250.48 $\pm$ 15.8 a
25	135.22 $\pm$ 5.90 bc	338.75 $\pm$ 74.0 a
50	144.57 $\pm$ 17.12 bc*	351.56 $\pm$ 17.5 a
100	185.15 $\pm$ 24.54 cd*	398.85 $\pm$ 6.5 a
200	162.50 $\pm$ 19.57 cd*	267.80 $\pm$ 58.4 a
250	175.95 $\pm$ 12.54 cd*	318.45 $\pm$ 39.1 a
500	201.55 $\pm$ 3.65 d*	442.50 $\pm$ 147.3 a

Değerler aritmetik ortalama $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler arasında P<0.05 ayırım vardır. \*P<0.01 düzeyinde önemlidir.



**Şekil 4.5.** Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan *N.officinale* gövde ve yapraklarında Fe miktarı. Değerler aritmetik ortalama $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=4). \* P<0.05, \*\*P<0.01 düzeyinde önemlidir.

#### 4.1.4.4. *N.officinale* Gövde ve Yapraklarında Ca Miktarı

Pb'nin farklı derişimlerinin etkisine 14 gün bırakılan *N. officinale* gövde ve yapraklarında belirlenen Ca miktarı ve istatistiksel değerlendirmeleri Çizelge 4.7.'de verilmiştir.

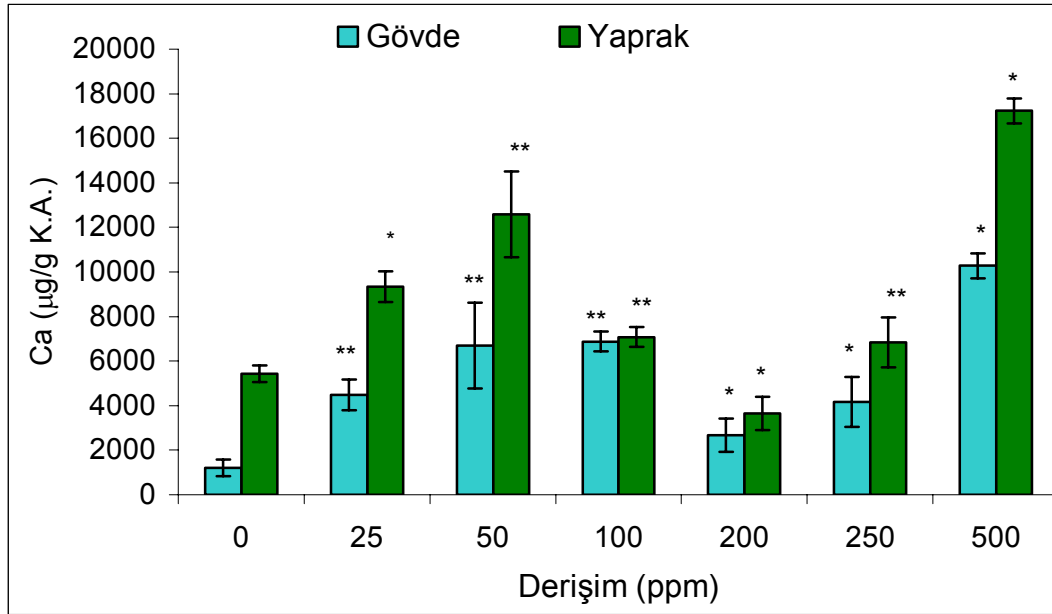
Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde *N. officinale* gövdesinde Ca miktarında kontrole göre önemli artma bulunmuştur ( $P<0.05$ ). 200 ppm Pb derişiminin etkisinin dışında diğer derişimlerin etkisinde görülen artma önemlidir ( $P<0.01$ ). 500 ppm Pb derişiminin etkisinde *N. officinale* gövdesinde bulunan artma diğer derişimlere göre çok önemlidir ( $P<0.01$ ).

*N. officinale* yapraklarında Pb'nin farklı derişimlerindeki Ca miktarında kontrole göre önemli derecede artma bulunmuştur ( $P<0.05$ ). En fazla artma 50 ve 500 ppm Pb derişimlerinin etkisinde görülmüştür ( $P<0.01$ ). Farklı Pb derişimleri arasında en fazla artma 500 ppm Pb derişiminin etkisinde görülmüştür ( $P<0.01$ ).

**Çizelge 4.7.** Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan *N. officinale* gövde ve yapraklarında Ca miktarı.

Derişim (ppm)	Ca ( $\mu\text{g/g K. A}$ )	
	Gövde	Yaprak
Kontrol	1210 $\pm$ 259 ad	5423 $\pm$ 371 adef
25	4470 $\pm$ 278 bde*	9332 $\pm$ 690 bdf
50	6686 $\pm$ 486 c*	12583 $\pm$ 1921 c*
100	6869 $\pm$ 987 c*	7076 $\pm$ 445 df*
200	2679 $\pm$ 442 de*	3661 $\pm$ 748 e*
250	4170 $\pm$ 1017 e*	6833 $\pm$ 1113 f*
500	10283 $\pm$ 838 f*	17235 $\pm$ 558 g*

Değerler aritmetik ortalama $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler arasında  $P<0.05$  ayırım vardır. \* $P<0.01$  düzeyinde önemlidir.



Şekil 4.6. Pb'nin farklı derişimlerinin etkisine 14 gün bırakılan *N.officinale* gövde ve yapraklarında Ca miktarı. Değerler aritmetik ortalama± standart hata olarak verilmiştir (n=4). \*P<0.05, \*\*P<0.01 düzeyinde önemlidir.

#### 4.1.4.5. *N.officinale* Gövde ve Yapraklarında Mg Miktarı

Pb'nin farklı derişimlerinin etkisine 14 gün bırakılan *N. officinale* gövde ve yapraklarında Mg miktarı ve istatistiksel değerlendirmeleri Çizelge 4.8.'de verilmiştir.

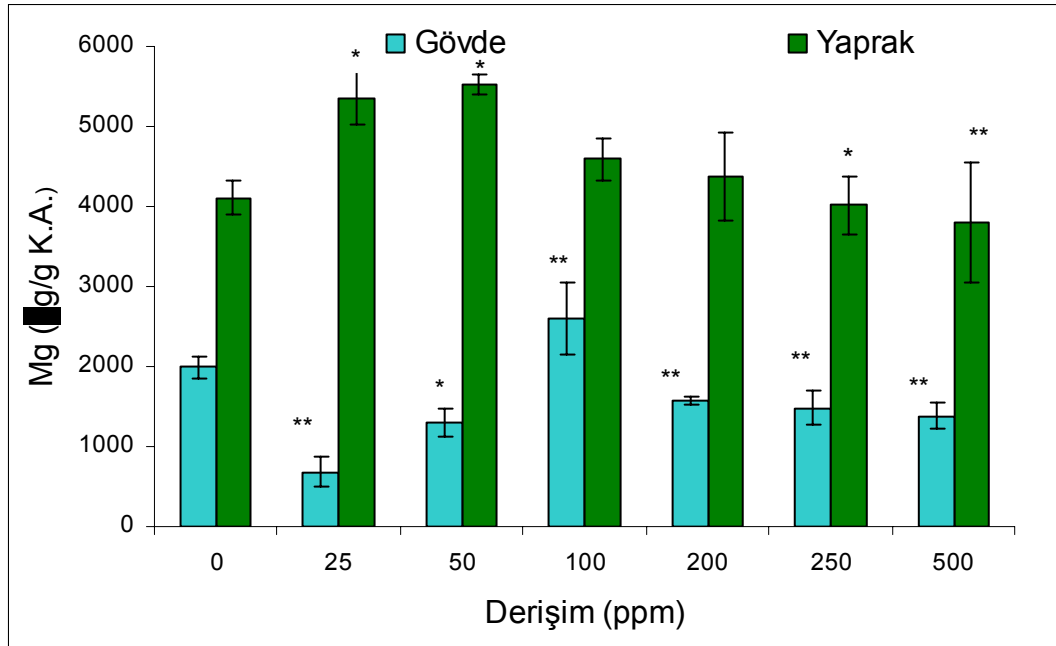
Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde *N officinale* gövdesinde Mg miktarında önemli azalma bulunmuştur (P<0.05). En fazla azalma 25 ppm Pb derişiminin etkisinde belirlenmiştir (P<0.01). 100, 200, 250 ve 500 ppm Pb derişimi etkisinde bulunan artma önemlidir (P<0.01).

*N. officinale* yapraklarında belirlenen Mg miktarındaki kontrole göre 25 ve 50 ppm Pb derişimi etkisinde artma belirlenmiştir (P<0.05). Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde *N. officinale* yapraklarında Mg miktarında önemli azalmalar bulunmuştur (P<0.05). En fazla azalma 500 ppm Pb derişiminin etkisinde görülmüştür (P<0.01).

**Çizelge 4.8.** Pb'nin farklı derişimlerinin etkisine 14 gün bırakılan *N. officinale* gövde ve yapraklarında Mg miktarı

Derişim (ppm)	Mg ( $\mu\text{g/g K A}$ )	
	Gövde	Yaprak
Kontrol	1995 $\pm$ 137 acd	4108 $\pm$ 217 ac
25	687 $\pm$ 187 b*	5359 $\pm$ 340 b
50	1300 $\pm$ 176 bd	5525 $\pm$ 119 b
100	2606 $\pm$ 448 c*	4588 $\pm$ 260 bc
200	1581 $\pm$ 47 d*	4375 $\pm$ 544 bc
250	1480 $\pm$ 210 d*	4015 $\pm$ 353 c
500	1382 $\pm$ 161 d*	3806 $\pm$ 756 c*

Değerler ortalama $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler arasında P<0.05 ayırım vardır. \*P<0.01 düzeyinde önemlidir.



**Şekil 4.7.** Farklı Pb derişimlerinin etkisine 14 gün bırakılan *N. officinale* gövde ve yapraklarında Mg miktarı. Değerler aritmetik ortalama $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=4). \*P<0.05, \*\*P<0.01 düzeyinde önemlidir.

#### 4.1.4.6. *N. officinale* Gövde ve Yapraklarında Zn Miktarı

Pb'nin farklı derişimlerinin etkisine 14 gün ile bırakılan *N. officinale* gövde ve yapraklarında Zn miktarı ve istatistiksel değerlendirmeleri Çizelge 4.9'da verilmiştir.

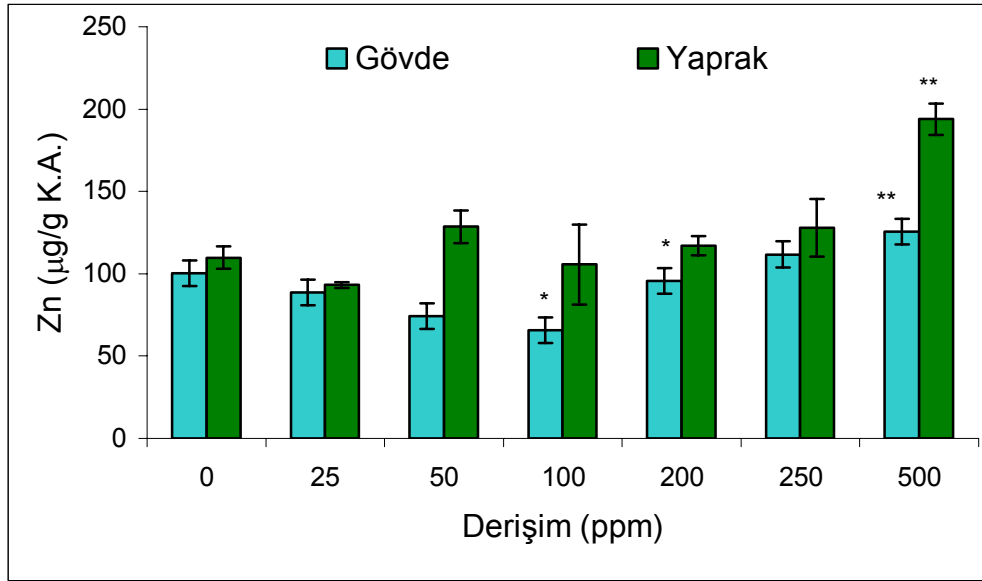
14 gün Pb'nin farklı derişimlerinin etkisine bırakılan *N. officinale* gövdesinde Zn miktarında kontrole göre istatistiksel olarak önemli olmayan azalma ve artmalar bulunmuştur ( $P<0.05$ ). 100 ppm Pb derişiminin etkisinde görülen Zn miktarındaki azalma diğer derişimlere göre önemli bulunmuştur ( $P<0.05$ ). *N. officinale* yapraklarında Zn miktarında en fazla artma 500 ppm Pb derişimi etkisinde belirlenmiştir ( $P<0.01$ ).

Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde *N. officinale* yapraklarında belirlenen Zn miktarı kontrole göre 500 ppm Pb derişimin etkisinde önemli derecede artma göstermiştir ( $P<0.01$ ). 500 ppm Pb derişiminin etkisinde görülen artma diğer derişimlere göre önemlidir ( $P<0.01$ ).

**Çizelge 4.9.** Farklı Pb derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan *N. officinale* gövde ve yapraklarında Zn miktarı.

Derişim (ppm)	Zn ( $\mu\text{g/g K A}$ )	
	Gövde	Yaprak
Kontrol	100.33 $\pm$ 7.82 abc	109.79 $\pm$ 6.69 a
25	88.75 $\pm$ 13.90 abc	93.12 $\pm$ 1.87 a
50	74.32 $\pm$ 1.93 ab	128.50 $\pm$ 9.98 a
100	65.59 $\pm$ 26.34 a	105.58 $\pm$ 24.37 a
200	95.62 $\pm$ 13.16 ac	117.00 $\pm$ 5.81 a
250	111.75 $\pm$ 15.07 bc	127.93 $\pm$ 17.50 a
500	125.64 $\pm$ 3.07 c*	193.82 $\pm$ 9.70 b*

Değerler aritmetik ortalama $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler arasında  $P<0.05$  ayırım vardır. \* $P<0.01$  düzeyinde önemlidir.



Şekil 4.8. Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan *N. officinale* gövde ve yapraklarında Zn miktarı. Değerler aritmetik ortalama± standart hata olarak verilmiştir (n=4). \*P<0.05, \*\*P<0.01 düzeyinde önemlidir.

#### 4.1.4.7. *N. officinale* Gövde ve Yapraklarında Pb Miktarı

Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan *N. officinale* gövde ve yapraklarında Pb miktarı Çizelge 4.10'da verilmiştir.

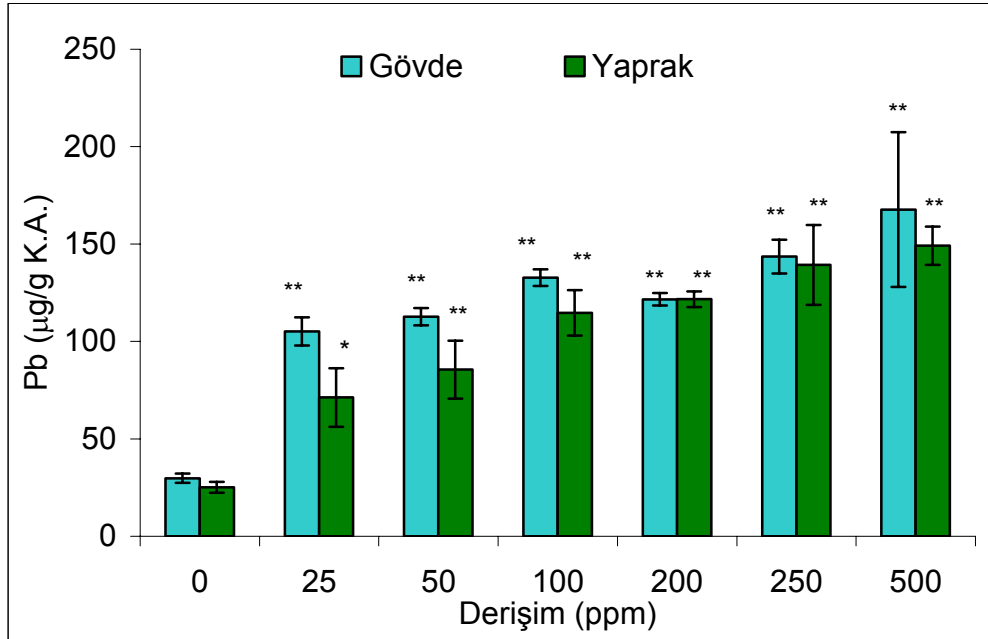
Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde *N. officinale* gövdelerinde Pb miktarında kontrole göre önemli derecede artma bulunmuştur (P<0.01). Derişimler arasında en fazla artma 500 ppm Pb derişiminin etkisinde görülmüştür (P<0.01).

*N. officinale* yapraklarında Pb miktarında kontrole göre artma bulunmuştur. 25 ppm Pb derişiminin etkisinde belirlenen artma P<0.05 düzeyinde önemli bulunurken diğer derişimlerin etkisinde belirlenen artımlar daha fazla önemlidir (P<0.01). Pb'nin farklı derişimleri etkisinde *N. officinale* yapraklarında en fazla artma diğer derişimlere göre 500 ppm Pb derişimi etkisinde belirlenmiştir (P<0.01).

**Çizelge 4.10.** Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan *N. officinale* gövde ve yapraklarında Pb miktarı.

Derişim (ppm)	Pb ( $\mu\text{g/g K A}$ )	
	Gövde	Yaprak
Kontrol	29.78 $\pm$ 2.38 a	25.13 $\pm$ 2.80 a
25	105.11 $\pm$ 7.17 b*	71.21 $\pm$ 15.02 b
50	112.64 $\pm$ 4.39 b*	85.50 $\pm$ 14.90 bc*
100	132.73 $\pm$ 4.27 bc*	114.61 $\pm$ 11.66 cd*
200	121.59 $\pm$ 3.23 bc*	121.66 $\pm$ 3.97 cd*
250	143.57 $\pm$ 8.72 bc*	139.24 $\pm$ 20.51d*
500	167.74 $\pm$ 39.75 c*	149.13 $\pm$ 9.90 d*

Değerler aritmetik ortalama $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler arasında P<0.05 ayırım vardır. \*P<0.01 düzeyinde önemlidir.



**Şekil 4.9.** Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan *N. officinale* gövde ve yapraklarında Pb miktarı. Değerler aritmetik ortalama $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=4). \*P<0.05, \*\*P<0.01 düzeyinde önemlidir.

#### 4.1.5. *N.officinale*'nin Yapraklarında Lipit Peroksidasyonu

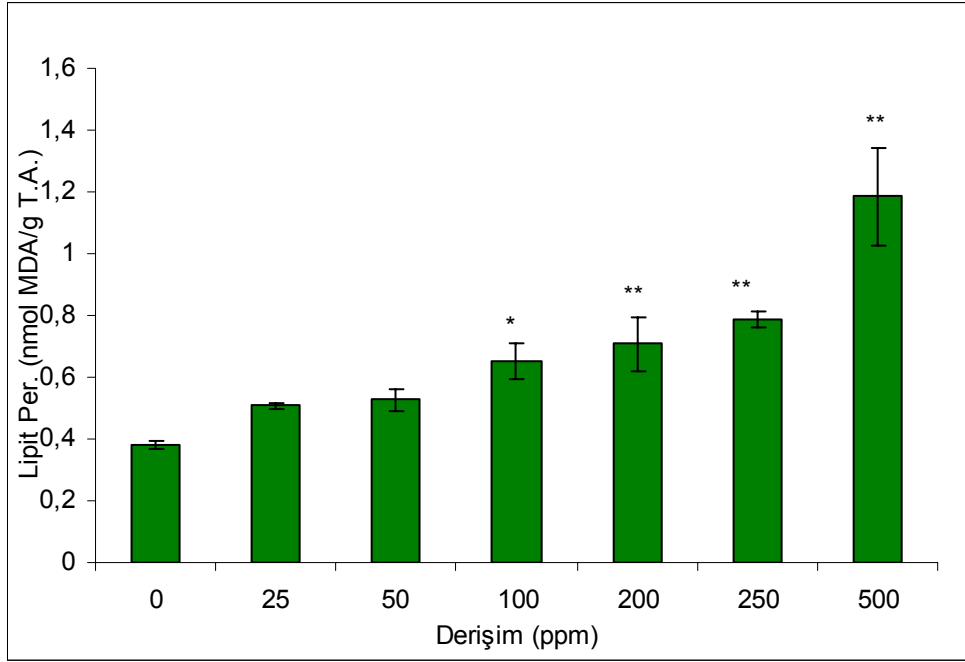
Pb'nin farklı derişimlerinin etkisine 14 gün bırakılan *N. officinale* yapraklarında belirlenen lipit peroksidasyonu ve istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 4.11'de verilmiştir.

*N.officinale* yapraklarında belirlenen lipit peroksidasyonu miktarında kontrole göre 200, 250 ve 500 ppm Pb etkisindeki derişimlerde önemli artma bulunmuştur ( $P<0.01$ ). Farklı Pb derişimleri arasınd en fazla artma 500 ppm Pb derişiminin etkisinde görülmüştür ( $P<0.01$ ). Lipit peroksidasyonu kök ve gövdede belirlenmemiştir.

**Çizelge 4.11.** Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan *N. officinale* yapraklarında Lipit Peroksidasyonu.

Derişim (ppm)	Lipit Peroksidasyonu (nmol MDA/g T.A.)
Kontrol	0.38±0.01 a
25	0.50±0.01 ab
50	0.52±0.03 ab
100	0.64±0.05 bc
200	0.70±0.08 bc*
250	0.78±0.02 c*
500	1.18±0.06 d*

Değerler aritmetik ortalama± standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler arasında  $P<0.05$  ayırım vardır. \* $P<0.01$  düzeyinde önemlidir.



**Şekil 4.10.** Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan *N. officinale* yapraklarında lipit peroksidasyonu. Değerler aritmetik ortalama± standart hata olarak verilmiştir (n=4). \*P<0.05, \*\*P<0.01 düzeyinde önemlidir.

#### 4.1.6. Antioksidant Enzim Aktivitesi Değişimleri

##### 4.1.6.1. *N. officinale* Gövde ve Yapraklarında SOD Aktivitesi Değişimleri

Kurşunun farklı derişimlerinin etkisine 14 gün bırakılan *N. officinale* gövde ve yapraklarında SOD aktivitesi ve istatistiksel değerlendirmeleri Çizelge 4.12'de verilmiştir.

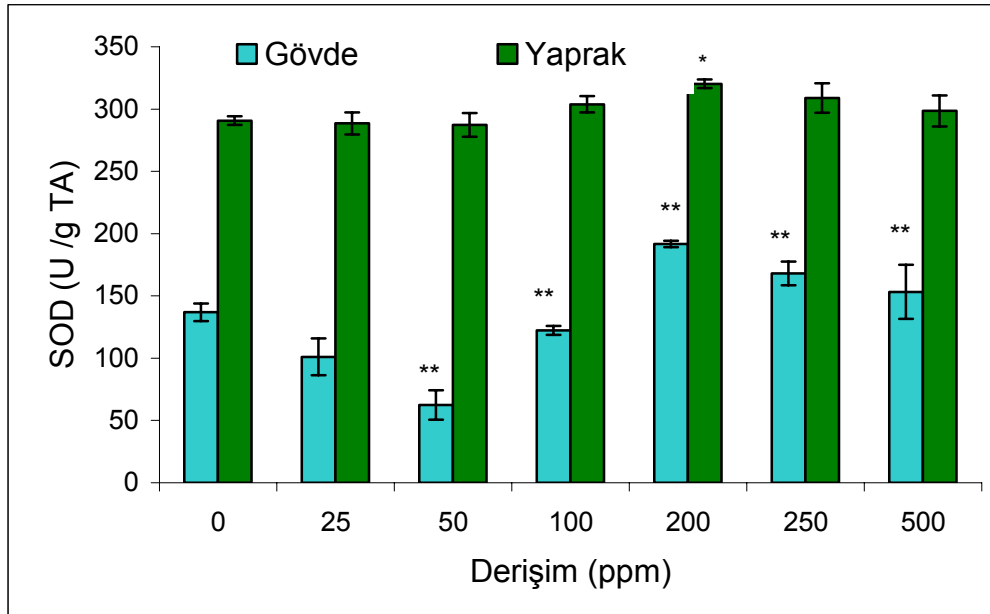
Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde *N. officinale* gövdesinde belirlenen SOD aktivitesinde kontrole göre önemli düzeyde azalma ve artma bulunmuştur (P<0.05). En fazla azalma 50 ppm Pb derişiminin etkisinde, en fazla artma 200 ppm Pb etkisinde saptanmıştır (P<0.01). *N. officinale* yapraklarında en fazla artma 200 ve 250 ppm Pb derişimlerinin etkisinde bulunmuştur (P<0.01).

Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan *N. officinale* yapraklarında SOD aktivitesinde kontrole göre önemli derecede artma bulunmuştur (P<0.05). 200 ppm Pb derişiminin etkisinde belirlenen artma diğer derişimlere göre önemlidir (P<0.05).

**Çizelge 4.12.** Farklı Pb derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan *N. officinale* gövde ve yapraklarında SOD aktivitesi değişimleri.

Derişim (ppm)	SOD (U/g T A)	
	Gövde	Yaprak
Kontrol	136.86±7.0 acef	290.73±3.3 ab
25	101.02±14.7 ac	288.47±8.9 ab
50	62.40±11.7 b*	287.22±9.4 ab
100	122.32±3.7 cf*	303.80±6.5 ab
200	191.70±2.4 de*	320.21±3.4 b
250	168.10±9.4 ef*	308.88±11.9 b
500	153.20±21.6 f*	298.53±12.47 b

Değerler aritmetik ortalama± standart hata olarak verilmiştir (n=3). Farklı harfler ile gösterilen veriler arasında P<0.05 ayırım vardır. \*P<0.01 düzeyinde önemlidir.



**Şekil 4.11.** Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan *N. officinale* gövde ve yapraklarında SOD aktivitesi değişimleri. Değerler aritmetik ortalama± standart hata olarak verilmiştir ( n=3).\*P<0.05, \*\*P<0.01 düzeyinde önemlidir.

#### 4.1.6.2. *N. officinale* Gövde ve Yapraklarında GR Aktivitesi Değişimleri

Kurşunun farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan *N. officinale* gövde ve yapraklarında GR aktivitesi ve istatistiksel değerlendirmeleri Çizelge 4.13.'de verilmiştir.

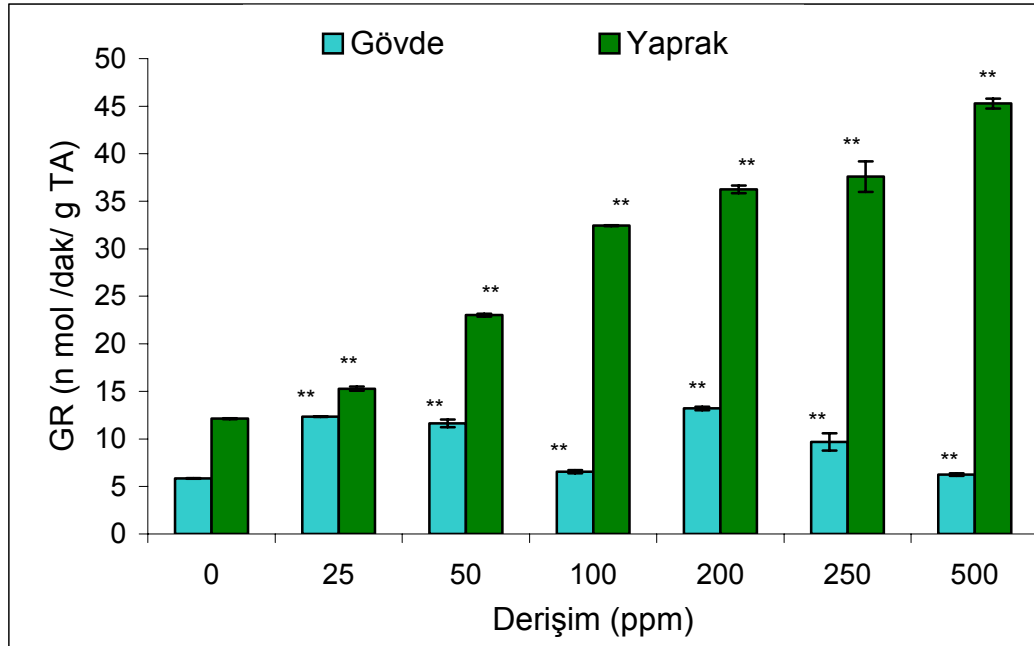
Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde *N. officinale* gövdesinde GR aktivitesinde kontrole göre önemli artma bulunmuştur ( $P<0.05$ ). En fazla artma 25, 50 ve 200 ppm Pb derişimlerinin etkisinde görülmüştür ( $P<0.01$ ). 25, 50 ve 200 ppm Pb derişiminin etkisinde belirlenen artmalar önemlidir ( $P<0.01$ ). 100 ve 500 ppm Pb derişiminin etkisinde diğer derişimlere göre önemli derecede azalma bulunmuştur ( $P<0.01$ ).

Kontrole göre Pb'nin farklı derişimlerinin etkisindeki *N. officinale* yapraklarında GR aktivitesi tüm derişimlerde önemli bulunmuştur ( $P<0.01$ ). Farklı derişimlerin etkisindeki *N. officinale* yapraklarında 200 ve 250 ppm Pb derişimi etkisinde görülen artma birbirlerine göre önemsiz iken diğer derişimlere göre önemli görülmüştür ( $P<0.01$ ).

**Çizelge 4.13.** Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan *N. officinale* gövde ve yapraklarında GR aktivitesi değişimleri

Derişim (ppm)	GR (n mol/dak/g T A)	
	Gövde	Yaprak
Kontrol	5.85±0.04 af	12.13±0.04 a
25	12.35±0.03 bd*	15.28±0.22 b*
50	11.64±0.4 b*	23.01±0.14 c*
100	6.55±0.15 cf*	32.44±0.05 d*
200	13.19±0.17 d*	36.23±0.4 e*
250	9.69±0.9 e*	37.60±1.6 e*
500	6.25±0.13 f*	45.28±0.5 f*

Değerler aritmetik ortalama± standart hata olarak verilmiştir (n=3). Farklı harfler ile gösterilen veriler arasında  $P<0.05$  ayırım vardır. \* $P<0.01$  düzeyinde önemlidir.



**Şekil 4.12.** Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan *N. officinale* gövde ve yapraklarında GR aktivitesi değişimleri. Değerler aritmetik ortalama± standart hata olarak verilmiştir( n=3). \*P<0.05, \*\*P<0.01 düzeyinde önemlidir.

#### 4.1.6.3. *N. officinale* Gövdesinde CAT Aktivitesi Değişimleri

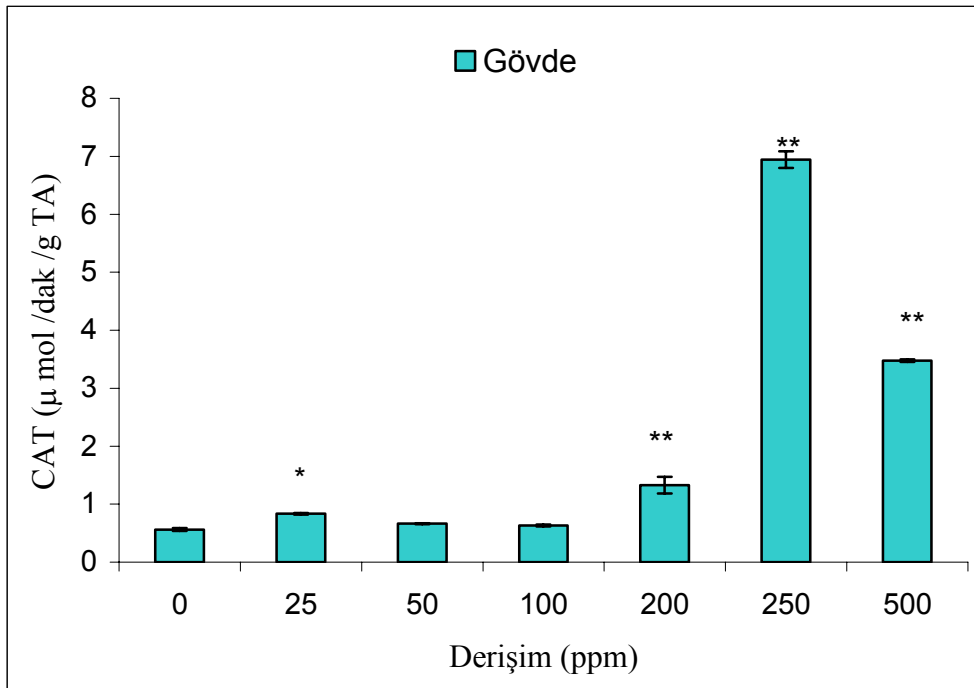
Kurşunun farklı derişimlerinin 14 gün bırakılan *N. officinale* gövdesinde CAT aktivitesi değişimleri ve istatistiksel değerlendirmeleri Çizelge 4.14'de verilmiştir.

Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde *N. officinale* gövdesinde CAT değişiminde kontrole göre önemli derecede artma bulunmuştur (P<0.05). En fazla artma 200, 250 ve 500 ppm Pb derişimlerinin etkisinde görülmüştür (P<0.01). 200, 250 ve 500 ppm Pb derişimlerinin etkisinde belirlenen artma diğer derişimlerin etkisine göre önemli görülmüştür (P<0.01).

**Çizelge 4.14.** Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan *N. officinale* gövdesinde CAT aktivitesi değişimleri.

Derişim (ppm)	CAT ( $\mu\text{M}/\text{dak}/\text{g T. A.}$ ) Gövde
Kontrol	0.56 $\pm$ 0.02 ab
25	0.83 $\pm$ 0.01 b
50	0.66 $\pm$ 0.01 b
100	0.63 $\pm$ 0.01 b
200	1.32 $\pm$ 0.1 c*
250	6.94 $\pm$ 0.1 d*
500	3.47 $\pm$ 0.02 e*

Değerler aritmetik ortalama $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=3). Farklı harfler ile gösterilen veriler arasında P<0.05 ayırım vardır. \*P<0.01 düzeyinde önemlidir



**Şekil 4.13.** Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan *N. officinale* gövdesinde belirlenen CAT aktivitesi değişimleri. Değerler aritmetik ortalama $\pm$  standart hata olarak verilmiştir ( n=3). \*P<0.05, \*\*P<0.01 düzeyinde önemlidir.

#### 4.1.6.4. *N. officinale* Gövdesinde AP Aktivitesi Değişimleri

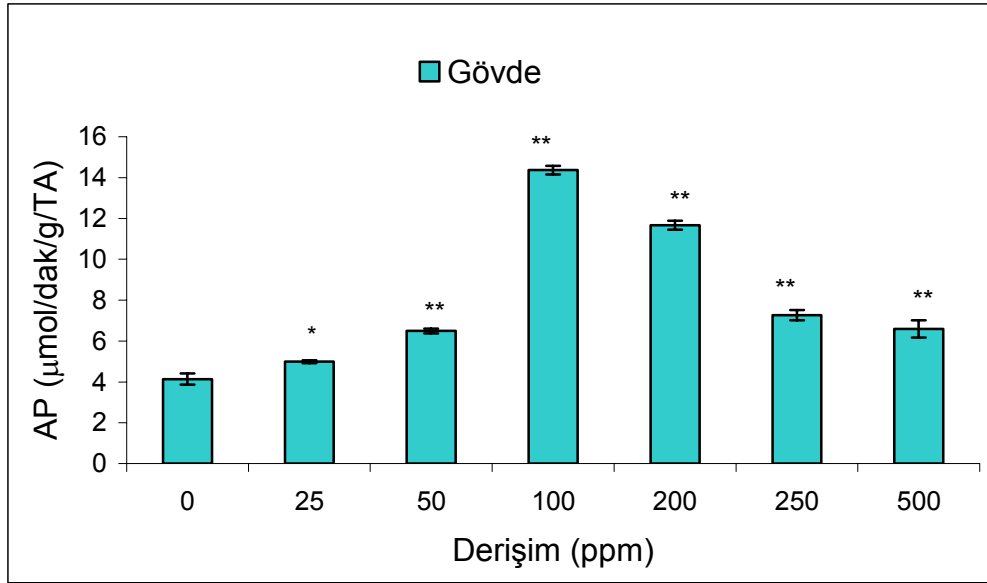
Kurşunun farklı derişimlerinin etkisine 14 gün bırakılan *N. officinale* gövdesinde AP aktivitesi Çizelge 4.15’de verilmiştir.

Pb’nin farklı derişimlerinin etkisinde *N. officinale* gövdesinde AP aktivitesinde kontrole göre önemli düzeyde artma bulunmuştur ( $P<0.05$ ). 25 ppm Pb derişimi dışındaki derişimlerde belirlenen artma önemlidir ( $P<0.01$ ). En fazla artma 100 ve 200 ppm Pb derişimi etkisinde görülmüştür ( $P<0.01$ ).

**Çizelge 4.15.** Pb’nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan *N. officinale* gövdesinde AP aktivitesi derişimleri.

AP	
Derişim	( $\mu\text{mol/dak/g T.A.}$ )
Kontrol	4.14 $\pm$ 0.27 a
25	4.99 $\pm$ 0.11 b
50	6.49 $\pm$ 0.20 cg*
100	14.36 $\pm$ 0.25 d*
200	11.66 $\pm$ 0.40 e*
250	7.26 $\pm$ 0.20 f*
500	6.59 $\pm$ 0.15 g*

Değerler aritmetik ortalama $\pm$  standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler arasında  $P<0.05$  ayırım vardır. \* $P<0.01$  düzeyinde önemlidir.



**Şekil 4.14.** Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde 14 gün bırakılan *N. officinale* gövdesinde AP aktivitesi değişimleri. Değerler aritmetik ortalama± standart hata olarak verilmiştir (n=4). \*P<0.05, \*\* P<0.01 düzeyinde önemlidir.

## 4.2. Tartışma

Biyosferin toksik metallerle kirlenmesi sanayi devriminin başlamasından itibaren çarpıcı bir şekilde hızlanmıştır (Settle ve Patterson, 1980). Bu kirlenmenin esas nedenleri; fosil yakıtların yanması, madencilik ve metal cevherlerinin tasfiyesi, zehirli atıklar, kimyasal gübreler, pestisitler ve kanalizasyonlardır (Kabata ve ark., 1989).

Ağır metaller bitkiler için gerekli olan besin maddeleridir. Bu metaller yüksek derişimlerde alındığında fito-toksik etki gösterirler. Bununla beraber Cd, Cr, Hg ve Pb gibi ağır metaller de çeşitli yollardan tarımsal ekosisteme girerler. Bunların bitkide bulunmaları ortamdaki bulunma yoğunluklarına bağlıdır (Bergmann, 1992).

Çevreyi kirleten başlıca kaynaklarından biriside kurşundur. Önceki çalışmalar kurşunun azot asimilasyonu, fotosentez, solunum, su alımı ve hücre bölünmesi gibi metabolik işleyişleri olumsuz etkilediğini göstermiştir (Burzynski, 1988). Bu çalışmada *N. officinale*'de yetiştirme ortamına verilen kurşunun farklı derişimlerinin

14 gün etkisinde bırakılmasıyla kurşun derişimlerine bağlı olarak bitkinin gelişimini nasıl etkilediği fotosentetik pigment konsantrasyonu, su içeriği, bitkinin kök, gövde ve yaprak kısımlarının mineral madde miktarları ve bitkiye verilen kurşunun bitki organlarında birikim miktarları, lipit peroksidasyonu, antioksidant ve antioksidant enzimlerle araştırılmıştır.

#### *Morfolojik Gözlemler*

Bitkilere kurşun bulaşması genellikle dış kaynaklıdır. Kurşun tozları yaprakların stomalarını kapatmadıkça bitki büyümesi ve gelişimi çok fazla etkilenmemektedir. (Brewer,1966). Bir ağır metal olan kurşun bitkideki bütün fizyolojik ve biyokimyasal olaylarda değişikliklere neden olmaktadır. Yaptığımız çalışmada *N. officinale*'de kurşun toksisitesinin ilk belirtileri kök büyümesinin engellenmesinde görülmüştür. Düşük derişimlerde bulunan bitki köklerinde önemli bir morfolojik bozulma görülmezken 100 ppm Pb ve diğer yüksek derişimli bitki köklerinde büyüme azalmıştır. Kök büyümesindeki bu azalma ya kök meristemindeki hücrelerin uzamasının (Wierzbicka, 1988) yada hücre bölünmesinin zarar görmesi sonucu olmaktadır (Przymusinski ve ark., 1991). Çalışmamızda 14 gün Pb'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakılan *N. officinale*'nin kök morfolojisinde bazı anormallikler meydana gelmiştir. Genellikle kontrol bitkisine göre 100 ppm ve daha yüksek Pb derişimine sahip ortamlardaki kökler daha kısa ve daha kalın oldukları ve yan köklerin oluşmadığı görülmüştür. Benzer semptomlar soğan köklerinde (Woodbury ve ark.,1971) ve *Lupinus luteus* köklerinde de görüldüğü rapor edilmiştir (Rucinska ve ark.,1999). Bizim çalışmamızda 100 ppm Pb'yi izleyen yüksek derişimli ortamlarda bitki gelişimi olumsuz etkilenmiştir. 200, 250 ve 500 ppm Pb derişimlerinde yeni yaprak oluşumu çok azalmış ve yeni çıkan yaprakların ayalarının boyutları küçülmüş, 3. ve 4. yapraklarda sararmalar ortaya çıkmış, nodlar arası mesafe kısalmıştır. Sonuç olarak bitki ölmemiş fakat normal morfolojik gelişimi önemli ölçüde gerilemiştir (Çizelge 4.1.).

#### *Fotosentetik Pigment Konsantrasyonu*

Ağır metaller fotosentetik pigment derişimini ve dolayısıyla fotosentez oranını da etkilemektedirler. Cd<sup>2+</sup> ve Pb<sup>2+</sup> nin fotosentez üzerine etkileri ayrıntılı şekilde çalışılmış ve kadmiyum ve kurşunun farklı şekillerde zarar verdiği

bulunmuştur. Fotosentez oranının azalmasına, kloroplastların ultrayapısının bozulması, klorofil, plastokinon ve karotenoit sentezinin sınırlandırılması, Calvin döngüsünün enzim aktivitelerinin inhibe edilmesi ve stomaların kapanmasından dolayı meydana gelen CO<sub>2</sub> eksikliği neden olmaktadır (Seregin ve Ivanov, 2001). Düşük klorofil içeriği tipik Pb<sup>2+</sup> etkisidir. Özellikle klorofil *b*, klorofil *a*'dan daha fazla etkilenir (Vodnik ve ark.,1999; Kacabova ve Nart, 1986). Bunun nedeni klorofil sentezleyen enzimlerin inhibe edilmesinden ve Mg ve Fe eksikliğindedir (Prasad ve Prasad,1987). Yaptığımız çalışmada fotosentetik pigment miktarı düşük kurşun derişimlerinde kontrol grubuna göre yüksek bulunur iken 100 ppm Pb derişiminden sonraki ortamlardaki azalma tesbit edilmiştir (Şekil 4.2). Klorofil *b*, klorofil *a*'dan daha fazla etkilenmiştir (Şekil 4.2) ve yaprakta 250 ve 500 ppm Pb derişiminin etkisinde Mg ve 200 ppm Pb derişiminin etkisinde de Fe miktarında azalma belirlenmiş ve bu azalma klorofil miktarına yansımıştır. (Şekil 4.8). Pb derişimin artan Pb derişimlerine bağılı olarak bitkinin metal (Mg ve Fe) içerikleri ve buna bağılı olarak kl-a ve kl-b miktarları azalmaktadır. Yapraklardaki Pb derişimi ile kl-a arasındaki korelasyon katsayısı  $r = -0.57$  dir. Kl-a ile Pb arasında yapılan korelasyonda negatif bir ilişki bulunmuştur. Pb derişimi arttıkça kl-a azalmaktadır. N= 28 durumunda P 0.01' de ilişki önemli bulunmuştur. Kl-b için korelasyon katsayısı  $r = -0.45$  tir. Kl-b ile Pb arasında negatif bir ilişki vardır. Pb arttıkça kl-b azalmaktadır. Bu ilişki de P 0.05'de önemli bulunmuştur.

Ağır metal iyonlarının etkisine bırakılan submers bitkilerin izole edilen klorofilleri ile yapılan çalışmada; klorofilin merkezi olan Mg, ağır metaller (Hg, Cu, Cd, Ni, Zn ve Pb) ile yer değıştirmekte ve bitkide zarar meydana getirmektedir. Bu yer değıştirmeden etkilenen klorofil molekülünün fotosentetik ışık alımı engellenmekte ve fotosentezde azalma meydana gelmektedir. Reaksiyon ışık şiddeti ile değışir, düşük ışık saçılmasında klorofilin bütün merkez atomları, ağır metalle birleşir ve Mg-klorofil birleşmesinden daha kararlı olurlar. Bu durumdaki bitkiler ölü oldukları zaman bile yeşil olurlar (Kupper ve ark., 1996). Çalışmamızda *N.officinale*'de etki süresinin ikinci haftasında 100 ppm Pb derişiminden sonraki artan derişim etkilerinde bitkilerde büyüme geriliğı görülmesine rağmen yeni çıkan

tepedeki yaprakları donuk yeşil renktedirler. Yapılan çalışmalar da bizim bulgularımızı desteklemektedir.

*Bitki Organlarında Belirlenen Su İçeriği*

Birçok araştırmacı  $Cd^{2+}$  ve  $Pb^{2+}$  ile muamele edilen bitkilerde su içeriği ve terlemede bir azalma olduğunu rapor etmişlerdir (Hagemeyer ve ark.,1986; Ahrend ve ark.,1997; Vassilev ve ark.,1997). Çeşitli mekanizmalar bu etkilerin temelini teşkil eder. Birincisi; yaprak sahasının büyümesinin azalması ve bunun sonucu olarak da büyümenin gecikmesidir (Barcelo ve ark., 1988). Yapılan çalışmada da yüksek Pb derişimlerinde yaprak sahaları küçülmüştür bu da su içeriğinin azalmasına nedeni olmuştur. İkincisi;  $Cd^{2+}$  ve  $Pb^{2+}$  ile muamele edilen bitki yapraklarında bazen bekçi hücreleri daha az sayıda olurken diğer durumlarda bekçi hücreleri daha fazla sayıdadır. Çünkü ağır metaller genellikle yaprak büyümesini stomaların kendilerine özgü olan yapılarından daha fazla etkiler (Breckle, 1991). Üçüncüsü;  $Cd^{2+}$  ve  $Pb^{2+}$  hücre turgorunu ve hücre duvarının elastikiyetinin devamlılığını sağlayan bileşiklerin içeriğini azaltır (Breckle, 1991; Barcelo ve Poschenrieder, 1990; Lane ve ark.,1978; Burzynski ve Jacob, 1983). Böylece azalan su potansiyeli büyümenin inhibe edilmesine neden olur (Hernandez ve ark.,1997; Vassilev ve ark.,1997; Barcelo ve ark., 1986; Leita ve ark., 1995). Yapılan çalışmada 100 ppm Pb'yi izleyen yüksek derişimlerde bütün olarak bitki gelişiminde olumlu yöndeki morfolojik görüntü kaybolmuştur. Dördüncüsü; bu metaller ABA içeriğini de artırır ve böylece stoma kapanması meydana gelir (Hollenbach ve ark., 1997). Beşincisi; düzensiz solunum ve oksidatif fosforilasyon bitkideki su düzeninin bozulmasına neden olur ve daha da fazla ağır metallere maruz bırakılması sonucu meydana gelen su stresi prolin üretimini artırır (Schat ve ark., 1997). Yapılan çalışmada elde edilen verilere göre 25 ppm Pb ortamındaki bitkilerde en fazla su içeriği görülmüş, bu oran artan Pb miktarına bağlı olarak kök, gövde ve yaprakta azalmıştır (Şekil 4.3) ve yüksek Pb derişimleriyle ilişkili olarak bitki canlılığını yitirmeye başlamıştır. 200 ppm Pb'den sonra artan derişimlerde bitkinin su içeriğinin daha fazla azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.3.) Elde edilen veriler yapılan çalışmalarla aynı yöndedir.

*N. officinale* yapraklarında belirlenen kuru madde miktarı ile Pb derişimi arasında  $P<0.01$  düzeyinde önemli olan pozitif bir ilişki bulunmuştur. Pb derişimi su

içeriğini azalttığı için kuru madde miktarında artış meydana gelmiştir. Gövde ve kökteki kuru madde miktarlarında da Pb derişimiyle ilgili olarak pozitif bir ilişki bulunmuş, artan Pb derişimine bağılı olarak kuru madde miktarında artış belirlenmiştir. Kökteki artış  $P < 0.05$  düzeyinde önemli bulunmuştur. Gövde ve yapraklardaki yaş ağırlık ile Pb derişimi arasında kurulan ilişki önemsizdir.

#### *Mineral Madde Konsantrasyonu*

Çoğu durumlarda Cd ve Pb hem katyonların ( $K^+$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ) hem de anyonların alımını kontrol eder (Srivastava ve Jaiswal, 1990; Burzynski ve Grabowski, 1984).

Bitkiler geliştikleri ortamdan mangani kökleri aracılığıyla  $Mn^{+2}$  iyonu şeklinde alırlar. Bitkilerin Mn içerikleri bitki genotiplerine bağılı olduğu kadar yetiştirme ortamlarına bağılı olarak da değişiklik gösterirler. Bitkilerin Mn içeriklerini pH etkilemektedir. Kuru madde ilkesine göre pH'sı 6.9-8.0 olan topraklarda yetişen bitkilerin Mn içerikleri 6-185 mg  $kg^{-1}$  arasındadır (Kacar ve Katkat, 1998). Çalışmada da bitkilerin yetiştirme ortamlarının pH'sı bu düzeyler arasındadır. *N. officinale*'de gövde ve yaprağında belirlenen Mn miktarı verilen sınırlar içinde bulunmuştur. *N. officinale* gövde ve yaprağında belirlenen Mn miktarı 25, 50 ve 100 ppm Pb derişimlerinin etkisinde artarken yüksek derişimlerde azalma görülmüştür. Manganın, bileşiminde bulunduğu süperoksit dismutaz enzimi ( Mn SOD), bitkide cereyan eden çeşitli biyokimyasal tepkimelerde moleküler oksijenin indirgenmesi sonucu oluşan hidrojen peroksidin parçalanması evrelerinde hücrelerin zarar görmemesini sağlar (Kacar ve Katkat, 1998). Bu çalışmada da yapraktaki Mn miktarı 250 ve 500 ppm Pb derişiminin etkisinde azalırken antioksidant enzim olan SOD değişiminde de aynı derişimde azalma görülmüştür (Şekil 4. 12). Gövde de ise Hem Mn hem de SOD değişiminde azalma 200, 250 ve 500 ppm Pb derişimlerinin etkisinde olmuştur. 200 ppm Pb derişiminin etkisinde ise gövde ve yaprakta Mn miktarı azalırken SOD miktarı en fazla bulunmuştur. Bu sonuçlar bize Mn ile SOD değişimi arasında ilişki olduğunu ve bu ilişkiyi ağır metal gibi abiyotik streslerin değişikliğe uğrattığını düşündürmektedir.

Gövde ve yaprakta belirlenen Mn ve Pb miktarı arasında kurulan ilişki önemsiz bulunmuştur.

Bitkilerin Cu içerikleri Fe, Mn, Zn içeriklerine göre daha azdır. Cu miktarı bitkilerin çeşidine, organlarına, yaşına, gelişme ortamında bulunan Cu miktarına ve çeşitli çevre etmenlerine bağlı olarak değişir (Kacar ve Katkat 1998). Kontrol ortamındaki *N officinale* gövdesinde de belirlenen Cu miktarı yapraktan daha fazla bulunmuştur. Pb'nin farklı derişimlerinin etkisindeki bitkilerde Cu miktarı kontrolden az bulunmuştur. Bu sonuçlar bize bitkinin Cu alımının bitki organlarına ve yetiştirme ortamındaki diğer metallerin derişimine bağlı olduğunu göstermektedir. Kuru madde ilkesine göre bitkilerde Cu miktarı 5- 15 mg kg<sup>-1</sup> arasında değişir. Bitkilerin vejetatif organlarında bulunan 1-3.5 mg kg<sup>-1</sup> Cu kritik noksanlık düzeyini oluşturur. Cu miktarı 15-30 mg kg<sup>-1</sup> üzerinde olduğu zaman zehir etkisi görülebilir (Robson ve Reuter, 1981). Bitkideki Cu miktarı bitkinin çeşidine göre değiştiğinden, *N. officinale*'de Cu miktarı optimum değerler dışında olmasına rağmen zehir etkisi görülmemiştir. *N. officinale* doğal ortamdan toplandığı için bünyesinde Cu bulunmaktadır. Besin çözeltilisindeki Pb derişimleri bitkinin Cu alımını farklı etkilemiştir. 25, 50 ve 100 ppm Pb etkisinde Cu derişimi artarken ( Pb'li derişimler arasında) 200, 250 ve 500 ppm Pb'de azalma görülmüştür. Pb derişimindeki bitkinin gövde ve yapraklarında belirlenen artış kontrol düzeyinin altındadır. Bitkideki Cu alımını hem Pb derişimleri hem de diğer metaller bitkide bulunma miktarları etkilemiştir. Değişik iyonların Cu<sup>2+</sup> alımı üzerine etki yaptığı saptanmıştır. Ortamda fazla miktarda bulunan Zn<sup>2+</sup> ve Cu<sup>2+</sup> karşılıklı olarak bitkiler tarafından birbirlerinin alınmalarını olumsuz şekilde etkilemektedirler (Haldar ve Mandal, 1981). Bu olgu Zn<sup>2+</sup> ve Cu<sup>2+</sup> kasyonlarının aynı taşıyıcılar tarafından alınmasına ve bitkide iç yöreye taşınmasına dayanılarak açıklanmıştır. Taban ve Alpaslan (1996) yaptıkları denemede toprağa artan miktarlarda uygulanan çinkonun mısır bitkisinin Cu alımını önemli derecede azalttığını saptamışlardır. 200, 250 ve 500 ppm Pb'de Zn miktarları artarken Cu miktarları azalmıştır. Bitkide Cu'nun azalması bitkide çok çeşitli ve önemli metabolik işlevleri olumsuz etkilediğinden dolayı bitki gelişimi gerilemiştir (Çizelge 4.1.). Gövdedeki Pb derişimi ile Cu arasındaki korelasyon katsayısı r = - 0.49 dur. İki element arasında negatif bir ilişki vardır. Pb derişimi arttıkça Cu azalmaktadır. N = 28 durumunda P 0.01 de ilişki önemli bulunmuştur. Yapraktaki Pb derişimi ile Cu miktarı arasındaki korelasyon katsayısı r = - 0.52 dir.

İki element arasında negatif bir ilişki vardır. N = 28 durumunda P 0.01 de önemli bulunmuştur.

Bitkiler geliştikleri ortamdan demiri sürekli almak durumundadır. Yaşlı yapraklardan genç yapraklara doğru Fe'nin aktarılamaması nedeniyle bitki büyüme organlarının Fe gereksinimini sürekli olarak Fe alarak karşılayabilmektedir. Bitki yapraklarında Fe miktarı kuru madde ilkesine göre 10-1000 mg /kg arasında değişir. Yeterli Fe miktarı ise genelde 50-250 mg kg<sup>-1</sup> arasındadır. Fe miktarı 50 mg kg<sup>-1</sup>'den az olduğu zaman bitkilerde noksanlık belirtileri görülür (Kacar ve Katkat, 1998). *N.officinale*'de gövde bulunan Fe miktarı bulunması gereken optimum değerler arasındadır. Yaprakta ise yeterli değer üzerindedir. 10-100 ppm Pb arası bulunması gerekenin ve kontrol değerinin üstündedir. (Şekil 4.6.) Yapraktaki Fe miktarının % 80'i kloroplastlarda toplanmaktadır (Terry ve Abada, 1986). 500 ppm Pb etkisindeki *N. officinale* yapraklarında Fe miktarının diğer derişimlerden fazla bulunması uç kısımlarındaki koyu yeşil ve küçük yaprakların yüksek miktarda Fe içermesinden olabilir. Fe bitkilerde önemli fizyolojik işlevleri olan ve pek çok biyokimyasal tepkimeleri katalize eden çeşitli enzimleri aktive eder. Bu enzimler solunum zinciri içerisinde ve yükseltgenme tepkimelerinde olağanüstü önem taşıyan enerji metabolizmasında elektron taşıyıcısı olarak görev yapar. Katalaz enzimi fotorespirasyonda ve karbonhidrat sentezinde önemli rol oynar ( Kacar ve Katkat, 1998). *N. officinale* gövdesinde görülen artış bitkinin aynı kısmında katalaz enzimini de arttırmıştır. 25, 200 ve 250 ppm Pb derişiminde CAT aktivitesindeki artış ile aynı derişimdeki Fe miktarındaki artış bitkinin stres altında olduğunu göstermektedir. Diğer yüksek Pb derişiminde (500 ppm Pb) belirlenen Fe artışları bitkinin bu derişimlerde enerji metabolizmasının daha fazla işlediğini veya Fe'nin diğer enzimlerin yapısına girdiğini göstermektedir. Gövdedeki Pb derişimi ile Fe arasındaki korelasyon katsayısı  $r = 0.70$  dir. İki element arasında pozitif bir ilişki vardır. Pb arttıkça Fe artmaktadır. N = 28 durumunda P 0.01 de önemli bulunmuştur. Yapraktaki Fe miktarı ile Pb arasındaki ilişki önemsiz bulunmuştur.

Bitki dokularında Ca'nın büyük bir bölümü diğer makro elementlerden farklı olarak hücre duvarlarında yer alır. Bunun temel nedeni hücre duvarlarında kalsiyumu bağlama yerlerinin fazla olması ve sitoplazma içerisinde hareketinin sınırlı olmasıdır.

Pektatlar şeklinde bulunan Ca, hücre duvarlarının ve bitki dokularının güçlenmesinde temel görevi üstlenmiştir. Yeteri kadar Ca bulunması durumunda fazlaca oluşan Ca pektat bileşikleri dokuları güçlü kılar ( Cassells ve Barlas, 1976). Bitkilerin Ca içeriği 2000-30.000 ppm arasında değişir (Kacar ve Katkat, 1998). Yamada'ya (1975) göre 5000 ppm Ca içeriği bitki dokuları için yeterli görülmüştür. Kontrol ortamındaki *N. officinale* yapraklarındaki değer gövdedeki birikimin 4 katından daha fazladır (Şekil 4.7.). Farklı Pb derişimli ortamlarda bu oran azalmış Pb, Ca alımına olumsuz etki yapmıştır. Buna rağmen gövde ve yaprakta bulunan değerler sınır değerleri arasındadır. Köklerdeki Ca miktarı sınır değerlerinin çok altındadır (Çizelge 4.7.) 200,250 ve 500 ppm Pb'nin etkisinde bulunan bitkilerin kök gelişimlerini durması Ca noksanlığından kaynaklanabilir. Bu noksanlığa yetiştirme ortamındaki diğer katyonların cins ve miktarları ve yüksek derişimdeki Pb neden olabilir. Pb'nin farklı derişimlerinin etkisindeki *N.officinale* gövde ve yaprağında Ca miktarı 100 ppm Pb derişimine kadar artış göstermiş, 100 ve 200 ppm Pb derişimlerde ise azalma görülmüştür. Bitkinin su içeriğinin de bu derişimlerde azalmaya başlaması, su içeriği ile bitkinin metal birikimi arasında bir ilişki olabileceğini düşündürmektedir. Yüksek Pb derişimlerde de Ca miktarının fazla bulunması su içeriğinin çok fazla azalması ve suda eriyemeyen kalsiyumun hücre duvarlarında ve vakollerde birikmesinden kaynaklanmaktadır. Bitkilerde bulunan kalsiyumun büyük bir bölümü suda çözünebilir şekildedir (Kacar ve Katkat, 1998). Gövde ve yapraktaki Pb derişimi ile Ca arasında kurulan ilişki önemsizdir.

Bitkilerin Mg içerikleri kuru madde ilkesine göre genelde 1500-10.000 ppm arasında değişir. Çoğu bitkilerde yeterli miktar 2500 ppm'dir (Kacar ve Katkat, 1998). *N. officinale*'de belirlenen değer optimum değerler arasında saptanmıştır ( Kacar, 1984). Kontrol ortamında bulunan *N. officinale*'de yapraktaki Mg miktarı gövdede belirlenenden fazla bulunmuştur. Çünkü Mg klorofilin yapısında yer almasıdır. Yeşil bitki yapraklarında magnezyumun en önemli işlevi klorofil moleküllerinde merkezi atom olarak yer almasıdır. Bitki yapraklarında toplam magnezyumun genel olarak % 6 ile % 25 kadar gelişme ortamının magnezyum miktarına bağlı olarak klorofil molekülü içerisinde yer alır. Toplam magnezyumun %5-10 kadarı ise pektatlar şeklinde hücre duvarlarına güçlü olarak bağlanmış yada

vakuollerde güç çözünebilir tuzlar şeklinde çökelmiş olarak bulunur. Toplam magnezyumun kalan % 60-90'ı ise suda çözünebilir şekildedir (Kacar ve Katkat, 1998). Protein sentezinde de Mg etkilidir. Yeteri kadar bağımsız magnezyumun bulunmaması durumunda protein sentezinin durduğu saptanmıştır ( Sperraza ve Spremulli, 1983). *N. officinale* yapraklarında 25 ve 50 ppm Pb derişimlerinin etkisinde Mg miktarının artışı, ağır metal stresine giren bitkinin tepkisi olarak protein miktarını da arttırdığını düşündürmektedir. 100 ppm Pb'yi izleyen derişimlerde ise Mg miktarı azalmıştır. Bunun nedeni Pb ile Mg atomunun yer değiştirmesidir. Ağır metal iyonlarının etkisine bırakılan submers bitkilerin izole edilen klorofilleri ile yapışan çalışmada ağır metaller (Hg, Cu, Cd, Ni, Zn ve Pb ) ile yer değiştirmekte ve bitkide zarar meydana getirmektedir. Bu yer değiştirmeden etkilenen klorofil molekülünün fotosentez için gerekli olan ışık toplaması önlenmiş olur ve fotosentezde bozulma meydana gelir. Klorofilin bütün merkez atomları ağır metalle birleşir. Bu durumda bitkiler ölü oldukları zaman bile yeşil olurlar (Kupper ve ark., 1996). 250 ve 500 ppm Pb etkisindeki *N. officinale* yapraklarında Pb atomları klorofile bağlanmasından dolayı renkleri parlak olmayan koyu yeşildi. 25 ppm Pb etkisinde gövde de Mg azalması, bitkide bu derişimde su içeriğinin fazla olmasından dolayı çözünür hale gelmesi ve yapraklara taşınabileceğini ve çeşitli metabolik olaylarda kullanılabileceğini düşündürüyor. Çünkü bitkilerde metabolik enerji kaynağı olarak önemli işlevlere sahip olan ATP'nin fosforilizasyon tepkimesi sonucu oluşumunda, bir başka deyişle inorganik fosfatın ADP'ye bağlanmasında görev yapan enzimin işlevi için mutlak düzeyde magnezyuma gereksinim vardır ( Kacar ve Katkat, 1998). Gövdede ve yapraklardaki Pb derişimi ile Mg derişimi arasında kurulan ilişki önemsizdir.

Bitkilerde Zn dağılımı ve taşınımı gelişme ortamının Zn düzeyine olduğu kadar bitki çeşidine bağlı olarak değişir. Kültür bitkilerinin Zn içerikleri kuru madde ilkesine göre 20-100 mg kg<sup>-1</sup> arasında değişir. Kimi bitkilerin kökünde Zn içeriği yüksektir (Kacar ve Katkat, 1998). Kontrol ortamında bırakılan *N. officinale*'nin gövde ve yapraklarında belirlenen Zn miktarı sınır değerleri arasındadır (Çizelge 4.9.). 25 ve 100 ppm Pb etkisinde Zn miktarında görülen azalmalar bitkinin gelişme ortamına konulan Pb etkisi nedeniyle olmaktadır. Gelişme ortamına eklenen

Pb derişimleri kök ortamını kimyasal yapısını değiştirmekte Zn alımını azaltmaktadır. Zn alımına Fe alımı da etki etmektedir. *N. officinale* gövde ve yaprağında 25 ve 50 ppm Pb derişimlerinin etkisinde Fe miktarında artış görülürken Zn miktarı azalmıştır. Alpaslan ve Tabana'a (1996) göre bitki kökünde aynı aktif taşıyıcılar tarafından iç yöreye aktarılmaları nedeniyle Fe ve Zn'nun bitkiler tarafından alınmaları karşılıklı olarak etkilemektedir. 200, 250 ve 500 ppm Pb derişimlerinin etkisinde ise bitkinin yetişme ortamını asit yöne çekip daha fazla Zn alımı gerçekleşmektedir. Bitki kökleri tarafından salgılanan organik asitlerin örneğin; sitrik asit, amino asitler yanında fenolik bileşikler etkisiyle rizosfer pH'sı hızla düşer (ve bitkinin daha fazla Zn almasına neden olur. Kök tarafından salgılanan bu maddelere fitosiderofor denir (Tagaki ve ark.,1988). Kök salgılarıyla rizosfer pH'sının asit yöne değişmesine bağlı olarak kök hücrelerini geçirgenliklerinin artması sonucu şekerler, amino asitler ve fenolik bileşikler gibi düşük moleköl ağırlıklı organik bileşikler daha fazla salgılanır (Çakmak ve Marchner, 1988).

Biomembranların kalitesi üzerine çinko, membranda bulunan fosfolipid ve sülfühidril gruplarına bağlanmak suretiyle olumlu etki yapar. Bunun sonucu olarak membrandaki lipitler ve proteinler oksidatif zararlanmaya karşı korunur. Zn zehir etkisi yapan oksijen radikallerinin çıkışını kontrol altında tutar. Süperoksit dismutaz enzimi (CuZn SOD) son derece toksik olan süperoksit radikalini etkisiz duruma getirir (Çakmak ve Marschner 1988). 200, 250 ve 500 ppm Pb derişimlerinin etkisinde *N. officinale* gövde ve yapraklarında Zn miktarı artmıştır. Bitkide de 200 ve 250 ppm Pb'de SOD miktarı artmıştır. Gövdedeki Pb derişimi ile Zn arasında kurulan ilişki önemsizdir. Yapraklarda Pb derişimi ile Zn arasındaki korelasyon katsayısı  $r = 0.50$  dir. Pb arttıkça Zn artmaktadır.  $N = 28$  durumunda  $P 0.01$  de ilişki önemli bulunmuştur.

#### *Lipit Peroksidasyonu*

$H_2O_2$  ve serbest radikallerin lipit peroksidasyonu ile ilişkili olarak membran hasarına neden olduğu rapor edilmiştir (Hendry ve ark., 1992). Malondialdehit (MDA) biyomembrandaki doymamış yağ asitlerinin ayrışma ürünlerinden biridir. Pb ve diğer ağır metal stresi altında *Vigna* fidelerinde, (Bhattacharya ve Choudhuri, 1995), pirinçte (Mishra ve Chudhuri, 1996) MDA düzeyini arttırdığı rapor

edilmiştir. Toksik Zn miktarına bırakılan bitkilerde lipit peroksidasyonu arttığı için MDA üretiminde de artma meydana gelir. Serbest radikallerin aşırı oluşması ve artan lipit peroksidasyonu MDA üretimini arttırmaktadır (Alia ve ark., 1995). *N. officinale* yapraklarında artan Pb derişimlerine bağı olarak MDA miktarında artma belirlenmiştir (Şekil 4.11). Artan MDA miktarı bitkinin Pb'nin düşük derişimlerinin etkisinde de stres altında olduğunu göstermektedir. Yapraktaki Pb derişimi ile lipit peroksidasyonu arasındaki korelasyon katsayısı  $r = 0.69$  dur. Pb derişimi ile lipit peroksidasyonu arasında pozitif bir ilişki vardır. Artan Pb derişimi lipit peroksidasyonunu arttırmaktadır. N= 28 durumunda P 0.01'de ilişki önemli bulunmuştur.

*Süperoksit Dismutaz, Askorbat Peroksidaz, Glutasyon Redüktaz ve Katalaz Aktivitesi*

Metaller membran lipit peroksidasyonunu ve oksidatif stresi doğrudan ya da dolaylı olarak tetiklerler. Membran hasarı üzerine metallerin dolaylı etkileri biyokimyasal redoks basamakları ile interaksiyondan meydana gelir. Özellikle demir ve bakır gibi aktif metaller hücrel redoks basamaklarını etkileyebilirler veya doğrudan süperoksit anyonu (Kumar ve ark.,1978), singlet oksijen (Ding ve Chan,1984), hidrojen peroksit (Freedman ve ark., 1989) ve lipit serbest radikalleri (Chan ve ark.,1982; Sandmann ve Böger, 1980) gibi reaktif serbest radikalleri meydana getirebilirler.Sonuç olarak bu metallerin toksisitesi hücrelerde oksidatif stresin bir sonucu olan serbest radikallerin oluşumunu arttırırlar (Sandman ve Böger,1980; Freedman ve ark.,1989).

Belirli şartlar altında hücreler süperoksit dismutaz(SOD, EC.1.15.1.1), katalaz (CAT, EC. 1.11.1.6), peroksidazlar (POX, EC 1.11.1.7) ve özellikle askorbat peroksidaz (APOX, EC, 1.11.1.6) gibi metaloenzimlerin üretimini attırarak reaktif türlerin oluşmasına tepki verirler (Halliwell ve Gutteridge, 1989). Bununla beraber bazı durumlarda bitkiler çeşitli dış kaynaklı faktörlerin bir sonucu olarak oluşan SOD aktivitesinde ne önemli bir değişiklik nede bir kesinti meydana getirebilirler. Aşırı  $Fe^{+3}$ 'e maruz bırakılan *Nicotiana plumbaginifolia*'nın yapraklarında önemli bir değişiklik olmamıştır (Kampfenkel ve ark., 1995). Kadmiyumun eklenmesi *Rhisopogon roseolus* bitkisinde SOD aktivitesini azaltmıştır (Miszalski ve ark.,

1996). Kurşuna maruz bırakılan *Lupin* kökleriyle yapılan çalışmada ise SOD aktivitesinin uyarıldığı görülmüştür. Bu uyarılma, hem metal konsantrasyonu hem de metalin etkisinde kalma süresi ile ilişkilidir (Rucinska ve ark., 1999). *N. officinale* köklerinde SOD aktivitesi çok düşük olduğundan bulgularda verilmemiştir. Gövdede ve yapraklarda 25 ve 50 ppm Pb derişiminin etkisinde SOD aktivitesi azalırken 100, 200, 250 ve 500 ppm Pb derişimlerinin etkisinde derişime bağılı artma görülmüştür. Artmalar kontrol düzeyinin üstündedir. Kurşunla muamele edilen *N. officinale*'nin yapraklarında SOD aktivitesindeki artış süperoksit anyonunun yüksek oluşundan kaynaklanmaktadır. Yulafın  $Cu^{+2}$  iyonlarıyla muamele çalışmalarında fotosentetik dokularda bizim çalışmamıza benzer olarak SOD aktivitesinin arttığı bulunmuştur (Luna ve ark.,1994). *N. officinale* gövde ve yaprakları ile Pb'nin farklı derişimleri arasında kurulan ilişki önemsiz bulunmuştur.

Kurşun etkisine bırakılan *Lupin* köklerinde yapılan çalışmada hem CAT hem de AP aktivitesi 150 ppmde en yüksek düzeydedir. Daha yüksek derişimlerde bu enzimin aktivitesi azalmıştır. AP aktivitesi 100 ppm'de artmaya başlarken 350 ppm'de kontrol düzeylerinin önemli oranda altına düşmüştür (Rucinska ve ark., 1999).

Toksik Zn düzeyleri altında büyüyen *B. juncea* fidanlarında  $H_2O_2$ 'in detoksifikasiye edilmesinde önemli rol oynayan katalaz aktivitesi önemli bulunmuştur (Prasad ve ark., 1999). Cd, Pb, Cu gibi ağır metallerin toksik konsantrasyonlarının etkisine bırakılan bitkilerde CAT aktivitelerinde artış rapor edilmiştir (Van Assche ve Clijsters 1990; De Vos ve Schat, 1991). Pb'nin farklı derişimlerinin etkisine bırakılan *N. officinale* gövdesinde katalaz aktivitesi derişime bağılı olarak artmıştır. Bitkide strs sonucu oluşan süperosidin SOD ile dismutasyonu sonucu üretilen  $H_2O_2$ , gövde CAT ve GR tarafından detoksifikasiye edilmektedir. Gövdedeki Pb derişimi ile CAT aktivitesi arasındaki korelasyon katsayısı  $r = 0.427$  dir. Pb derişimi ile CAT aktivitesi arasında pozitif bir ilişki vardır.  $N= 21$  durumunda  $P 0.05$ 'de ilişki önemli bulunmuştur.

Askorbat-glutasyon döngüsünün, glutasyon ve askorbatı içine alan birbirini izleyen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları süresince oluşan belirli oksijen türlerinin detoksifikasyonunda hayati rol oynadığı saptanmıştır. Bitkilerde  $H_2O_2$ 'in

detoksifikasiye edilmesinde hidrojen donörü olarak askorbatı kullanan peroksidazların bir fonksiyonu olduğu bilinmektedir (Asada, 1994). Zn'nin toksik düzeylerinin etkisine bırakılan *B. juncea* fidelerinde AP aktivitelerinde artış meydana gelmiştir (Prasad ve ark., 1999). Weckx ve Clijsters (1997) yaptıkları çalışmada Cu toksisitesi altında fasulye bitkilerinde AP aktivitesinde artış meydana geldiğini göstermişlerdir. *N. officinale* gövdesinde kontrolü izleyen Pb derişimlerinin etkisinde AP aktivitesinde artma görülmüştür. CAT'ın aktivitesinin azalma gösterdiği derişimlerde AP, hücrelerden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i uzaklaştırmıştır. Gövdedeki Pb derişimi ile AP aktivitesi arasında kurulan ilişki önemsiz bulunmuştur.

GSH ve GR'in bitki hücrelerinde hidrojen peroksidin temizlenmesindeki rolü Halliwell-Asada enzim yolunda gösterilmiştir. GR, okside glutatyonun glutatyona dönüşümünü NADPH'a bağımlı olarak katalizler (Bowler ve ark., 1992). Pb etkisindeki mısırda ve *Oryza sativa*'da GR aktivitesinin artmasına neden olduğu rapor edilmiştir (Verma ve Dubey, 2003). *N. officinale* gövde ve yapraklarında GR aktivitesi Pb derişimine bağılı olarak artma göstermiştir. Gövdedeki Pb derişimi ile GR aktivitesi arasında kurulan ilişki önemsizdir. Yapraktaki Pb derişimi ile GR aktivitesi arasındaki korelasyon katsayısı  $r = 0.72$  dir. Pb derişimi ile GR aktivitesi arasında pozitif bir ilişki vardır. Pb birikimi arttıkça GR aktivitesi artmaktadır. N= 21 durumunda P 0.01 de ilişki önemli bulunmuştur.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kurşunun farklı derişimleri ile Hoagland besin çözeltilisinde 14 gün yetiştirilen *N.officinale* bitkisinin yüksek Pb derişimlerindeki morfolojik gelişiminde fitotoksik faza doğru bir geçiş görülmüştür. Bu geçiş morfolojik olarak belirlenmiştir. Yüksek derişimlerde kök gelişimi çok gerilemiş, yaprak ayaları küçülmüş, nod mesafeleri kısalmış ve yapraklarda klorozis ortaya çıkmıştır. Sonuç olarak bitki gelişimi Pb derişimlerine ve etki süresine bağlı olarak önemli derecede yavaşlamıştır.

Kurşunun düşük derişimlerinin etkisindeki *N. officinale* yapraklarında fotosentetik pigment miktarlarında artış belirlenirken yüksek derişimlerde (200, 250 ve 500 ppm Pb) önemli bir azalma görülmüştür.

Kök, gövde ve yapraklardaki su içeriği 50 ppm Pb'ye kadar olan derişimlerde artış gösterirken toksik derişimlere doğru bitkinin su içeriği azalıp kuru madde miktarı artmıştır. En fazla su içeriğinin azalması kökte olmuştur. bitkide kuru madde miktarının artmasının nedeni hücre duvarlarında ve vakollerde metal birikimidir.

Bitkinin mineral madde içeriği her element için farklı olsa da genel olarak 500 ppm Pb'de Ca, Fe, Mn ve Zn miktarları yüksek bulunurken Cu ve Mg miktarlarında azalma belirlenmiştir. Bu iki elementin düşük düzeyde olması bitkinin fizyolojik ve biyokimyasal faaliyetlerini olumsuz etkilemekte sonuç olarak bitki gelişiminde azalma görülmektedir.

Membran hasarına neden olan lipit peroksidasyonu sonucu oluşan MDA miktarı kontrolü izleyen derişimlerde artış göstermiştir. Kontroldeki MDA değerinin 250 ppm Pb'de 2 katı, 500 ppm Pb'de 3 katı olması bize bu derişimlerin bitki tarafından tolere edilmesi güç olan toksik derişimler olduğunu göstermektedir.

Çeşitli çevre koşulları sonucu bitkide oluşan oksidatif strese karşı bitki savunma mekanizmasında yer alan ve enzim yapısında olmayan antioksidant, karotenoitin düşük Pb derişimlerinde yüksek bulunması bitkinin bu derişimlerde bile stres altında olduğunu göstermektedir. Toksik oksijen radikallerinden singlet oksijenin ( $^1O_2$ ) yok edilmesinde etkili olan karotenoitin düşük Pb derişimlerinde artış göstermesi, bitkinin bu derişimlerde sağlıklı bir görünüm kazanmasında rolü olduğunu düşündürmektedir.

Artan Pb derişimlerinin bitkide meydana getirdiği stresin oluşturduğu serbest radikalleri ve zararlı oksijen türlerini ortamdan uzaklaştıran antioksidant enzimler SOD, AP, GR ve CAT aktivitesi düzeylerinde değişiklikler belirlenmiştir. SOD aktivitesi 100, 200, 250 ve 500 ppm Pb’de derişime bağlı artış göstermesi, bu derişimlerin bitki için toksik değerler olduğunu göstermiştir. GR aktivitesi yaprakta derişime bağlı olarak artma gösterirken, gövdede GR aktivitesi 250 ve 500 ppm Pb derişimlerinin etkisinde azalma göstermiştir. AP aktivitesi 25, 50 ve 500 ppm Pb derişimlerinin etkisinde artarken 200, 250 ve 500 ppm Pb derişimlerinde azalmıştır. CAT aktivitesi *N. officinale* gövdesinde derişime bağlı artma göstermiştir. 100 ppm Pb derişiminde bulunan azalma önemli görülmemiştir. CAT ve GR aktivitesinin azaldığı 50 ve 100 ppm Pb derişimlerinde APaktivitesi artmıştır. Bu sonuç bazı antioksidant enzimlerin aktifliğinin azaldığı durumlarda diğer bir enzimin aktivitesini arttırıp hücrelerden hidrojen peroksidi uzaklaştırdığını göstermektedir. *N. officinale* bitkisinde Pb derişimine bağlı antioksidant enzim kapasitesindeki değişiklikler 500 ppm Pb derişiminin toksik düzey olduğunu göstermektedir. Antioksidant kapasite çok azalmış dolayısıyla bitkinin yaşamını sürdürmesi zorlaşmıştır.

Su teresi (*N. officinale* R.Br.) ekolojik ve ekonomik olarak önemli tatlı su makrohidrofitlerinden en önemlilerinden biridir. Yıllardır insanlar tarafından hem besin hem de tıbbi bir bitki olarak kullanılmaktadır. Bunun yanında atık suların arıtılmasındada kullanılmaktadır. Birçok yararlı özelliği olan bu bitkinin yetiştirilmesine gereken önem verilmeli, çevre kirliliğinden uzak ortamlarda yetiştiriciliği yapılmalıdır. Daha çok kırsal kesimlerde tüketilen bitkinin besin olarak kullanımı yaygınlaştırılmalıdır. Bitkinin ağır metalleri toplayabilme özelliğinden dolayı sanayi ve evsel atıklardan dolayı kirlenmiş akuatik ortamlarda yetişen bitkiler ağır metalleri bünyelerine almakta ve böylece ya doğrudan insanlar tarafından yada dolaylı olarak hayvanlar tarafından besin zincirine alınmakta ve içerdikleri ağır metaller insan vücudunda birikmekte çeşitli rahatsızlıklar oluşturmaktadır. Bu nedenle bu tür bitkileri besin olarak tüketirken yetiştiği yer dikkate alınmalıdır. Ayrıca Pb ile kontamine olan bölgelerde yetiştirilen kültür bitkilerinde de benzer fizyolojik ve biyokimyasal etkilerin olabileceği varsayılarak hem insan sağlığı hem de kültür bitkilerinin verimi ačasından bu bölgelerde tarımsal faaliyetlerin

yapılmaması, bölgeyi kirleten etmenlerin uzaklaştırılması veya azaltılması yoluna gidilmelidir.

*N. officinale*'nin ekolojik faktörlere bağlı olarak kimyasal bileşimi incelenebilir ve diğer ağır metallere karşı tepkileri araştırılabilir. Diğer çevre kirleticilere karşı antioksidant sistemdeki değişiklikler incelenebilir. Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar ileride yapılacak çevre toksikolojisi çalışmalarına destek olabilir.

## KAYNAKLAR

- AHREND, R., KAHLE, H., and BRECKLE, S.W., 1997. Effect of Cadmium on Transpiration of Young Beech Trees (*Fagus sylvatica* L.), Air Pollution and Forest Decline, (Bucher, J.B. et al., Eds.), Birmensdorf,. 381-383.
- AKKUŞ, I., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Konya, s,148
- ALI, M. B., VAJPAYEE, P., TRIPATHI, R. D., RAI, U. N., KUMAR, A., SINGH, N., BEHL, H. M. and SINGH, S. P., 2000. Mercury Bioaccumulation Induces Oxidative Stres and Toxicity to Submerged Macrophyta *Potamogeton crispus* L. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 65: 573-582.
- ALIA, PRASAD, K. V. S. K., PARDHA SARADHI, P., 1995. Effect of Zinc on Free Radical and Proline in *Brassica juncea* and *Cajanus eajan*. Phytochemistry 39: 45-47.
- ALLEN, R., 1995. Dissection of Oxidative Stress Tolerance Using Transgenic Plants. Plant Physiol. 107 : 1049-1054.
- ALLOWAY, B.J. and AYRES, D.C., 1993. Chemical Principles of Environmental Pollution. Chapman & Hall, U.K., s. 291.
- ALPASLAN, M. ve TABAN, S., 1996. Çeltik (*Oryz sativa* L.)’de çinko-demir ilişkisi. A.Ü.Z.F. Tarım Bilimleri Dergisi 2(1): 45-49
- ALSCHER, R.G., DONAHUE, J.L. and CRAMER, C.L., 1997. Reactive Oxygen Species and Antioxidans: Relationships in Gren Cells. Physiol. Plant., 100: 224-233.
- ASADA, K., URANO, M., and TAKAHASHI, M., 1973. Subcellular Location of Superoxide Dismutase. Eur. J. Biochem., 36: 257-266.
- ASADA, K., and TAKAHASHI, M., 1987. Production and Scavenging of Active Oxygen in Photosynthesis. In D.J. Kyle, CB. Osmond and C.J. Arntzen, (eds.), Photoinhibition, Elsevier, Amsterdam, s. 227-287.
- ASADA, K. and KİSO, K. 1973. The Photoxidation of Epinephrine by Spinach Chloroplasts and its Inhibition by Superoxide Dismutase: Evidence for The Formation of Superoxide Radicals in Chloroplasts. Agric. Biol. Chem. 37: 454-454.

- ASADA, K., 1994. Production and Action of Active Oxygen Species in Photosynthetic Tissues. In: C.H. FOYER, P.M. MULLINEAUX (Eds.), Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in Plants. CRC Pres, Boca Raton, FL, 77-104.
- ASADA, K., 1997. The Role of Ascorbate Peroxidase and Monodehydroascorbate Reductase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Scavenging in Plants. In J. G. Scandalios, (ed.) Oxidative stress and Molecular Biology of Antioxidant Defences, (Monograph Series, Vol. 34), Cold Spring Harbor Laboratory pres, Cold Spring Harbor, s. 715-735.
- BAKER, A.J.M. and BROOKS, R.R., 1989. Terrestrial Higher Plants which Hyperaccumulate Metallic Elements. A Review of their Distribution, Ecology and Phytochemistry. *Biorecovery* 1: 81-126.
- BARCELO, J. and POSCHENRIEDER, C., 1990. Plant Water Relations as Affect by Heavy Metal Stres: A Review, *J. Plant Nutr.*, 13, s.1-37.
- BARCELO, J., POSCHENRIEDER, Ch., ANDREU, I., and GUNSE, B., 1986. Cadmium Induced Decrease of Water Stress Resistance in Bush Bean Plants (*Paseolus vulgaris* ev. Contender), *J. Plant. Physiol.*, 125:17-25.
- BARCELO, J., VAZQUES, M.D., and POSCHENRIEDER, Ch., 1988. Structural and Ultrastructural Disorders in Cadmium Treated Bush Bean Plants (*Phaseolus vulgaris* L.), *New Phytol.*, 108: 37-49.
- BAUMHARDT, G.R. and WELCH, L.F., 1972. Lead Uptake and Corn Growth with Soil-Applied Lead. *J. Environ. Qual.* 1: 92-94.
- BAZZAZ, F. A. , ROLFE, G. L., WINDLE, P., 1974. Differing Sensitivity of Corn and Soybean Photosynthesis and Transpiration to Lead Contamination. *J. Environ. Qual.* 3: 156-158.
- BEAUMONT, F., JOUVC, H-M., CAGNAN, J., GILLARD, J. and PELMENT, J. 1990. Purification and Properties of a Catalase from Potato Tubers (*Solanum tuberosum*). *Plant Sci.* 72:19-26.
- BERGMANN, W., 1992. Nutritional Disorders of Plants: Development, Visual and Analytical Diagnosis. New York, s. 695.

- BEYER, W. F. and FRIDOVICH, I., 1987. Effect of Hydrogen Peroxide on The Iron-Containing Süperoxide Dismutase of Escherichia coli. *Biochemistry*, 26: 1251-1257.
- BEYER, P., 1989. Carotene Biosynthesis in Daffodil Chromoplasts: on the Membrane-Integral Desaturation and Cyclization Reactions. In C.D. Bayer, J.C. Hardison, (eds.), *Physiology, Biochemistry and Genetics of Non-Green Plastids*, American Society of Plant Physiologist, Rockville, s.157-170.
- BHATTACHARYA, M. and CHOUDHURI, M.A., 1995. Heavy Metal ( $Pb^{+2}$  and  $Cd^{+2}$ ) stres Induced Damages in *Vigna* Seedlings and Possible Involvement of Phytochelatin-like Substances in Mitigation of Heavy Metal Stres. *Indian J. Exp. Biol.* 33: 236-238.
- BIELSKI, B. and CHAN, P.C., 1973. Enzyme Catalyzed Free Radical Reactions with Nicotinamide- adenine Nucleotides. I: Lactate Dehydrogenase-Catalyzed chain Oxidation of Bound NADPH by Superoxide Radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* 159: 873-879.
- BOWEN, H.J.M., 1966. *Trace Elements in Biochemistry*. Academic Press, London, s.241.
- BOWLER, C., MONTAGU, M.V. and INZE, D., 1992. Superoxid Dismutase and Stress Tolerance. *Annu. Rev . Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 83-116.
- BOWLER, C., VAN CAMP, W., VAN MONTAGU, M. and INZE, D., 1994. Superoxide Dismutase in Plants. *CRC Crit. Ev., Plant Sci.*, 13: 199-218.
- BRADFORD, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for The Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing The Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- BREEKLE, S.W., 1991. Growth under Stress: Heavy Metals, Plant Roots: The Hidden Half, (Waisel, Y., and Kafkafi, U., Eds.), New York: Marcel Dekker, s. 351-373.
- BREWER, R.F., 1966. Lead. in: *Diagnosis Criteria for Plants and Soils*, (Edit. Chapman, H.D., Univ. Cal., Div., Agric. Sci., Riverside, USA.
- BROOKS, A., COLLINS, C.J. and THURMAN, D.A., 1981. The Mechanism of Zinc Tolerance in Grasses. *Journal of Plant Nutrition*, 3: 695-705.

- BROOKS, R.R. and ROBINSON, B.H., 2000. Aquatic Phytoremediation by Accumulator Plants. In: R.R. BROOKS (Ed.), Plants That Hyperaccumulate Heavy Metals, CABI Publis. 203-226.
- BURTON, G. W. and INGOLD, K. U., 1984. Carotene: An unusual Type of Lipid Antioxidant. *Science*, 224: 569-573.
- BURZYNSKI, M. and JACOB, M., 1983. Influence of Lead on Auxin- Induced Cell Elongation, *Acta Soc. Bot. Polon.*, 52: 231-239.
- BURZYNSKI, M., and A., 1984. Influence of Lead on NO<sub>3</sub> -Uptake and Reduction in Cucumber Seedlings, *Acta Soc. Bot. Polon.*, 53: 77-86.
- BURZYNSKI, M., 1988. The Uptake and Accumulation of Phosphorus and Nitrates and Activity of Nitrate Reductase in Cucumber Seedlings. *Acta Soc. Bot. Pol.* 57: 349-359.
- BURZYNSKI, M., and A., 1984. Influence of Lead on NO<sub>3</sub> -Uptake and Reduction in Cucumber Seedlings, *Acta Soc. Bot. Polon.*, 53: 77-86.
- CAKMAK, I. and MARSCHNER, H., 1988. Enhanced Superoxide Radical Production in Roots of Zinc Deficiency in Calcareous Soils. *Plant and Soil* 188:1-10
- CAKMAK, I. and H. MARSCHNER. 1992. Magnesium Deficiency and High Light Intensity Enhance Activities of Superoxide Dismutase, Ascorbate Peroxidase and Glutathione Reductase in Bean Leaves. *Plant Physiol.* 98: 1222-1227.
- CAKMAK, I., 1994. Activity of Ascorbate-Dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Scavenging Enzymes and Leaf Chlorosis are Enhanced in Magnesium and Potassium-Deficient Leaves, but not in Phosphorus-Deficient Leaves. *Journal of Experimental Botany* 45:1259-1266.
- CANNON, H., and BOWLES, J., 1962. Contamination by Tetraethyl Lead. *Science* 137: 765-766.
- CASANO, L. M., GOMEZ, L. D., LASCANO, H. R., GONZALEZ, C. A., and TRIPPI, V.S., 1997. Inactivation and Degradation of CuZn-SOD by Active Oxygen Species in Wheat Chloroplasts Exposed to Photooxidative Stress. *Plant Cell Physiol.*, 38: 433-440.

- CASSELLS, A.L. and BARLASS, M., 1976. Environmentally Induced Changes in The Cell Walls of Tomato Leaves in Relation to Cell and Protoplast Release. *Physiol. Plant.* 37: 239-246.
- CHAN, P., PELLER, O. and KESNER, L., 1982. Copper(II)-Catalyzed Lipid Peroxidation in Liposomes and Erythrocyte Membranes. *Lipids.* 17(5):331-337.
- CLARKSON, D.T. and LUTTGE, U., 1989. 3. Mineral Nutrition: Divalent Cations, Transport and Compartmentalization. *Prog. Botany*, 51: 93-112.
- COOK, C.D.K., 1996. *Aquatic Plant Book*. ISBN 90-5103-132-7, SPB Academic Publishing, Amsterdam, Netherlands, s.228
- CORPAS, J.F., GOMEZ, M., HERNANDEZ, J.A. and DEL RIO, L.A., 1993. Metabolism of Activated Oxygen in Peroxisomes from two *Pisum sativum* Cultivars with Different Sensitivity to Sodium Chloride. *Plant Physiol.* 144:160-165
- CREISSEN, G., EDWARDS, A. and MULLINEAUX, P.M., 1994. Glutathione Reductase and Ascorbate Peroxidase. In C. H. Foyer and P. M. Mullineaux, (Eds.), *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*, CRC Press, Boca Raton, s.343-364.
- CREISSEN, G., REYNOLDS, H., XUE, Y. and MULLINEAUX, P.M., 1996. Simultaneous Targeting of Pea Glutathione Reductase and of a Bacterial Fusion Protein to Chloroplasts and Mitochondria in Transgenic Tobacco. *Plant J.* 8:167-175.
- CUMMING, J.R. and TAYLOR, G.J., 1990. Mechanism of Metal Tolerances in Plants: Physiological Adaptation for Exclusion of Metal Ions from The Cytoplasm. In: *Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms*, Alscher, R.G. and Cumming, J.R. (Eds.) Wiley-Liss, Inc., 329-359.
- DAT, J., VANDENABEELE, S., VRANOVA, E., VAN MONTAGU, M., INZE, D. and VAN BREUSEGEM, F., 2000. Dual Action of the Active Oxygen Species During Plant Stress Responses. *Cell. Mol. Life. Sci.* 57: 779-795.

- DAVIES, K. J. A., 1987. Protein Damage and Degradation by Oxygen Radicals. I. General Aspects. *J. Biol. Chem.* 262: 9895-9901.
- DE VOS, C. H. R., SCHAT, H., 1991. Free Radical and Heavy Metal Tolerance. In: Rozema, j., Verkleji, J. A. C. (Eds.), *Ecological Responses to Environmental Stresses*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1-30.
- DEL RIO, L. A., SANDALIO, L. M., YANEZ, J. and GOMEZ, M., 1985. Induction of Manganese- Containing Superoxide Dismutase in Leaves of *Pisum sativum* L., by High Nutrient Levels of Zinc and Manganese. *J. Inorg. Biochem.* 24: 25-34.
- DEL RIO, L.A., SAUDALIO, L.M., PALMA, J.M.,BUENO,P. and CORPAS, F.J. 1992. Metabolism of Oxygen Radicals in Peroxisomes and Cellular Implications. *Free Rad. Biol. Med.* s. 557-580.
- DEL RIO, L.A.,PASTORI, G.M., PALMA, J.M., SANDALIO, L.M., SEVILLA, F., CORPAS, F.J., JIMENEZ,A., LOPEZ-HUERTAS, E. and HERNANDEZ, J.A., 1998. The Activated Oxygen Role of Peroxisomes in Senescence. *Plant Physiol.*, 116: 1195-1200.
- DING, A.H. and CHAN, P.C., 1984. Singlet Oxygen in Copper-Catalyzed Lipid Peroxidation in Erythrocyte Membranes. *Lipids.* 19:278-284.
- DINGES, R., 1982. Aquatic Plant Systems. An Unconventional Approach to Removal of Toxic Materials. Presented of The Tenth Water Resource Symposium, 'Toxic Materials- Methods of Control' University of Texas, Austin, Texas.
- DUKE, J.A., 1992. *CRC Handbook of Edible Weeds*, CRC Press, Inc., 2000 Corporate Blvd., N.W., Boca Raton, FC 33431. s.256
- ELGERSMA,F., SCHINKEL, J.N., and WEIJNEN, M.P.C., 1992. Improving Environmental Performance of a Primary Lead and Zinc Smelter (W. SALOMONS, V. FÖRSTNER, P. MADER eds.). *Heavy Metals Problems and Solutions*, Springer-Verlag, Germany, s.193-194.
- EPA, 1991. *National Air Quality and Emission Trends Report.1990.*
- ELSTNER, E.F., 1982. Oxygen Activation and Oxygen Toxicity. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33: 73-96.

- FEE, J. A. and VALENTINE, J. S., 1977. Chemical and Physical Properties of Superoxide. Superoxide and Superoxide Dismutases (A.M. MICHELSON, J. M. McCORD, I. FRIDOVICH eds.). London. Academic. s.19-60.
- FOYER, C.H. and HALLIWELL, B., 1976. The Presence of Glutathione Reductase in Chloroplast: A Proposed Role in Ascorbic Acid Metabolism. *Planta*, 133, 21-25.
- FOYER, C.H., LOPEZ-DELGADO, H., DAT, J.F. and SCOTT, I.M., 1997. Hydrogen Peroxide and Glutathione-Associated Mechanisms of Acclimator Stres Tolerance and Signaling *Physiol. Plant.* 100: 241-254.
- FREEDMAN, B., HUTCHINSON, T.C., 1981. In: Effect of Heavy Metal Pollution on Plants. II. Metals in The Environment: Lepp, N.W.(ed) London: Applied Science Publishers: 35-94.
- FREEDMAN, J.H., CRIOLO, M.R. and PEISACH, J., 1989. The Role of Glutathione in Copper Metabolism and Toxicity. *J. Biol. Chem.* 264:5598-5605.
- FRIDOVICH, I., 1995. Süperoxide Radical and Süperoxide Dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 97-112.
- GILLE, G. and SINGLER, K., 1995. Oxidative Stress in Living Cells. *Folia Microbiol.* 2: 131-152.
- GRANDJEAN, P., 1975. Lead in Danes. Historical and Toxicogical Studies, Environmental Quality and Safety, Supply, 2, Lead (F.COULSTON and F.KORTE eds.), Academic Press, New York, San Francisco, London, 6-75.
- GRANT, J.J. and LEAKE, G. J., 2000. Role of Reactive Oxygen Intermediates and Cognate Redox Signaling in Disease Resistance. *Plant Physiol.* 124: 21-29.
- GRUN, M., KROEMANN, H., POEDLESACK, W., and MACHELETT, B., 1985. Blei in der Umwelt: Pflanze Proc. Mengen und Spurenelemente Arbeitst., Karl-Maerx-Univ. Leipzig, 201-215.
- GÜNLÜ, A. ve KESİCİ, E., 2002. Su Teresi'nin (*Nasturtium officinale* R. Br.) Besinsel Değeri ile İlgili Bazı Kimyasal Bileşenlerin Mevsimsel Değişimi. *S. D. Ü. Fen Bil. Ens. Der.* 6(2): 69-79.

- HAGEMEYER, J., KAHLE, H., BRECKLE, S.W., and WAISEL, Y., 1986. Cadmium in *Fagus sylvatica* L. Trees and Seedlings: Leaching, Uptake and Interconnection with Transpiration, Water, Air, Soil Pollut., 29: 347-359.
- HALDAR, M. and MANDAL, L.N., 1981. Effect of P and Zn on the Growth and P, Zn, Cu, Fe and Mn Nutrition of Rice. Plant and Soil 59:415-420.
- HALLIWELL, B., and GUTTRIDGE, J.M.C., 1989. Protection Against Oxidants in Biological Systems: The Süperokside theory of Oxygen Toxicity in: HALLIWELL, B.,GUTTERIDGE, J.M.C., Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Pres. Oxford, s.86-123.
- HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J.M.C., 1999. Free Radicals in Biology and Medicine, 3<sup>rd</sup> ed., Oxford University Press, Oxford.
- HAMPP, R., ZIEGLER, H., ZIEGLER, I.,1973. Influence of Lead Ions on The Activity of Enzymes of The Reductive Pentose Phosphate Pathway. Biochem. Physiol. Pflanz. 164: 588-595.
- HARMAN, D. 2000. Aging.Overview, Ann. N. Y. Acad Sci. 928: 1-21.
- HASMAN, M.,1972. Bitkilerin Metabolizma Fizyolojisi, İstanbul Matbbası, İstanbul, s. 306.
- HEILENZ, S., 1970. Untersuchungen über den Bleigehalt von Pflanzen an Verkehrsreichen Standorten. Landw. Forsch. 25/I. Sonderh., 73-78.
- HENDRY, G.A.F., BAKER, A.J.M. and EWART, C.F., 1992. Cadmium Tolerance and Toxicity, Oxygen Radical Processes and Molecular Damages in Cd Tolerant and Cd Sensitive Clones of *Holcus lanatus*. Acta Bot. Neert, 40: 271-281.
- HERNANDEZ, J.A., OLMOS, E., CORPAS, F.J., SEVILLA, F., DEL RIO, I.A., 1995. Salt-Induced Oxidative Stres in Chloroplast of Pea Plants. Plant Sci. 105: 151-167
- HERNANDEZ, L.F., GARATE, H. and CARPENARUIZ, R., 1997.Effects of Cadmium on the Uptake, Distribution and Assimilation of Nitrate in *Pisum sativum*, Plant Soil, 189: 97-106.

- HERNANDEZ J.A., JIMENEZ, A., MULLINEAUX, P. and SEVILIA, F., 2000. Tolerance of Pea (*Pisum sativum* L.) to Long-Term Salt Stress is Associated with Induction of Antioxidant Defences. *Plant Cell Environ.* 23: 853-862.
- HERTWIG, B., STEB, P. and FEIERABEND, J., 1992. Light Dependence of Catalase Synthesis and Degradation in Leaves and the Influence of Interfering Stress Conditions. *Plant Physiol.* 100:1547-1553.
- HODGES, D.M., DeLONG, J.M., FORNEY, C.F. and PRANGE, R.K., 1999. Improving the Thiobarbituric Acid-Reactive-Substances Assay for Estimating Lipid Peroxidation in Plant Tissues Containing Anthocyanin and Other Interfering Compounds. *Planta*, 207: 604-611.
- HODGSON, E. K., and FRIDOVICH, I., 1975. The Interaction of Bovine Erythrocyte Superoxide Dismutase With Hydrogen Peroxide : Inactivation of The Enzyme. *Biochemistry*, 14: 5294-5299.
- HOLLENBACH, B., SCHREIBER, L., HARTUNG, W., and DIETZ, K.J., 1997. Cadmium Leads to Stimulated Expression of the Lipid Transfer Protein Genes in Barley : Implications for the Involvement of Lipid Transfer Proteins in Wax Assembly, *Planta*, 203: 9-19.
- HOMMOND- KOSACK, K.E. and JONES, J.D.G. 1996. Resistance Gene-Dependent Plant Defence Responses. *Plant Cell.* 8: 1773-1791.
- HORAK, O., 1979. *Die Bodenkultur*, 30: 120-126.
- HORWITZ, W., 1970. Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.) 11<sup>th</sup> 123a. 526b, Washington D.C.
- HOSSAIN, M. A., and ASADA, K., 1984. Monodehydroascorbate Reductase in Spinach Chloroplasts and its Participation in Regeneration of Ascorbate for Scavenging Hydrogen Peroxide. *Plant Cell Physiol.* 25: 385-395.
- HUTCHINSON, G.E., 1975. *A Treatise on Limnology*. 3, Wiley, London, 264-348.
- JAKOB, B. and HEBER, U., 1996. Photoproduction and Detoxification of Hydroxyl Radicals in Chloroplasts and Leaves in Relation to Photoinactivation of Photosystems I and II. *Plant Cell Physiol.*, 37:629-635.
- JAMIL, K., MADHAVENDRA, S.S., JAMIL M. and RAO, P.V.R., 1987. Studies on Water Hyacinth as a Biological Filter for Treating Contaminants from

- Agricultural Waste and Industrial Effluents. J. Environ. SCL. Health, B 22 (1): 103-112.
- Ji, C., WANG, C., and YU, S., 1990. Measurement of Cold Resistance of Aquatic Plants and Study on, its Characteristics. Acta-Ecol.- Shengtai-Xuebao. 10:249-254.
- JIMENEZ, A., HERNANDEZ, J. A., PASTORI, G. M., del RIO, L. A., and SEVILLA, F., 1997. Evidence for the Presence of the Ascorbate-Glutathione Cycle in Mitochondria and Peroxisomes of Pea Leaves. Plant Physiol.,114: 275-284.
- JOHNSON, W. R. and PROCTOR, J., 1977. A Comparative Study of Metal Levels in Plants From Two Contrasting Lead mine Sites. Plant Soil. 46: 251-257.
- KABATA-PENDIAS, A. and PENDIAS, H. 1989. Trace Elements in Soil Plants. CRC. Pres Boca Raton, FL.
- KACABOVA, P. and NART, L., 1986. Effect of Lead on Growth Characteristic and Chlorophyll Content in Barley Seedlings, Photosynthetica, 20:411-417.
- KACAR, B.,1984. Bitki Besleme. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları 899. Ankara Üniv. Basımevi, Ankara, 1-317.
- KACAR, B, ve KATKAT, A.V., 1998. Bitki Besleme, Uludağ Üniv. Yayınları, 127, s. 595.
- KAMINAKA, H., MORITA, S., TOKUMOTO, M., YOKOYAMA, H., MASUMARA, T. and TANAKA, K., 1999. Molecular Cloning and Characterization of cDNA for an Iron-Superoxide Dismutase in rice (*Oryza sativa* L.), Biosci. Biotechnol. Biochem., 63: 302-308.
- KAMPFENKEL, K., VAN MONTAGU, M. and INZE, D., 1995. Effects on Iron Excess on *Nicotiana plumbaginifolia* plants. Plant Phsiol. 107: s.725-735.
- KARPINSKI, S., REYNOLDS, H., KARPINSKA, B., WINGSLE, G., CREISSEN, G., and MULLINEAUX, P., 1999. Sistemik Signaling and Acclimation in Response to Excess Excitation Energy in Arabidopsis. Science, 284: 654-657.
- KASAPGİL, S.,1995. İş Ortamının Sağlığa Etkileri, Çevre ve İnsan, 20: 56-57.

- KHALID, F., IQBAL, M. Z., and QURESHI, M. S. 1996. Concentration of Heavy Metals Determined in Leaves and Soil from various Areas of Karachi City. *Environ. Sci.* 4: 213-219.
- KHAN, SAMIULLAH and KHAN, N. N., 1983. Influence of Lead and Cadmium on The Growth and Nutrient Concentration of Tomato (*Lycopersicum esculentum*) and egg-plant (*Solanum melongena*). *Plant and Soil.* 74: 387-394.
- KINNERSELY, A.M., 1993. The Role of Phytochelates in Plant Growth and Productivity. *Plant Growth Regulation*, 12: 207-217.
- KLAPHECK, S., 1988. Homoglutathione: Isolation, Quantification and Occurrence in Legumes. *Physiol Plant* 74: 727-732.
- KOEPPE, D.E., and MILLER, R.J., 1970. Lead Effects on Corn Mitochondrial Respiration. *Science* 167: 1376-1378.
- KOEPPE, D.E., 1977. The Uptake, Distribution, and Effect of Cadmium and Lead in Plants. *Sci. Total Environ.* 7: 197-206.
- KOSTER, W. and MERKEL, D., 1983. *Landw. Forsch-Sonderh.* 39, 225-245: (1985); *Forschungsbericht der LUFA Hameln*, s.175
- KOVACS, M., NYARY, L. and TOTH, L., 1984. The Microelement Content of Some Submerged and Floating Aquatic Plants. *Acta Bot. Hung.* 30: 173-185
- KUMAR, K.S., ROWSE, C. and HOCHSTEIN, P., 1978. Copper-Induced Generation of Superoxide in Human Red Cell Membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83: 587-592.
- KUNERT K, J. and ELDER, M., 1985. Leaf Aging and Lipid Peroxidation: The Role of the Antioxidants Vitamin C and E., *Physiol Plant* 65: 85-88.
- KUPPER, H., KUPPER, F., and SPILLER, M., 1996. Environmental Relevance of Heavy Metal- Substituted Chlorophylls Using The Example of Water Plants. *Journal of Experimental Botany.* 47: 259-266.
- LAISK, A., and EDWARDS, G.E., 1998. Oxygen and Electron Flow in C<sub>4</sub> Photosynthesis: Mehler Reaction, Photorespiration and CO<sub>2</sub> Concentration in The Bundle Sheath. *Planta*, 205: 632-645.

- LANDIS, W.G., and YU, W.H., 2004. Environmental Toxicology. CRC Pres. LLC, Boca Raton, FL. 483s.
- LANE, S. D., MARTIN, E. S., 1980. Further Observations on The Distribution of Lead in Juvenile Roots of *Raphanus sativus*. Z. Pflanzen- Physiol. 97: 145-152.
- LANE, S. D., MARTIN, E. S., and GARROD, J. P., 1978. Lead Toxicity Effect on Indole- 3- Acetic Acid- Induced Cell Elongation, Planta, 144, s. 79-84.
- LARSON, R.A. 1988. The Antioksidants of Higher Plants. Phytochemistry. 27: 969-78.
- LEE, K.C., CUNNINGHAM, B.A., CHUNG, K.H., PAULSON, G.M. and LAING, G.H., 1976. Lead Effect on Several Enzymes and Nitrogenous Compounds in Soybean Leaf. J. Environ. Qual., 357-359.
- LEE, J.S. and NEWMAN, M.E., 1997. Aquaculture-an Introduction. Agriscience and Technology Series. Interstate Publishers, Inc. Illionsis, 445-446.
- LEE, J., KOO, N. and MIN, D.B., 2004. Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 3: s.21-3.
- LEITA, L., MARCHIOL, L., MARTIN, M., and PETESSOTTI, A., 1995. Transpiration Dynamics in Cadmium Treated Soybean (*Glycine max* L.) Plants, J. Agr. Crop. Sci. Z. Acker. Pflanzen, 175.: 153-156.
- LEVAN, A.,1945. Cytological Reaction Induced by Inorganic Salt Solutions. Nature (London) 751s.
- LEWANDER, M., GREGER, M., KAUTSKY, L., SZARCK, E., 1996. Macrophytes as Indicators of Bioavailable Cd, Pb and Zn Flow in the River. Przemsza, Katowice Region. Appl. Geochem. 11: 169-173
- LEWIS, M.A., 1995. Use of Fresh Water Plants for Phytotoxicity Testing: A Review. Environ. Pollut. 87: 319-336.
- LICHTENTHALER, H. and WELLBURN, A.R., 1985. Determinationsof Total Carotenoids and Chlorophylls a and b of Leaf Extracts in Different Solvents. Biochem. Soc. Transac., 11:591-592.

- LIN-FU, J.S.1982. Children and Lead New Findings and Concerns. *New Engl. J. Med.* 307: 615-616.
- LITTLE, P., and MARTIN, M. H., 1972. A Survey of Zinc, Lead, and Cadmium in Soil and Natural Vegetation around A Smelting Complex. *Environ. Poll.* 3: 241-243.
- LIU, D. H., JIANG, W. S., WANG, W., ZHAO, F. M., LU, C., 1994. Effects of Lead on Root Growth Cell Division and Nucleolus of *Allium cepa*. *Environ. Pollut.* 86: 1-4.
- LUNA, C.M., GONZALEZ, C.A. and TRIPPI, V.S., 1994. Oxidative Damage Caused by Excess of Copper in Oat Leaves, *Plant Cell Physiol.* 35: 11-15.
- MACHELET, B. und STAIGER, K., 1983. Untersuchungen zur Verfügbarkeit von Blei im Boden für die Futtergräser. *Lolium perene* L. und *Festuca ovina* L. Proc. Mengen- v. Spurenelemente Arbeits, Karl-Marks- Univ. Leipzig, s. 101-109.
- MALECKA, A., JARMUSZKIEWICZ, W. and TOMASZEWSKA, B.,2001. Antioksidative Defense to Lead Stress in Subcellular Compartments of Pea Root Cells. *Acta Biochimica Polonica.* 48: 687-698.
- MANO, J., BABIYCHUK, E., BELLES-BOÏX, E., HIRATAKE, J., KIMURA, A., INZE, D., KUSHIR, S., and ASADA, K., 2000. A Novel NADPH: Daimide Oxidoreductase Activity in *Arabidopsis thaliana* P I  $\zeta$ -crystallin. *Eur. J. Biochem.*, 267:3661-3671.
- MATHIS, P. and KLEO, J., 1973. The Triplet State of Beta-Carotene and of Analog Polyenes of Different Length. *Photochem. Photobiol.* 18: 343-6.
- McCORD J. M. and FRÍDOVÍCH, I., 1969. Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem.* 244: 6049-55.
- McKERSIE, B. D. and LESHEM, Y. Y., 1994. Oxidative Stress. In: *Stress and Stress Coping in Cultivated Plants.* Kluwer Academic Publishers, s. 256.
- MEHLER, A.H., 1951. Studies on Reactivities of Illuminated Chloroplasts. I. Mechanism of The Reduction of Oxygen and Other Hill Reagents. *Arch. Biochem. Biophys.*, 33: 65-77.

- MIDLEN, A. and REDDING, T.A., 1998. Environmental management for Aquaculture. Chapman Hall. U.K. 223 s.
- MISHRA, A. and CHOUDHURI, M.A., 1996. Possible Implications of Heavy Metals ( $Pb^{2+}$  and  $Hg^{2+}$ ) in the Free Radical Mediated Membrane Damage in Two Rice Cultivars. Indian J. Plant Physiol. 1: 40-43.
- MISZALSKI, Z., BOTTON, B., TURNAU, K., 1996. New SOD Isoform in *rhizopogon roseolus* (Corda in Sturn) in The Presence of Cadmium. Acta Physiol. Plant. 18: 129-134.
- MIYAKA, C. and ASADA, K., 1994. Ferredoxin-Dependent Photoreduction of The Monodehydroascorbate Radical in Spinach Thylakoids. Plant Cell Physiol., 35: 539-549.
- NAKANO, Y., and ASADA, K., 1981. Spinach Chloroplasts Scavenge Hydrogen Peroxide on Illumination. Plant Cell Physiol., 21: 1295-1307.
- NEUBAUER, C. and SCHREIBER, U., 1989. Photochemical and Nonphotochemical Quenching of Chlorophyll Fluorescence Induced by Hydrogen Peroxide. Z. Naturforsch 44: 262-270
- NOVOTNY, V., 1995. Diffuse Sources of Pollution by Toxic Metals and Impact on Receiving Waters (W. SALOMONS, V.FÖRSTNER, P. MADER eds.). Heavy Metals Problems and Solutions, Springer-Verlag, Germany, s.44.
- NRIAGU, J.O., 1992. Toxic Metal Pollution in Africa. Sci. Total Environ. 121: 1-37.
- OBERLANDER, H. E., and ROTH, K., 1978. The Effect of Heavy Metal Chromium, Nickel, Copper, Zinc, Cadmium, Mercury and Lead on The Intake and Deposition of Calcium and Phosphate in Young Barley Plants. J. Plant Nutr. Manure, Soil Sci. 141: 107-116.
- OGAWA, K., KANEMATSU, S., TAKABE, K., and ASADA, K., 1995. Attachment of CuZn-Superoxide Dismutase to Thylakoid Membranes at The Site of Superoxide Generation (PSI) in Spinach Chloroplast: Detection by Immuno-Gold Labeling after Rapid Freezing and Substitution Method. Plant Cell Physiol., 36: 565-573.

- OUTRIDGE, P.M. and NOLLER, B.N., 1991. Accumulation of Toxic Trace Elements by Freshwater Vascular Plants, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 121: 1-63.
- ÖZBEK, H., KAYA, Z., TAMCI, M., 1984. Bitki Beslemesi ve Metabolizması. Çukurova Üniv. Ziraat Fak. Yay. 489-490.
- ÖZBEK, H., KAYA, Z., GÖK, M. ve KAPLAN, H. 1995. Toprak Bilimi. Ziraat Fakültesi Genel Yayın No: 73. Adana, 816.
- PARKER, C.A. and JOYCE, T.A., 1967. Delayed Fluorescence and some Properties of the Chlorophyll Triplets. *Photochem. Photobiol.*, 6:395.
- PATEL, G., 1967. Die Qualitative Bestimmung von Blei in Pflanzen Nach Kolorimerischen und Spektra Chemischen Verfahren Sowie Untersuchungen über den Bleigehalt von Pflanzen an Verkehrsreichen Standorten. Dissertation der Landwirtschaftl. Fakultät der Justus-Liebig- Universität, Gießen.
- PATRA, J. and PANDA, B. B., 1998. A Comparison of Biochemical Responses to Oxidative and Metal Stress in Seedlings of Barley, *Hordeum vulgare* L., *Environ. Pollut.* 101: 99-105.
- PERL-TREVES, R. and PERL, A., 2002. Molecular Oxygen and Its Reactive Derivates. (D. INZE and M. VAN MONTAGU Eds.) *Oxidative Stress in Plants*. Taylor & Francis Inc., London, 1-31.
- POLLE, A., 2001. Dissecting the Superoxide Dismutase, Ascorbate Peroxidase, Glutathione Pathway in Chloroplast by Metabolic Modelling. *Computer Simulations as a Step Towards Flux Analysis. Plant Physiol.* 126:445-462.
- PRASAD, K. V. S. K., PARADHA SARADHI, P. and SHARMILA, P., 1999. Concerted Action of Antioxidant Enzymes and Curtailed Growth under Zinc Toxicity in *Brassica juncea*. *Environmental and Experimental Botany*, 42:1-10.
- PRASSAD, D.D.K. and PRASSAD, A.R.K., 1987. Altered  $\delta$ - Amino laevulinic Acid Metabolism by Lead and mercury in Germinating Seedlings of Bajra (*Penis typhoideum*), *J. Plant Physiol.*, 127: 241-249.

- PRZYMUSINSKI, R., SPYCHALA, M. and GWOZDZ, E.A., 1991. Inorganic Lead Changes Growth and Polypeptide Pattern of Lupin Roots. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 187: 51-57.
- RAMEL, C., 1973. The Effect of Metal Compounds on Chromosome Segregation. *Mut. Res.* 21: 45-46.
- RASKIN, I., KUMAR, P.B.A.N., DUSHENKOV, S. and SALT, D.E., 1994. Bioconcentration of Heavy Metals by Plants. *Current Opinion in Biotechnology* 5: 285-290
- REDDY, G. N., 1992. Cadmium Induced Biochemical Changes in *Scenedesmus quadricauda* and *Oryza sativa*. Ph. D. Thesis Submitted to the University of Hyderabad, Hyderabad (India).
- REDINBAUGH, M.G., WADSWORTH, G.J. and SCANDALIOS, J.G., 1988. Characterization of Catalase Transcripts and their Differential Expression in Maise. *Biochim. Biophys. Acta*, 951: 104-116.
- ROBSON, A.D. and REUTER, D.J., 1981. Diagnosis of Copper Deficiency and Toxicity. In: J.F. LONERAGAN (Ed.), *Copper in Soils and Plants*. Academic Press, Sydney, Australia. 313-350.
- ROMHELD, V., 1991. The Role of Phytosiderophores in Acquisition of Iron and Other Micronutrients in Graminaceous Species. An Ecological Approach. *Plant and Soil*. 130: 127-134.
- RUCINSKA, R., WAPLAK, S. and GWOZD, E.A., 1999. Free Radical Formation and Activity of Antioxidant Enzymes in Lupin Roots Exposed to Lead. *Plant Physiol. Biochem.* 37(3):187-194.
- RYAN, J., 1976. Proceeding of National Conference on Disposal of Residuals on Land. St. Louis, MO, September.
- SALT, D.E., BLAYLOCK, M., KUMAR, N.P.B.A., DUSHENKOV, V., ENSLEY, B.D., CHET, I. and RASKIN, I., 1995. Phytoremediation: A Novel Strategy for The Removal of Toxic Metals from The Environment Using Plants. *Biotechnology*, 13: 468-474.
- SANDMANN, G. and BÖGER, P., 1980. Copper-Mediated Lipid Peroxidation Processes in Photosynthetic Membrans. *Plant Physiol.*, 66: 797-800.

- SAUERBECK, D., 1983. Landw. Forsch. Sonderh, 39: 108-129.
- SAYGIDEĞER, S., 1996. Su Bitkileri (Hidrobotanik). Ç.Ü. Yayınları, Adana, 229s.
- SCANDALIOS, J.G., 1990. Response of Plant Antioxidant Defence Genes to Environmental Stres, Adv. Genet. 28:1-41
- SCANDALIOS, J.G., 1993. Oxygen Stres and Superoxide Dismutases. Plant Physiol. 101:7-12.
- SCANDALIOS, J.G., GUAN, L. and POLIDOROS, A.N. 1997. Catalases in Plants: Gene Structure, Properties, Regulation and Expression. In J.G. Scandalios, (ed.), Oxidative Stres and He Molecular Biology of Antioxidant Defenses, (Monograph Series, Vol. 34), Cold Spring Harbor Laboratory Pres, Cold Spring Harbor, s. 343-406.
- SCHAT, H., SHARMA, S.S. and VOOIJS, R., 1997. Heavy Metal Induced Accumulation of Free Proline in a Metal-Tolerant and a Non-Tolerant Ecotype of *Silene vulgaris*, Physiol. Plant., 107: 477-482.
- SEÇMEN, Ö., GEMİCİ, Y., GÖRK, G., BEKAT, L., LEBLEBİCİ, E., 1995. Tohumlu Bitkiler Sistematığı. Ege Üniv. Fen Fak. Kitap Serisi. İzmir, s.431.
- SEREGIN, I.V. and IVANOV, V.B., 2001. Physiological aspects of Cadmium and Lead Toxic Effects on Higher Plants. Russian Journal of Plant Physiology, 48 (4): 523-544.
- SETTLE, D.M. and PATTERSON, C.C., 1980. Lead in *Albacore* : Guide to Lead Pollution in American, Science, 207, s. 1167-1176.
- SINGH, R.P., TRIPATHI, R.D., SINHA, S.K., MAHESHWARI, R. and SRIVASTAVA, H.S., 1997. Response of Higher Plants to Lead Contaminated Environment. Chemosphere, 34: 2467-2493.
- SMIRNOFF, N., 1993. The role of Active Oxygen in the Response of Plants to Water Deficit and Desiccation. New Phytol., 125: 27-58.
- SOMASHEKARAIHAH, B. V., PADMAJA, K. and PRASAD, A. R. K., 1992. Phytotoxicity of Cadmium Ions on Germinating Seedlings of Mung Bean (*Phaseolus vulgaris*): Involvement of Lipid Peroxides in Chlorophyll Degradation. Physiol. Plant 85: 85-89.

- SONOIKE, K. ,1996. Photoinhibition of Photosystem I: Its Physiological Significance in The Chilling Sensitivity of Plants. *Plant Cell Physiol.*, 37: 239-247.
- SPERRAZZA, J.M. and SPREMULLÌ, L.L., 1983. Quantitation of Cation Binding to Wheat Germ Ribosomes: Influences on Subunit Association Equilibria and Ribosome Activity. *Nucleic Acids Res.* 11: 2665-2679.
- SRIVASTAVA, A, and JAISWAL, V. S., 1990. Biochemical Changes in Duck Weed after cadmium Treatment, *Water, Air, Soil Pollut.*, 50:163-170.
- ST-CYR, L., CAMPBELL, G.C. and GUERTIN, K., 1994. Evaluation of The Role of Submerged Plant Beds in The Metal Budget of A Fluvial Lake. *Hydrobiologia.* 291: 141-156.
- STEPHAN, U.W. and SCHOLZ, G., 1993. Nicotianamine: Mediator of Transport of Iron and Heavy Metals in The Phloem. *Physiol. Plant.* 88: 522-529.
- STERN, K.R., 1994. *Introductory Plant Biology.* Wm. C. Brown Publishers, England, 521s.
- TABAN, S. ve ALPASLAN, M., 1996. Mısır Bitkisinin Çinko, Demir, Bakır, Mangan ve Klorofil Kapsamı Üzerine Çinko Gübrelemesinin Etkisi. *Mühendislik Bilimleri Dergisi.* 3(3):457-466.
- TAKAGI, S., KAMEI, S. and YU, MING-HO, 1988. Efficiency of Iron Extraction from Soil by Mugineic Acid Family Phytosidero-Phores. *J. Plant Nutrition* 11: 643-651.
- TERRY, N. and ABADIA, J., 1986. Function of Iron in Chloroplasts. *J. Plant Nutr.* 9:609-646.
- THOMSON, J.E., LEGGE, R.L., and BARBER, R.F., 1987. The role of Free Radicals in Senescence and Wounding. *New Phytol. S.* 317-344.
- THURMAN, D.A., 1981. Mechanism of Metal Tolerance in Higher Plants. In: *Effect of Heavy Metal Pollution on Plants.* LEPP, N:V: (Ed.) Applied Science Publishers, London, England, 239-249.
- TUREKIAN, K.K., 1969. *Distribution of Elements in the Hydrosphere.* Year book of Science and Technology. McGraw Hill. New York.

- VAN ASSCHE, F., and CLIJSTERS, H., 1990. Effect of Metals on Enzyme Activity in Plants. *Plant Cell Environ.* 13: 195-206.
- VAN CAMP, W., VAN MONTAGU, M., and INZE, D., 1994. Superoxide Dismutases. In: FOYER, C.H. and MULLINEAUX, P.M. (Eds.), *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*, CRC Press, BocaRaton, 317-341.
- VASS, I. and STYRING, S., 1993. Characterization of Chlorophyll Triplet Promoting States in Photosystem II Sequentially Induced During Photoinhibition. *Biochemistry*, 32: 3334-3341.
- VASSILEV, A., YORDANOV, I., and TSONEV, T., 1997. Effects of Cd<sup>2+</sup> on the Physiological State and Photosynthetic Activity of Young Barley Plants, *Photosynthetica*, 34, s. 293- 302.
- VERMA, S. And DUBEY, R. S., 2003. Lead Toxicity Induces Lipid Peroxidation and Alters the Activities of Antioxidant Enzymes in Growing Rice Plants. *Plant Science* 1-11.
- VODNIK, D., JENTSCHKE, G., FRITZ, E., GOGALA, N., and GODBOLD, D.L., 1999. Root-Applied Cytokinin Reduces Lead Uptake and Affects Its Distribution in Norway Spruce Seedlings, *Physiol. Plant.*, 106: 75-81.
- VOLK. S. and FEIERABEND, J., 1989. Photoinactivation of Catalase at Low Temperature and its Relevance to Photosynthetic and Peroxide Metabolism in Leaves. *Plant Cell Environ.*, 12:701-712.
- WECKX, J. E. J. and CLIJSTERS, H. M. M., 1997. Zn Phytotoxicity Induces Oxidative Stress in Primary Leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol. Biochem.* 35: 405-410.
- WIERZBIĆKA, M., 1988. Mitotic Disturbances Induced by Low Doses of Inorganic Lead. *Caryologia* 41: 143-160.
- WOODBURY, W., SPENCER, A. K., STAHPMAN, M. A. 1971. An Improved Procedure Using Ferricyanide for Detecting Catalase Isozymes. *Anal. Biochem.* 44: 301-305.
- WOOLHOUSE, H.W., 1983. Toxicity and Tolerance in Responses to Metals. In: O.L. LANGE, P.S. NOBEL, C.B. OSMOND, H. ZIEGLER, (Eds.).

Physiological Plant Ecology III. Responses to The Chemical and Biological Environment. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 284-285.

YAMADA, T., 1975. Calcium and its Relationship to Blossom-end Rot in Tomato  
Comm. Soil Sci. Plant Analysis. 6:273-284.

YU, M. H., 1991. Effects of Lead, Copper, Zinc, and Cadmium on Growth and Soluble Sugars in Germinating Mung Bean Seeds. Abstracts of the 12th Annual Meeting of The Society of Environmental Toxicology and Chemistry. Seattle, WA, s. 169.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1960 yılında Adana'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Adana'da tamamladım. 1990 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü kazandım. 1994 yılında Biyoloji Bölümü'nden mezun oldum. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladım. 1998 yılında yüksek lisansımı tamamladım ve aynı yıl Biyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimime başladım. Halen Milli Eğitim Bakanlığına bağlı bir eğitim kurumunda öğretmenliğe devam etmekteyim.