

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇİNKO AĞIR METALİNİN *SCENEDESMUS ELLIPSOIDEUS*
CHODAT ALGİNİN GELİŞİMİ VE ANTİOKSİDAN ENZİMLERİN
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hediye Elif KILIÇ

Enstitü Anabilim Dalı	:	BİYOLOJİ
Tez Danışmanı	:	Doç. Dr. Tuğba ONGUN SEVİNDİK
Ortak Danışman	:	Yrd. Doç. Dr. Ali DOĞRU

Temmuz 2017

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇİNKO AĞIR METALİNİN SCENEDESMUS ELLIPSOIDEUS
CHODAT ALGİNİN GELİŞİMİ VE ANTİOKSİDAN ENZİMLERİN
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

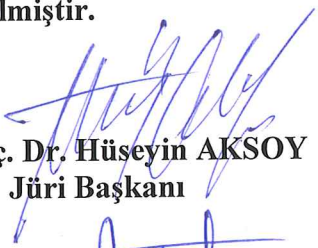
Hediye Elif KILIÇ

Enstitü Anabilim Dalı

:

BİYOLOJİ

Bu tez 21.07.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.


Doç. Dr. Hüseyin AKSOY
Jüri Başkanı


Doç. Dr. Şule BARAN
Üye


Yrd. Doç. Dr. Ali DOĞRU
Üye


Doç. Dr. Tuğba ONGUN
SEVİNDİK
Üye


Yrd. Doç. Dr. Arzu MORKOYUNLU
YÜCE
Üye

BEYAN

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

Hediye Elif KILIÇ

21.07.2017

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine her danıştığım da bana zaman ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle elinden gelenden fazlasını sunan her sorun yaşadığım da yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. Tuğba ONGUN SEVİNDİK'e, çalışmamın hazırlanma sürecinin her aşamasında değerli bilgilerini ve zamanını benden esirgemeyen, çalışmalarım da karşılaşılan problemlerin çözümünde ve sonuçların değerlendirilmesinde önemli katkıları olan sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Ali DOĞRU'ya, ayrıca çalışmamın uygulama aşamalarında yardımlarını esirgemeyen sayın Arş. Gör. Hatice TUNCA'ya, tez yazım aşamasında yardımlarını benden esirgemeyen canım kardeşim Aliye YILMAZ'a ve diğer bölüm hocalarıma, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim pek çok konuda fikrini aldığım değerli hocalarımla Doç. Dr. Mehmet SAĞIROĞLU ve Doç. Dr. Hüseyin AKSOY'a teşekkürlerimi sunarım.

Manevi desteklerinden güç aldığım sevgili anne ve babama, hayatımda oldukları için kendimi şanslı saydığım eşime, çocuklarıma ve benden yardımını esirgemeyen arkadaşlarıma yürekten saygı ve sevgilerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ	viii
ÖZET	ix
SUMMARY	x

BÖLÜM 1.

GİRİŞ	1
1.1. Ağır Metaller	2
1.1.1. Çinko (Zn).....	3
1.1.2. Çinkonun kullanım alanları.....	4
1.1.3. Çinkonun canlılar üzerindeki etkisi.....	5
1.2. Ağır Metallerin Çevreye Etkileri.....	6
1.3. Ağır Metallerin Sucul Ekosistem Üzerindeki Etkileri.....	7
1.4. Ağır Metallerin Algler Üzerindeki Etkileri	7
1.4.1. Alglerde ağır metal toksisitesini ve alımını etkileyen çevresel faktörler.....	10
1.4.2. Alglerin ağır metallere karşı tolerans mekanizmaları	12
1.5. Serbest Radikaller (Oksidanlar)	13
1.5.1. Serbest radikal türleri	15
1.6. Antioksidan Savunma Sistemleri	17
1.6.1. Doğal (endojen) antioksidanlar	17
1.7. Scenedesmus'un Sistematikteki Yeri ve Genel Özellikleri	19
1.7.1. Scenedesmus ellipsoideus Chodat.....	20

1.8. Kaynak Özetleri.....	21
1.9. Çalışmanın Amacı	26

BÖLÜM 2.

MATERYAL VE METOD.....	27
2.1. Çalışma Materyali	27
2.2. Kullanılan Cihazlar	27
2.3. Yöntem	28
2.3.1. Hücre kültürünün hazırlanması	28
2.3.2. Uygulanan ağır metal çözeltileri	29
2.3.3. Deney ortamı ve düzeneği.....	29
2.4. Ölçüm ve Analizler.....	30
2.4.1. Optik yoğunluğun (OD) belirlenmesi	30
2.4.2. Fotosentetik pigment analizi (klorofil-a).....	30
2.4.3. Toplam çözümlü protein analizi.....	30
2.4.4. Toplam süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi.....	31
2.4.5. Süperoksit dismutaz izozimlerinin aktivitesi	31
2.4.6. Toplam glutatyon redüktaz (GR) aktivitesi	31
2.4.7. Toplam askorbat peroksidaz (APOD) aktivitesi.....	32
2.4.8. İstatistiksel analizler.....	32

BÖLÜM 3.

BULGULAR	33
3.1. Biyokütle	33
3.2. Fotosentetik Pigment Analizi (Klorofil-a).....	34
3.3. Toplam Süperoksit Dismutaz Aktivitesi.....	35
3.4. Süperoksit Dismutaz İzozimlerinin Aktivitesi	36
3.4.1. MnSOD aktivitesi.....	36
3.4.2. FeSOD aktivitesi	37
3.4.3. CuZnSOD aktivitesi	38
3.5. Toplam Askorbat Peroksidaz Aktivitesi	39

3.6. Toplam Glutatyon Reduktaz Aktivitesi	40
BÖLÜM 4.	
TARTIŞMA	42
BÖLÜM 5.	
SONUÇ VE ÖNERİLER	47
5.1. Sonuç	47
5.2. Öneriler.....	47
KAYNAKLAR.....	48
ÖZGEÇMİŞ	58

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ADP	: Adenozin difosfat
Ag	: Gümüş
Al	: Alüminyum
APOD	: Askorbat peroksidaz
ATP	: Adenozin trifosfat
Au	: Altın
Bi	: Bizmut
Br	: Brom
Ca	: Kalsiyum
Cd	: Kadmiyum
CH ₃ Hg ⁺	: Metil civa
cm, m	: Santimetre, metre
Co	: Kobalt
CO ₂	: Karbondioksit
Cr	: Krom
CrO ₄ ⁻²	: Krom oksit
Cs	: Sezyum
Cu	: Bakır
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
Fe	: Demir
Fr	: Fransiyum
Ga	: Galyum
Ge	: Germanyum
GPX	: Glutatyon peroksidaz
GR	: Glutatyon redüktaz

GSH	: Glutasyon
GST	: Glutasyon transferaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
Hg	: Civa
K	: Potasyum
KAT	: Katalaz
L	: Litre
mg	: Miligram
mmol	: Milimol
Mn	: Mangan
NADPH	: Nikotiamid adenine dinökleotit fosfat
Ni	: Nikel
O ₂ ⁻	: Süperoksit radikali
OH ⁻	: Hidroksil radikali
Pb	: Kurşun
pH	: [H ⁺] iyonu konsantrasyonunun kologaritması
PO ₄ ⁻³	: Fosfat
ppm	: Toplam madde miktarının milyonda birlik kısmı
Pt	: Platin
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SH	: Sülfidril grubu
Sc	: Skandiyum
Si	: Silisyum
Sn	: Kalay
SOD	: Süperoksit dismutaz
Zn	: Çinko
ZnCrO ₄	: Çinko kromat
%	: Yüzdelik ifadesi
°C	: Derece santigrad
µg	: Mikrogram

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Scenedesmus ellipsoideus Chodat (SALIM01) (Bar 10 µ).....	27
Şekil 3.1.	S. ellipsoideus'da farklı çinko konsantrasyonlarının biyokütlenin günlük değişimi üzerine etkisi	34
Şekil 3.2.	S. ellipsoideus'da farklı çinko konsantrasyonlarının klorofil-a miktarının günlük değişimi üzerine etkisi	35
Şekil 3.3.	Farklı çinko konsantrasyonlarının S. ellipsoideus'da toplam SOD aktivitesi üzerine etkisi.....	36
Şekil 3.4.	Farklı çinko konsantrasyonlarının S. ellipsoideus'da MnSOD aktivitesi üzerine etkisi.....	37
Şekil 3.5.	Farklı çinko konsantrasyonlarının S. ellipsoideus'da FeSOD aktivitesi üzerine etkisi.....	38
Şekil 3.6.	Farklı çinko konsantrasyonlarının S. ellipsoideus'da CuZnSOD aktivitesi üzerine etkisi.....	39
Şekil 3.7.	Farklı çinko konsantrasyonlarının S. ellipsoideus'da APOD aktivitesi üzerine etkisi.....	40
Şekil 3.8.	Farklı çinko konsantrasyonlarının S. ellipsoideus'da GR aktivitesi üzerine etkisi	41

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Önemli ağır metallerin ekolojik olarak sınıflandırılması	3
Tablo 1.2. Çinko ve çinko içeren bazı bileşiklerin özellikleri.....	4
Tablo 1.3. Bazı çinko bileşiklerinin kullanım alanları	5
Tablo 2.1. Kullanılan cihazlar	28
Tablo 2.2. BG11 ortamı içeriği.....	28
Tablo 2.3. BG 11 konsantre stok solüsyonu içeriği.....	28
Tablo 2.4. A5 stok solüsyonu içeriği.....	29

ÖZET

Anahtar Kelimeler: *Scenedesmus ellipsoideus* Chodat, klorofil-*a*, biyomas, ağır metaller, çinko, antioksidan enzimler, SOD, APOD, GR

Bu çalışmada, *Scenedesmus ellipsoideus* algi üzerinde farklı çinko (Zn) konsantrasyonlarının (0, 1, 2, 4, 6 ve 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$) etkisi, bazı büyüme ve fizyolojik parametreleri ölçülerek araştırılmıştır. Bu amaçla, biyokütledeki ve klorofil *a* içeriğindeki değişimler 7 gün boyunca günlük olarak ölçülmüştür. Deney süresi boyunca 750 nm'de ölçülen biyokütle değerleri, her bir Zn konsantrasyonunda zamana bağlı olarak düzenli artış göstermiştir. Bununla birlikte, Zn konsantrasyonu arttıkça muhtemelen *S. ellipsoideus* alginin hücre bölünme mekanizmasında görülen hasar sonucu biyokütle değerlerinde azalma görülmüştür. Benzer şekilde, Zn konsantrasyonu arttıkça klorofil *a* içeriği azalmıştır. 7 gün boyunca düzensiz değişimler gösteren bu parametre *S. ellipsoideus* alginin, fotosentetik pigment metabolizması üzerinde Zn metalinin şiddetli etkisine işaret etmektedir. Zn toksisitesi altında *S. ellipsoideus* alginin metabolik savunma yanıtlarının etkinliği, bazı antioksidan enzimlerdeki değişimlerin belirlenmesi yoluyla incelenmiştir. Buna göre toplam süperoksit dismutaz (SOD), mangan süperoksit dismutaz (MnSOD), demir süperoksit dismutaz (FeSOD), aktiviteleri 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Zn ya kadar artmış ve daha sonra azalmıştır. Bu sonuçlar, 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Zn konsantrasyonundan yüksek konsantrasyonların MnSOD ve FeSOD gibi SOD izozimlerini inhibe ettiğini ve *S. ellipsoideus* hücrelerinde süperoksit birikimi ile sonuçlandığını göstermektedir. SOD aktivitesine uygun olarak toplam askorbat peroksidaz (APOD), aktivitesi 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Zn konsantrasyonundan yüksek konsantrasyonlarda hafifçe artmış ve 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Zn konsantrasyonunda azalmıştır. Bu sonuç, yüksek Zn konsantrasyonlarının *S. ellipsoideus* hücrelerinde hidrojen peroksit birikimine yol açtığını açıkça göstermektedir. Bununla birlikte, uygulanan tüm Zn konsantrasyonlarında glutatyon redüktaz (GR) aktivitesi önemli değişiklikler göstermemiştir.

Sonuç olarak, daha yüksek Zn konsantrasyonlarının *S. ellipsoideus* hücrelerinde süperoksit radikal ve hidrojen peroksit birikimi ile sonuçlandığı sonucuna varılabilir. Ayrıca, bu zararlı bileşiklerin klorofil *a* moleküllerinde fotooksidasyonu sağladığı ve büyüme oranını azalttığı söylenebilir. Son olarak, Zn toksisitesi altında sabit GR aktivitesinin belirttiği üzere indirgenmiş glutatyon birikiminin olmaması, antioksidan savunma sisteminin düşük etkinliğinden sorumlu olabilir.

EFFECTS OF ZINC TO THE GROWTH AND ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITY OF *SCENEDESMUS ELLIPSOIDEUS* CHODAT

SUMMARY

Keywords: *Scenedesmus ellipsoideus* Chodat, chlorophyll-*a*, biomass, heavy metals, zinc, antioxidant enzymes, SOD, APX, GR

In this study, the effect of different (Zn) zinc concentrations (0, 1, 2, 4, 6 and 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$) on *Scenedesmus ellipsoideus* was investigated through some growth and physiological parameters. For this purposes, changes in the biomass accumulation and chlorophyll *a* content were measured daily during the experiment (7 days). Our results showed that biomass accumulation, measured at 750 nm, represents a progressive increase in a time dependent manner at each Zn concentration during the experiment. Increased Zn concentrations, however, resulted in the decreased biomass values probably due to an impairment in cell division mechanism in *S. ellipsoideus*. Similarly, chlorophyll *a* content was decreased as the Zn concentration increased while this parameter showed irregular changes during 7 days, which may indicate a severe effect of Zn on photosynthetic pigment metabolism in *S. ellipsoideus*. The efficiency of metabolic defence responses of *S. ellipsoideus* under Zn toxicity was evaluated by the changes in some antioxidant enzymes. Accordingly, total superoxide dismutase (SOD), manganese superoxide dismutase (MnSOD), iron superoxide dismutase (FeSOD), activities increased up to 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Zn and then decreased. These results may show that Zn concentrations higher than 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ inhibited SOD izozymes such as MnSOD and FeSOD and resulted in superoxide accumulation in *S. ellipsoideus* cells. In accordance to SOD activity, total ascorbate peroxidase (APX), activity increased slightly at Zn concentration higher than 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and decreased at 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Zn concentration. This result clearly indicated that higher Zn concentrations led to hydrogen peroxide accumulation in *S. ellipsoideus* cells. Glutathione reductase, (GR) activity, however, did not show significant changes at all applied Zn concentrations.

As a result, it may be concluded that higher Zn concentrations result in superoxide radical and hydrogen peroxide accumulation in *S. ellipsoideus* cells. Further, these harmful compounds may lead to photooxidaiton in chlorophyll *a* molecules and decrease growth rate. Finally, the absence of reduced glutathione accumulation, as indicated by constant GR activity under Zn toxicity, may be responsible for the lower efficiency of antioxidant defence system.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

İnsanoğlu yeryüzünde yaşamaya başladığı ilk günden bu yana sürekli çevre ile etkileşim içinde bulunmuştur. Bu etkileşim insanoğlunun çevreyi bilinçsiz bir şekilde kullanmasıyla çeşitli sorunları da beraberinde getirmiştir.

Hızlı nüfus artışına bağlı olarak ortaya çıkan sanayileşme ile birlikte yeni kimyasal bileşiklerin üretimi ve bu bileşiklerin sürekli kullanılmasından dolayı ekosisteme binlerce kirletici katılmaktadır. Bu kimyasal bileşikler hem organik hem de inorganik kimyasalları kapsamaktadır. Fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı, organik kimyasalların çoğu ekosistemde bol miktarda ve sürekli bulunmaktadır. İnorganik kimyasallardan olan metaller ise endüstriyel ve evsel kullanıma bağlı olarak çevre sorunları yaratmaktadır (Sofyan, 2004). Bu kimyasal kirleticilerden olan ağır metalleri diğer kimyasal kirleticilerden ayıran en önemli fark; çevre koşullarına dayanıklı olmaları, biyolojik sistemler üzerinde etkili olmaları ve kolaylıkla besin zincirine dâhil olarak canlı dokularında birikim gösterebilmeleridir (Baş ve Demet, 1992).

Doğada metal kirliliğine yol açan çok çeşitli faktörlerden bahsedilebilir (Li, 1981; Goyer ve ark., 1989). Depremler, volkanik patlamalar ve seller gibi doğal faktörlerin yanı sıra, endüstriyel, kentsel, tarımsal ve ulaşım gibi antropojenik faktörler metal kirliliğini oluşturan faktörler arasında sayılabilir (Yıldız, 2004). Ekolojik sistemdeki ağır metal kirliliği doğal faktörlerden çok antropojenik kaynaklı olarak gerçekleşmektedir. Kullanıma bağlı kirlenmenin yanında kazalar sonucunda da ağır metallerin çevreye yayılımı önemli miktarlara ulaşabilmektedir. Örneğin, 1979 yılında Lengrich'teki çimento tesisinde meydana gelen talyum (Tl) sızıntısı önemli bir çevre kirliliğine yol açmıştır. Yıllık olarak doğal faktörler sonucu 7600 ton kadmiyum (Cd), 3600 ton civa (Hg) ve 332000 ton kurşun (Pb) atmosfere atılmakta iken; antropojenik kaynaklı ağır metal kirliliğinin, Cd için 8 kat, Hg, Pb ve Sn için 6 kat,

arsenik (As), nikel (Ni) ve krom için (Cr) 3 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (Rether, 2002).

Şehir merkezlerinde kanalizasyon çıkışlarının bulunduğu alanlarda ağır metal kirliliği yüksektir (Wickfors ve Ukeles, 1982; Rebhun ve Amotz, 1984) fakat endüstriyel alanlara yakın bölgelerde daha da yükselir (Cotté-Krief ve ark., 2000; Bu-Olayan ve ark., 2001, Eser ve Volpe, 2002). Ağır metaller hava, su ve diğer etkenlerle gıda zincirine girerek canlıların yapısına alınmaktadır (Lauwerys ve ark., 1993). Bunun sonucunda hem insan ve hayvan sağlığı hem de tarımsal ürün miktarı ve kalitesi üzerinde olumsuz bir unsur oluşturmaktadır (Korentajar, 1991; Chen ve ark., 2001). Canlı bünyesine alınan ağır metaller, metabolizma üzerindeki toksik etkilerini değişik yollarla gösterebilmektedir. Örneğin, proteinlerle etkileşime girerek onların enzimatik ve yapısal fonksiyonlarını değiştirip inhibe edebilmekte, temel elementlerin yerini alarak toksik etki gösterebilmektedir (Bremner, 1974).

1.1. Ağır Metaller

Genel olarak zehirli ve çevre kirliliğine neden olan tüm metaller ağır metal olarak adlandırılmakla birlikte ağır metal terimi fiziksel olarak yoğunluğu 5 g cm^{-3} 'den daha yüksek olan metaller için kullanılır. Bu gruba kurşun (Pb), kadmiyum (Cd), krom (Cr), demir (Fe), kobalt (Co), bakır (Cu), nikel (Ni), civa (Hg) ve çinko (Zn) olmak üzere 60'tan fazla metal dahil edilebilir (Tablo 1.1.). Metallerin ekolojik sistem üzerine etkisi, metalin ait olduğu grubun özelliğinin vurgulanması biyolojik etki açısından çok daha anlamlıdır (Kahvecioğlu ve ark., 2004).

Tablo 1.1. Önemli ağır metallerin ekolojik olarak sınıflandırılması, K: kirletici, G: gerekli (Yıldız, 2004).

Element	Özgül ağırlık (g cm ⁻³)	Canlılar için gereklilik	Kirletici olup olmadığı
Gümüş (Ag)	10,5	-	K
Kadmiyum (Cd)	8,5	-	K
Krom (Cr)	7,2	G	K
Kobalt (Co)	8,9	G	K
Bakır (Cu)	8,9	G	K
Demir (Fe)	7,9	G	K
Civa (Hg)	13,6	-	K
Mangan (Mn)	7,4	G	-
Kurşun (Pb)	11,3	-	K
Molibden (Mo)	10,2	G	K
Nikel (Ni)	8,9	G	K
Platin (Pt)	21,5	-	-
Talyum (Tl)	11,9	-	K
Kalay (Sn)	7,3	-	K
Uranyum (U)	19,1	G	K
Tungsten (W)	19,3	G	K
Çinko (Zn)	7,1	G	K

Metaller doğada bulunur ve bazı metaller küresel ekosistemlerin birer parçasıdır. Bakır ve çinko gibi metaller yaşam için gereklidir. Yüksek yoğunluklarda zehirli olmalarına rağmen, fotosentetik elektron taşıma reaksiyonlarında anahtar rol oynayan moleküllerin parçasıdır ve çoğu enzimin aktivitesi için gerekli mikro besin elementleridir (Raven ve ark., 1999). Ancak kurşun ve civa gibi diğer metallerin canlılar için faydalı bir biyokimyasal fonksiyon yerine getirip getirmediği bilinmemektedir (Allan, 1997).

1.1.1. Çinko (Zn)

Hava, toprak ve suyun yanı sıra, tüm besin maddelerinin yapısında da bulunduğu bilinmektedir. Çinko miktarı havada 300 ng m⁻³, toprakta 10-300 mg kg⁻¹, yüzey sularında ise genellikle 50 µg L⁻¹'nin altında olup, maden kaynaklarına yakın bölgelerde 50 mg L⁻¹ ya da daha yüksek konsantrasyonlarda çinkoya rastlanabilmektedir (Barceloux, 1999; WHO, 2001). Tatlı sulardaki miktarı 0.1-50 µg L⁻¹, deniz suyundaki miktarı ise 0.002-0.1 µg L⁻¹'dir (WHO, 2001). Çinko metali doğada serbest olarak bulunmaz. Bunun yerine çinko sülfür (sfalerit), çinko karbonat (smitsonit) ve çinko oksit (zinkit) gibi değişik mineraller şeklinde +2 değerlikli olarak bulunur. Yeryüzünde çinko içeren 55 mineralin var olduğu bilinmektedir (WHO,

2001; ATSDR, 2005; US EPA, 2005). Çinko ve çinko içeren bileşiklerin bazı kimyasal ve fiziksel özellikleri Tablo 1.2.'de verilmiştir.

Doğadaki çinko kirliliğinin temel antropojenik kaynağı, metal eriticilerden ve madencilik etkinlikleridir. Pirinç, bronz, alaşımlar ve boyalarda çinkonun kullanımı ve üretimi ile farklı atık kaynakları çinkonun çevrede serbest kalmasına yol açar (US EPA, 2005). Bu aktiviteler atmosferdeki çinko düzeyini de artırmaktadır (ATSDR, 2005). US EPA'nın Ulusal Öncülük Listesi'nde (NPL) yer verilen 1662 tehlikeli atık bölgesinin en azından 985'inde çinkonun da mevcut olduğu belirlenmiştir (US EPA, 2005).

Tablo 1.2. Çinko ve çinko içeren bazı bileşiklerin özellikleri (Barceloux, 1999b; ATSDR, 2005).

	Çinko	Çinko oksit	Çinko klorür	Çinko sülfat	Çinko sülfür
Moleküler formülü	Zn	ZnO	ZnCl ₂	ZnSO ₄	ZnS
Moleküler ağırlığı (g mol ⁻¹)	65,38	81,38	136,29	161,44	97,44
Erime noktası (°C)	419,5	100	283	600	~1700
Kaynama noktası (°C)	908	Veri yok	732	Veri yok	Veri yok
Suda çözünürlüğü (g L ⁻¹ , 25 °C'de)	-	~2x10 ⁻³	4,3x10 ³	1,7x10 ³	~7x10 ⁻³
Yoğunluğu (g cm ⁻³)	7,14	5,607	2,907	3,54	~4,1

1.1.2. Çinkonun kullanım alanları

Çinko; demir, alüminyum ve bakırdan sonra dünyada en çok kullanılan dördüncü metaldir. Metalik çinko, endüstrinin birçok alanında kullanım alanına sahiptir. Çinko en yaygın olarak, aşınma ve korozyona karşı demir ve çelik gibi metallerin kaplamasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Metalik çinko diğer metaller ile pirinç ve bronz gibi alaşımlar oluşturabilir. Çinko ve bakır içeren alaşımlar (% 97.6 çinko ve % 2.4 bakır) para yapımında kullanılmaktadır (Barceloux, 1999; ATSDR, 2005).

Çinko tuzları içinde en geniş uygulama alanına sahip olan çinko oksittir ve vulkanizasyon (kükürtle sertleştirme) etkinleştiricisi ve hızlandırıcısı olarak kauçuk endüstrisinde kullanılmaktadır. Çinko oksit bakteriyel ve fungal bozulmaları engellemek için halı elyaflarına eklenerek endüstriyel koruyucu olarak da kullanılmaktadır (US EPA, 1992). Çinko klorür, çinko sülfat, çinko oksit ve çinko

sülfat; kozmetik, diş, medikal ve evsel alanlarda geniş uygulama alanlarına sahiptir (ATSDR, 2005). Çinko bileşiklerinin uygulama alanları Tablo 1.3.'de gösterilmiştir.

Tablo 1.3. Bazı çinko bileşiklerinin kullanım alanları (Barceloux, 1999).

Çinko Bileşikleri	Kullanım Alanları
Çinko asetat	Ağaç koruyucu, mordan, cila ve ayraç olarak
Çinko karbonat	Pigment, besin desteği, porselen üretimi, çömlekçilik ve kauçuk sanayii
Çinko klorür	Deodorant, dezenfektan, ağaç koruyucu, ısıya dayanıklı malzeme yapımı, kuru pil, diş tozu
Çinko kromat (IV) hidroksit	Boya, yağ, vernik, muşamba, kauçuk yapımında pigment olarak
Çinko glukonat	Genel soğutucular için önerilen uygulamalarda
Çinko oksit	Pigment, çimento, cam tekerlek, kibrit, beyaz mürekkep, ayraç, fotoğraf kağıdı ve fungusit olarak
Çinko fosfür	Rodentisit (kemirgen öldürücü) olarak
Çinko stearat	Tablet ve kauçuk üretimi, kozmetik ve eczacılık tozlarında, merhem olarak
Çinko sülfat	Mordan, ağaç koruyucu olarak

1.1.3. Çinkonun canlılar üzerindeki etkisi

Çinko birçok fizyolojik olaya katıldığından tüm canlılar için temel mikro besin elementidir. Çinko, canlı için katalitik işlevlere katılma, yapısal kararlılığı koruma ve enzimlerin yapısına katılma olmak üzere 3 temel işlev sergilemektedir. Plazma zarının kararlılığının korunmasında, DNA ve RNA sentezinde, hormon reseptörlerinde ve alkalın fosfataz, alkol dehidrojenaz, CuZn-süperoksit dismutaz, karboksipeptidaz, δ -aminolevulinik asit dehidrataz, karbonik anhidraz, DNA polimeraz (DNA polimeraz alfa, DNA polimeraz III) ve ters (reverse) transkriptazı içine alan 300'den fazla enzimin aktivasyonu için gerekli bir elementtir (WHO, 2001; US EPA, 2005).

Diğer metaller gibi belirli konsantrasyonun üzerine çıktığı zaman canlılar için toksik etki yapmaktadır. Türler göre EC50 değerleri, bitkiler ve fitoplankton için 0.058-10 mg L⁻¹ arasındadır. Çinkonun toksisite derecesi dış ortamdaki konsantrasyonuna, çinkonun çökmesine, suyun pH ve sertliğine göre değişir (WHO, 2001).

Çinko alglerde de birçok metabolik fonksiyonun gerçekleşmesi için gereklidir. Ana fonksiyonları arasında CO₂ taşınmasında ve fiksasyonunda görevli olan karbonik anhidraz enziminin yapısında bulunması da vardır (Morel ve ark., 1994). Çeşitli

sebeplerden dolayı alglerin aldığı CO₂ miktarı kısıtlandığı zaman karbonik anhidraz enzimine daha fazla gereksinim duyulur. Çinko alglerde ayrıca DNA'nın transkripsiyonu için gerekli olan çinko parmak (zinc finger) proteinlerinin ve organik moleküllerdeki fosfat gruplarını koparan alkalın fosfatazın yapısında bulunur (Price ve Morel, 1990; Morel ve ark., 1994; Sunda ve Huntsman, 1995). Birçok mikro besin elementi gibi çinkonun da yüksek konsantrasyonları algler için toksiktir (Brand ve ark., 1986; Sunda ve Huntsman, 1992). Uygun konsantrasyonlarda algler iyi gelişirken, düşük konsantrasyonlarda alg büyümesi kısıtlanmakta ve yüksek konsantrasyonlarda ise inhibe olmaktadır.

1.2. Ağır Metallerin Çevreye Etkileri

Ağır metaller genellikle antropojenik faaliyetlerin yoğun olarak gerçekleştirildiği ortamlarda çevresel kirleticiler olarak kabul edilmektedir (Aksu, 2005; Mehta ve Gaur, 2005). Ağır metal cevherlerinin işlenmeye başlanmasından bu yana metaller antropolojik faaliyetler sonucu olarak doğal döngüler dışında atmosfere, hidrosfere ve pedosfere yayılmaya başlamıştır. Ağır metallerin çevreye yayılmasına neden olan faktörlerin başında endüstriyel faaliyetler, motorlu taşıtların egzost emisyonları, maden yatakları ve işletmeleri, volkanik faaliyetler, tarımda kullanılan gübre ve ilaçlar ile kentsel atıklar gelmektedir (Stresty ve Madhava Rao, 1999). Sürekli ve kullanıma bağlı kirlenmenin yanı sıra kazalar da ağır metallerin doğal ortamlardaki miktarının artmasına yol açmaktadır. Bunun sonucu olarak metal kontaminasyonu dünya genelinde önemli bir çevre sorunu oluşturmaktadır (Çetinkaya ve ark., 1999) ve kirletici faktörlerin birikmesi ile birlikte çevre kirliliği artmakta ve bazı ekosistemlerin geri dönüşümsüz olarak bozulduğu görülmektedir (Veglio ve ark., 1997).

Metaller canlı dokularına deriden geçerek veya doğrudan beslenme yoluyla sindirim sistemine alınarak katılırlar. Canlı dokularına alınan bu metallerin biyolojik birikimi her organ ve dokuda farklıdır (Francesconi ve ark., 1999). Doğal çevrede bulunan canlılar uzun süreli periyotlarda düşük dozlarda, kirleticilerin yoğun etkisi altında bulunan ortamlardaki canlılar ise daha kısa bir zaman dilimi içinde yüksek dozlarda

kirleticiye maruz kalmaktadır (Pinto ve ark., 2003). Bu nedenle toprak, su ve atmosfer vasıtasıyla besin zincirine karışmış metaller yüzünden, gelecekte insan sağlığının ciddi bir tehdit altında olacağı ön görülmektedir (Sandau ve ark., 1996).

1.3. Ağır Metallerin Sucul Ekosistem Üzerindeki Etkileri

Su, taşıyıcı ve çözücü özellikleri dolayısıyla, çevreye verilen kimyasalların yayılmasını ve besin zincirine geçişini kolaylaştırmaktadır. Dolayısıyla, ağır metaller de dahil birçok kimyasal madde öncelikle sucul ekosistemlerde birikerek yüksek konsantrasyonlara ulaşmaktadır (Kennish, 1998). Doğada kirliliğe yol açan organik kökenli bileşikler kimyasal ve biyolojik yollarla temizlenebilirken, aynı şeyi kirliliğe neden olan metaller için söylemek olanaksızdır (Rainbow, P.S., 1995).

Diğer ekosistemlerde olduğu gibi sucul ekosistemlerde de ağır metal kontaminasyonu çevresel sorunların en önemli sebeplerinden birisidir. Sucul ortamlara dahil olan kirleticiler konsantrasyonlarına bağlı olarak organizmalarda doku hasarlarına sebep olurken bazen bu canlıların ölümüne de sebebiyet vermektedirler (Atamanalp ve Yanık, 2001). Bu kirlenme besin zincirine de yansımakta, su ve besinler ile bünyeye alınan ağır metaller dokularda birikerek yaşamsal aktivitelere zarar verebilmektedir (Hu, 2000; Taylan ve Özkoç, 2007; Kayhan ve ark., 2009).

1.4. Ağır Metallerin Algler Üzerindeki Etkileri

Algler fotosentez yapabilmelerine rağmen gerçek anlamda kök, gövde ve yaprak gibi organlardan yoksun olan, iletim demetleri bulunmayan, genellikle su içinde yaşamakla birlikte karasal ortamlarda da görülebilen, büyüklükleri birkaç mikron ile 60-65 metre arasında değişen ve yaklaşık 25 bin türü olan klorofilli canlılardır. Tatlı ve tuzlu sularda ya da nemli yerlerde yaşar. Bazı türleri, kaplıca sularında yaşar ve 70 °C'ye kadar sıcaklığa dayanabilir. Özellikle tek hücreli olanlar sucul ortamlarda serbest olarak yaşar ve bitkisel planktonları meydana getirir. Sucul ekosistemde primer üretici olan algler, fitoplanktonik organizmalar, fotosentez yoluyla kendi besinini üreterek

besin zincirinin ilk halkasını oluşturmaktadır. Böylelikle su ortamındaki hem besin değerini hem de çözünmüş oksijen oranının artmasını sağlamaktadırlar. Bu şekilde üretime katkı sağlarken ve üst basamaktaki canlılarla olan ilişkileri açısından önem taşımaktadır (Round, 1973).

Algler tarafından ağır metal iyonlarının hücre içine alınımı, metalin iyonik yüküne, alg türüne, metal çözeltisinin kimyasal kompozisyonuna ve metal türlerine bağlı olarak değişmektedir (Holan ve Volesky, 1994; Aksu, 1998; Gupta ve ark., 2001; Sing ve ark., 2001). Ayrıca ışık, pH, sıcaklık ve şelatlayıcı ajanlar gibi fizikokimyasal faktörler de alglerde ağır metallerin hücre içine alınımını etkilemektedir (Depledge ve ark., 1995; Phillips, 1995). Ağır metallerin alım kapasiteleri türden türe göre değişiklik göstermekte olup, bu kapasite tatlı su algleri için $0.5-1.0 \text{ mmol g}^{-1}$ ve deniz algleri için $1-1.5 \text{ mmol g}^{-1}$ aralığındadır (Yu ve ark., 1998).

Alglerde hücreye metal alınımı iki şekilde gerçekleşmektedir. Bunlardan birincisi hücre duvarına ya da hücre zarına bağlanarak ya da adsorpsiyonla hızlı bir şekilde metabolizmadan bağımsız olarak gerçekleştirilen alım mekanizmasıdır. İkincisi ise daha yavaş gerçekleşen ve hücre zarındaki taşıyıcı proteinlerle gerçekleşen metabolizmaya bağımlı alımdır (Rai ve ark., 1981; Cho ve ark., 1994; Collard ve Matagne, 1994).

Biyosorpsiyon da denilen metabolizmadan bağımsız olan mekanizmada metallerin alınımı hücre duvarı bileşenleri tarafından gerçekleştirilmektedir. İnorganik kimyasallar hücre duvarı ya da hücre zarında birikir. Alglerde metalin biyosorpsiyonu genellikle hızlı, geri dönüşümlü ve yaklaşık 5-10 dakikada tamamlanan bir olaydır (Gadd, 1988; Zhang ve Majidi, 1994). Biyosorpsiyon düşük sıcaklıktan, ışıktan, metabolik inhibitörlerden etkilenmeden gerçekleşir (Garnham ve ark., 1992). Ölü veya metabolik olarak inaktive olmuş alg hücreleri biyosorpsiyonun gücünün belirlenmesi amacıyla çeşitli çalışmalarda kullanılmaktadır. Metaller hücre duvarı bileşenleri olan polisakkaritlerin, proteinlerin ve lipidlerin sahip olduğu hidroksil (OH), fosforil (PO_3O_2), amino (NH_2), karboksil (COOH), sülfidril (SH) ve tiol gibi spesifik fonksiyonel gruplara bağlanır. Bu fonksiyonel gruplar metalleri bağlamada farklı

affinite ve özgülüğe sahiptir (Rai ve ark., 1981; Ting ve ark., 1991). Bunun yanında, hücre duvarının yapısında bulunan proteinler, aktif bölgeler oluşturmakta ve metale karşı affinitelerini artırmaktadırlar. Yüzey alınımlar mekanizmasında bazı algler, hücre yüzeyinde bulunan ve yüksek moleküler ağırlıklı polifosfatlara benzeyen grupları ile metallerle kompleks oluşturarak metali bağlayabilmektedir (Greger ve ark., 1992; Walsh ve Hunter, 1992). Ayrıca canlıdaki metal stresinin hücre duvarının yüzey alanını artırarak metal bağlama kapasitesini de artırdığı gözlenmiştir (Rijstenbil ve ark., 1994).

Metabolizmaya bağımlı mekanizma ise bağımsız mekanizmaya göre daha yavaş gerçekleşir. Saatler hatta günler sürebildiği gibi bu evre düşük sıcaklıktan, ışık gibi enerji kaynaklarının yokluğundan, hücrenin sağlıklı olup olmamasından ve metabolik inhibitörlerin ortamda olmasından etkilenmektedir (Gadd, 1988; Garnham ve ark., 1992). Bu mekanizmanın en önemli özelliği hücrenin metal stresine bağlı olarak zarar geçirgenliğinin artması sonucu pasif difüzyonla gerçekleşmesidir. Bazı metaller ise hücre zarındaki taşıyıcı proteinleri kullanmaktadır (Gadd, 1988).

Hücre içine alınan metal iyonları ise metal bağlayıcı proteinlere veya diğer hücre içi bölgelere bağlanmakta ya da çökelmektedir (Gadd, 1988; Dönmez ve Aksu, 2002). Metallerin bazıları da polifosfat granüllerinde, hücre içi metal bağlayıcı proteinlerde veya vakuollerin içinde detoksifiye edilmektedir (Gadd, 1988, Garnham ve ark., 1992; Zhang ve Majidi, 1994). Metal birikimi hücresel yapıyı tahrip edebilmektedir (Puisseux-Dao, 1989). İnorganik kimyasalların ortamda bulunması hücre içi bileşiklerin dağılımını da değiştirebilmektedir (Okamura ve Aoyama, 1994).

Büyüme ve metabolizma için gerekli olan besleyici metaller de dahil tüm metaller, yüksek konsantrasyonlarda alglerin metabolik sistemleri üzerinde toksik etki yapmaktadır (Rai ve ark., 1981). Her ağır metalin toksisite mekanizması farklılık gösterebilir. Metaller; enzimler, polinükleotidler, besin elementleri ve iyonların transport sistemleri gibi önemli molekül ve sistemlerin fonksiyonel gruplarını bloke ederek, bazı moleküllerin yapısındaki gerekli iyonları çıkartarak ya da onlarla yer değiştirerek, esas metabolitlerle rekabet ederek, enzimleri denatüre veya inaktive

ederek, hücre ve organellerin zar bütünlüğünü bozarak toksik etkilerini göstermektedir (Rai ve ark., 1981; Blanck ve ark., 1984; Blanck ve Wangberg, 1988). Her ağır metalin toksisitesi, belirli bir alg türüne ve o algin özelleşmiş olan alımın bölgelerine bağlı olarak farklılık göstermektedir (Break ve ark., 1980). Örneğin, alüminyum (Al) stresi *Anabaena cylindrica*'da azot metabolizmasını inhibe ederek algin daha çok heterosist üretmesine neden olmaktadır (Rai ve ark., 1992). Bir alg için stres kaynağı olan bir metal diğer alg için besin elementi olabilir. Örneğin, selenyumun (Se) diğer alg türleri için toksik etkiye sahip konsantrasyonu *Chlamydomonas*'ta enzimlerin aktivitesini indüklemektedir (Takeda ve ark., 1993).

Ayrıca metaller, serbest radikal oluşumuna neden olarak da toksik etkilerini göstermektedir. Hücrede oluşan bu radikaller amino asitler, proteinler, karbohidratlar, nükleik asitler ve lipidlerle reaksiyona girerek zarar vermektedir (Mallick, 2004). Serbest radikal miktarındaki artış, en büyük zararı hücre zarına vermektedir. Çünkü serbest radikaller hücre zarının elektronlarıyla eşleşip; zarın seçici geçirgen özelliğinde bozulmaya sebebiyet vermektedir. Bakır ve civa gibi ağır metaller organizmalarda oksidatif strese neden olan metallere bazılarıdır (Boening 2000; Wang ve ark., 2004; Zhou ve ark., 2008).

1.4.1. Alglerde ağır metal toksisitesini ve alımını etkileyen çevresel faktörler

1.4.1.1. Karbondioksit ve pH

Alglerle yapılan çalışmalarda CO₂ eksikliği durumunda ortamın pH değerinin yükseldiği ve bu nedenle büyüme hızının azaldığı ortaya çıkarılmıştır. Ph değerindeki değişim direkt olarak metal çözünürlüğünü etkilemekte ve pH'da CO₂ konsantrasyonundan etkilenmektedir (Campbell ve Stokes, 1985). pH değerinin değişmesi metaller üzerinde farklı etkiler oluşturmaktadır. Örneğin; pH düşerse kadmiyum, bakır ve çinko daha az toksik, kurşun ise daha toksik etki göstermektedir (Campbell ve Stokes, 1985). Alüminyum toksik etkisini en fazla pH 5.8-6.2 arasında göstermektedir (Helliwell ve ark., 1983; Parent ve Campbell, 1994). Gümüş ve

manganez toksisitesi için ortamın pH değeri daha az etkili iken, civanın toksisitesi ortam pH'sından daha fazla etkilenmektedir.

1.4.1.2. Su sertliği

Kalsiyum, magnezyum ve manganez gibi metallerin yüksek konsantrasyonları, birçok metalin toksisitesini, bu metallerin alglerin hücre zarından geçişini engelleyerek azaltmaktadır. Hücre yüzeyindeki bağlanma bölgeleri için yarışarak ya da kalsiyum ve magnezyumun karbonat, bikarbonat ve hidroksitlerle yaptıkları bileşiklere bağlanarak ağır metaller tutulmaktadır (Pawlik ve Skowronski, 1994). Örneğin *Synechocystis aquatilis*'te kalsiyum konsantrasyonunun kültür ortamında yüksek olması, kadmiyumun hücre içine alınımını inhibe etmektedir (Pawlik ve Skowronski, 1994).

1.4.1.3. Tuzluluk

Algler için normal tuzluluk değerlerinin dışındaki diğer değerler metal toksisitesini artırabilmektedir. Tuz konsantrasyonu metalin adsorpsiyonu ve alım hızını etkileyebildiği gibi, ortamdaki yüksek elektrolit konsantrasyonu da ağır metallerin hücre çeperine adsorpsiyonunu azaltabilmektedir (Cho ve ark., 1994).

1.4.1.4. Besin tuzları

Ortofosfat ($\text{PO}_4\text{-P}$) konsantrasyonu alglerde direkt olarak metal toksisitesini etkileyen faktörlerdendir (Rai ve ark., 1981). Hücre dışındaki yüksek $\text{PO}_4\text{-P}$ konsantrasyonu, hücre dışı çözeltideki demir ve alüminyum gibi metallerle çökelek oluşturarak ya da hücre içinde polifosfat granülleri oluşturarak metal stresini azaltmaktadır (Greger ve ark., 1992). Düşük $\text{PO}_4\text{-P}$ konsantrasyonu ise alüminyum stresini arttırmaktadır (Nalewajko ve Paul, 1985). *Chlorella*'da düşük $\text{PO}_4\text{-P}$ konsantrasyonunun bakır alımını ve toksisitesini arttırdığı bulunmuştur (Hall ve ark., 1989). Azotlu bileşiklerin de toksisiteyi etkilediğine yönelik çalışmalar vardır (Gupta, 1989). *Microcystis*'te nitratın ($\text{NO}_3\text{-N}$) metal toksisitesini azaltmasına rağmen, nitrit ($\text{NO}_2\text{-N}$) ve amonyumun ($\text{NH}_4\text{-N}$) yüksek konsantrasyonlarının bakır stresini artırdığı

bulunmuştur (Gupta, 1989). *Aphanocapsa*'da Yüksek NO₃-N konsantrasyonunun bakır, kadmiyum ve çinko alınımını azalttığı belirlenmiştir (Subramanian ve ark., 1994).

1.4.1.5. Şelatörler ve humik maddeler

Amino asitler, organik maddeler, humik maddeler, fulvik asit, EDTA ve diğer organik bileşikler metalleri bağlayarak toksisiteyi azaltabilmektedir (Rai ve ark., 1981).

1.4.1.6. Sıcaklık

Yapılan çalışmalar düşük sıcaklıkların metabolizmaya bağımlı alımın mekanizmasını inhibe ederek metal stresini azatlığını göstermektedir (Skowronski, 1986; Pawlik ve Skowronski, 1994). *Chlamydomonas reinhardtii*'de 4 °C sıcaklıkta kadmiyum alınımında azalma görülmüş ve bunun nedeninin sıcaklık nedeniyle metabolizmaya bağımlı mekanizmanın inhibisyonu olduğu düşünülmüştür (Collard ve Matagne, 1994).

1.4.1.7. Işık yoğunluğu

Işık yoğunluğunun metal toksisitesini nasıl etkilediğine yönelik çok az bilgi vardır. Özellikle yoğun alg kitlesinin kültür ortamındaki alglerin ışık alması bakımından neden olduğu heterojenite, toksisite testlerinde bazı hataların yapılmasına neden olmaktadır (Nyholm ve Kallqvist, 1989). *Aphanocapsa pulchra*'da metabolizmaya bağımlı alımın mekanizmasında karanlığın metal alınımını inhibe edebileceği bildirilmiştir (Subramanian ve ark., 1994).

1.4.2. Alglerin ağır metallere karşı tolerans mekanizmaları

Algler hücresel seviyede ağır metal stresini; hücre yüzeylerinde bulunan bağlanma bölgelerinin sayısını azaltarak, sıcaklıktaki değişime göre metabolizmaya bağımlı alınımı inhibe ederek, salgı mekanizmalarını fizyolojik olarak geliştirerek,

morfolojilerini değiştirerek, hücre içi detoksifikasyon mekanizmalarını kullanarak, hücre içi vakuollerde metalleri depo ederek ya da metallerin hücre içindeki konsantrasyonlarını çok düşük seviyede tutarak tolere edebilmektedir (Rai ve ark.,1981; Wood ve Wang, 1985). Ayrıca algler, hayat döngülerini yavaşlatarak ya da hızlandırarak veya üreme organlarında değişiklikler yaparak genetik toleransları sayesinde metal stresine cevap oluşturabilmektedir (Sze, 1986; Xylander ve Braune, 1994). Bunun yanında algler birçok çevresel stres faktörüne karşı antioksidan enzimlerini kullanmakta ve ağır metallerin zararlı etkilerine karşı bir savunma geliştirerek metalin zararlı etkilerini tolere edebilmektedir (Smirnoff, 1993). Çevresel bir stres faktörü olan metallerin toksisitesine karşı alglerin cevap olarak süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon reduktaz (GR), askorbat peroksidaz (APOD) gibi antioksidan enzimlerinin yanı sıra, karetonoidler ve glutatyon gibi düşük molekül ağırlıklı antioksidan moleküllerini kullandığı da bilinmektedir (Pinto ve ark., 2003). Yani alglerde metal toksisitesi nedeniyle oluşan reaktif oksijen türleri, antioksidan enzimler ve moleküller tarafından etkisiz hale getirilmektedir.

Tolerans mekanizması tek bir inorganik stres faktörüne duyarlı olabileceği gibi birden çok inorganik stress faktörüne de duyarlı olabilir. Her bir stress faktörüne gösterilen tolerans mekanizması farklılık gösterebilmektedir. Kotolerans durumunda ise bazı algler herhangi bir kimyasala karşı geliştirdikleri tolerans sayesinde başka bir kimyasala karşı da toleranslı duruma gelebilmektedir (Klerks ve Weis, 1987).

1.5. Serbest Radikaller (Oksidanlar)

Moleküllerin bir çoğu çift elektronlu olup, az sayıdaki molekül ise tek elektronludur. Atom veya moleküller, yörüngelerindeki elektronlar eşleşmiş ve ters pozisyonda yer aldıklarında kararlı bir yapı gösterirken, bu kararlı yapıları eşleşmemiş bir elektron bulundurduklarında bozulur (Di Mascio ve ark., 1991; Fırat, 1997). Eşleşmemiş elektronlu olan bu moleküller, bulabilecekleri herhangi bir molekül ile etkileşime girme kapasitesine sahipler. Eşleşmemiş elektronlu bu moleküllere "serbest radikaller", "oksidan moleküller" ya da "reaktif oksijen türleri" denir (Halliwell ve

Chirico, 1993). Kısaca serbest radikaller; atomik veya moleküler yörüngesinde bir veya daha fazla sayıda eşleşmemiş “elektron” bulunduran molekül, atom veya iyonudur (Yanbeyi, 1999). Serbest radikaller eşleşmemiş elektronlarından dolayı oldukça reaktif olup, çevrelerindeki atom ve moleküllere bağlanma eğilimindedirler. Ortamda bulunma süreleri çok kısa oldukları halde, radikal olmayan maddeler ile reaksiyona girip bir dizi zincir reaksiyonu başlatarak, onlarında radikal olmasına sebep olurlar. Sonuç olarak etkilenen maddenin biyolojik önemine ve bu maddenin geri dönüşümlü tamir edilip edilmemesine bağlı olarak hücre içinde kalıcı hasarlar oluşturabilmektedirler (Cross, 1987). Ağır metaller ile birlikte kuraklık, yüksek ve düşük sıcaklık, mekanik yaralanma, UV ışık, fotoinhibisyona yol açan çeşitli stres faktörlerinin serbest radikal oluşumuna neden olduğu bilinmektedir (Bray ve ark., 2000; Öncel ve ark., 2000). Serbest radikaller organizmada hücre zarı proteinlerini yıkararak, hücreleri öldürerek, lipit ve proteinlerini yok ederek, hücre zarını sertleştirip hücre fonksiyonunu engelleyerek, deoksiribonükleik asite (DNA) etki ederek, DNA da kırılma ve mutasyon oluşumunu açık hale getirerek etkisini göstermektedir (Akkuş, 1995; Dünder ve Aslan, 2000; Anwasha ve ark., 2012).

Serbest radikaller üç temel mekanizma ile oluşur:

1. Kovalent Bağların Homolitik Kırılması: Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık kimyasal bağların kırılmasına dolayısıyla bu esnada bağın yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa, bu tür kırılmalara homolitik kırılma denir ve her iki atom üzerinde de paylaşılmamış elektron kalır.
2. Normal Bir Molekülün Elektron Kaybetmesi: Radikal özelliği olmayan bir molekülün elektron kaybetmesi sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektronu oluyorsa bu molekülün radikal formu oluşur. Örneğin askorbik asit, glutatyon gibi hücresel antioksidanlar, radikal olan türlere tek elektron verip radikalleri redüklerken, kendilerinin de radikal formu oluşur.
3. Normal Bir Moleküle Elektron Transferi: Radikal özelliği olmayan bir moleküle tek elektron transferi sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron meydana gelirse bu tür redüklenme radikal oluşumuna neden olabilir. Örneğin moleküler

oksijenin tek elektron alarak redüklenmesi, süperoksit radikalının oluşumuna neden olur. Biyolojik sistemler de serbest radikallerin oluşumu daha çok elektron transferleri sonucunda meydana gelir (Hurst ve ark., 1997; Jornot ve ark., 1998; Mills ve ark., 1998).

1.5.1. Serbest radikal türleri

1.5.1.1. Serbest oksijen radikalleri

Biyolojik sistemlerde oluşan en önemli serbest radikaller, oksijenin oluşturduğu radikallerdir. Günlük yaşamımızda oksijen molekülü bizim için çok önemli bir molekül olmasına rağmen reaktif oksijen türlerini oluşturmasından ve canlı metabolizmasına verdikleri zarardan dolayı organizmaya zarar vermektedir. Çünkü reaktif oksijen türleri (ROS) hücre metabolizmasına zarar verebilecek reaksiyonları başlatabilmektedir. ROS, başta bitkiler olmak üzere pek çok fotosentetik canlı için hücresel zararın nedeni olarak görülmektedir (Cho ve Park, 2000; Cargnelutti ve ark., 2006; Chen ve ark., 2009).

1.5.1.2. Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$)

Oksijenli solunum yapan neredeyse tüm hücrelerde oksijenin bir elektron alarak redüklenmesi sonucu bu hücrelerde süperoksit radikali meydana gelmektedir (Denklem 1.1). Süperoksit radikali, orta derecede reaktif olan bir moleküldür. Dokulardaki yarı ömrü yaklaşık olarak 2-4 μs 'dir. Biyolojik membranları geçemeyerek hızlı bir şekilde hidrojen perokside dönüştürülür. Süperoksit radikali, süper oksit dismutaz (SOD) enzimi ile reaksiyona girerek etkisi detoksifiye edilmektedir (Halliwell ve ark., 1992).



1.5.1.3. Hidrojen peroksit (H₂O₂)

Moleküler oksijenin, diğer moleküllerden iki elektron alması veya süperoksitin bir elektron alması sonucu peroksit molekülü oluşmaktadır (Denklem 1.2). Peroksit molekülü de iki hidrojen atomuyla birleşerek hidrojen peroksiti (H₂O₂) meydana getirmektedir. Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksitin asıl oluşumu, süperoksitin dismutasyonu ile olmaktadır (Halliwell ve ark., 1992). Hidrojen peroksit, süperoksit radikali gibi orta derecede reaktiviteye sahip bir moleküldür. Fakat farklı olarak dokulardaki yarı ömrü daha uzun (yaklaşık 1 ms) olmakla birlikte oluştuğu yerden diffüzyonla başka bölgelere hareket edebilmektedir (Vranova ve ark., 2003). Hidrojen peroksit demir, bakır ve mangan gibi bazı geçiş metallerinin katalizörlüğünde “Haber-Weiss” veya “Fenton” reaksiyonu yoluyla oldukça reaktif olan hidroksil radikalini de oluşturabilmektedir.



1.5.1.4. Hidroksil radikali (OH•)

Hidroksil radikali, hidrojen peroksitin bazı geçiş metallerinin varlığında redüklenmesiyle meydana gelmektedir (Denklem 1.3). Oldukça reaktif bir oksidan moleküldür ve yarı ömrü çok kısadır. Oluştugu yerde büyük hücresel hasarlara neden olmaktadır. Tioller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak yeni radikallerin oluşmasına yol açmaktadır (Halliwell ve ark., 1992). Bununla beraber biyolojik sistemlerde hidroksil radikalini etkisiz hale getirebilecek herhangi bir enzimatik mekanizma bulunmadığı için bu molekülün dokulardaki aşırı birikimi hücre ölümüne neden olmaktadır (Vranova ve ark., 2003).



1.6. Antioksidan Savunma Sistemleri

Aktif oksijen türlerinin oluşumunu, bu moleküllerin oluşturduğu hücresel hasarı önlemek için biyolojik sistemlerde birçok savunma mekanizması gelişmiştir. Bu sistemler, “antioksidan savunma sistemleri” veya “antioksidanlar” olarak bilinir. Antioksidan parametreler artan ROT sebebiyle tetiklenen protein, lipid ve DNA hasarını engellemektedir (Romero ve ark., 2011).

Antioksidanların serbest radikalleri etkisiz hale getirme yollarından birincisi, süpürme etkisi olarak bilinir. Bu mekanizma ile serbest radikaller daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürülerek etkisizleştirilir. Antioksidan enzimler ve makromoleküller bu yolla etki etmektedirler. Bu konuda etkili olan ikinci mekanizma ise söndürme etkisidir ve serbest radikallere bir hidrojen aktararak bunların detoksifiye edilmesini sağlar. Vitaminler, flavanoidler, timetazidin ve mannitol bu şekilde etki etmektedir. Onarma mekanizmasında ise serbest radikaller nedeniyle hasar görmüş olan biyomoleküller onarılır.

Antioksidanlar, endojen (doğal) ve eksojen (ilaçlar) kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabilirdiği gibi, enzimatik ve enzimatik olmayanlar şeklinde de sınıflandırılır. Hücrelerin farklı kısımlarında bulunabilir (Akkuş, 1995).

1.6.1. Doğal (endojen) antioksidanlar

Reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerini önlemek için, alg hücreleri son derece kompleks enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemlerine sahiptirler. Bu bileşenler redoks tepkimeleri için gerekli homeostasinin yeniden oluşturulmasını sağlarlar (Sharma, 2015).

1.6.1.1. Enzimatik antioksidanlar

Düzgün çalışan bir metabolizmada antioksidanlar, sitozoldaki organelleri oksidanların zararlı etkilerinden korumaktadır. Bu sistemin yetersiz kaldığı durumlarda ise doğal enzimler devreye girmektedirler. Süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GPX) ve glutatyon redüktaz (GR) hücrelerde bulunan en önemli antioksidan enzimlerdir (Hilmi, 1994). SOD, süperoksit radikallerinden hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijen (O_2) oluşturan reaksiyonu katalizlemektedir (Valentine ve ark., 1998). Ökaryotik fotosentetik organizmalarda SOD'un 3 izozimi bulunur. Cu-ZnSOD yüksek bitkilerin, belirli dinoflagellatların ve Charophyceae sınıfı yeşil alglerin tilakoid zarlarında ve sitozolde, MnSOD mitokondride, FeSOD kloroplastın stromasında bulunur. FeSOD kloroplastlarda, MnSOD ise mitokondrilerde süperoksit radikalının detoksifikasyonundan sorumludur (Asada, 1999). Prokaryotik olan mavi yeşil alglerde ise SOD'un 4 izoformu bulunur: NiSOD az gelişmiş türlerde bulunurken, FeSOD ve MnSOD daha gelişmiş formlarda bulunur. Alglerde NiSOD ya tek başına ya da FeSOD ile birlikte bulunur. Bazı alg türlerinde ise FeSOD ve MnSOD bulunur. Mavi yeşil alglerde ise Cu-ZnSOD nadir olarak bulunmaktadır (Priya ve ark., 2007). Katalaz, hidrojen peroksitten su (H_2O) ve oksijen (O_2) oluşturan reaksiyonu katalizlemektedir (Zamocky ve ark., 2008). Glutatyon redüktaz ise glutatyon peroksidaz vasıtasıyla hidrojen peroksitin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutatyonu (GSSG), NADPH kullanılarak tekrar redükte glutatyona (GSH) dönüştürmektedir. (Urso ve Clarkson, 2003). Glutatyon redüktaz miktar olarak en fazla mitokondride bulunsun da sitozol ve diğer plastidlerde de mevcuttur (Sharma, 2015). Bu enzim nerdeyse bütün organizmalarda oksidatif strese karşı savunmada önemli rol oynamaktadır (Pinto, 2003). Askorbat peroksidaz, kloroplastlarda katalaz enzimi bulunmadığı için buradaki H_2O_2 'yi temizleyen ana enzim olarak görev yapmaktadır. Ayrıca askorbat peroksidaz kloroplastlar dışında mitokondri, sitozol, peroksizom ve apoplastta da bulunmaktadır (Asada, 2006). Birçok çevresel stres faktörünün reaktif oksijen türlerinin üretimini etkilediği ve oksidatif strese neden olduğu iyi bilinmektedir (Smirnoff, 1993).

Antioksidan enzimler reaktif oksijen türlerini zararsız hale getirerek bunların hücre zarındaki lipitleri etkileyerek lipid peroksidasyonuna neden olmasını engellemektedir. Bununla birlikte enzimler ya da diğer antioksidan moleküller tarafından etkisiz hale getirilemeyen oksidanlar, hücre zarındaki lipitleri etkileyerek lipid peroksidasyonunu başlatmaktadır. Lipid peroksidasyonu, zarlarda bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest oksijen radikalleri tarafından çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur ve sonuçta ortaya çıkan aldehitler hücre hasarına neden olmaktadır (Benzer ve Ozan, 2003). Malondialdahit (MDA), lipid peroksidasyonunda son üründür ve oksidatif hasarın düzeyini göstermede kullanılmaktadır (Urso ve Clarkson, 2003). Bunun yanı sıra artan MDA konsantrasyonu mikroorganizmadaki serbest radikal üretim kapasitesinin arttığını gösterir (Choudhary ve ark., 2007).

1.6.1.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar

Enzimatik olmayan antioksidanlar lipit fazda bulunanlar ve sıvı fazda bulunanlar olarak iki gruba ayrılabilir. Lipit fazda bulunanlara α -tokoferol (E vitamini) ve β -karoten, sıvı fazda bulunanlara askorbik asit, ve glutatyon örnek olarak verilebilir (Dalkavriyan, 2011).

1.7. *Scenedesmus*'un Sistematikteki Yeri ve Genel Özellikleri

Çalışmada kullanılan *Scenedesmus* türünün sistematikteki yeri aşağıda verilmiştir (Komarek ve Fott, 1983).

Şube : Chlorophyta
 Sınıf : Chlorophyceae
 Takım : Chlorococcales
 Aile : Scenedesmaceae
 Cins : *Scenedesmus*
 Türü : *Scenedesmus ellipsoideus* Chodat

Yeşil alg olarak isimlendirilen Chlorophyta türleri çoğunlukla tatlı sularda dağılım göstermektedir. Ancak sadece % 10'luk kısmı denizlerde yaşamaktadır. Tatlısu türlerinin yalnızca birkaç türü endemik olup, büyük çoğunluğu kozmopolittir (Simmons, 1997). Kloroplast pigmentlerinin yüksek bitkilerin pigmentlerine benzediği, klorofil-*a* ve klorofil-*b*'nin yanı sıra, karotenoidlerden β -karoten, γ -karoten, likopen ve luteine de sahip oldukları belirtilmektedir (Altuner, 1994; Güner ve Aysel, 1996).

Scenedesmus cinsinde her hücrede bir kromotofor, bir pirenoid ve bir çekirdek bulunmaktadır. Göz noktası ve kamçı yoktur. Üremelerinde koloni içerisindeki her hücre koloni hücre sayısı kadar bölünerek kendine benzer sayıda koloniler oluşturur. Çeperin patlaması ile bunlar serbest hale geçerler. Bu alglerde hücre bölünmesi ya da otoporla üreme çok yaygındır (Güner ve Aysel, 1996). Hücreler genellikle koloni oluşturur. Kolonideki hücre sayısı genellikle 2, 4 ya da 8, bazen 16 ya da 32'dir (Smith, 1950; Prescott, 1973). Fakat belirli koşullar altında tek hücreli formları gelişebilmektedir. Bunların genel görünüşü mekik biçimindedir (Güner ve Aysel, 1996). Hücre şekilleri (uzunca, iğsi, küresel, üçgensel ve yamuğa benzer) ve düzenleri büyük farklılık gösterir (Prescott, 1973). Türlerle göre sayısı, yeri ve şekli değişen boynuz benzer çıkıntıları vardır (Güner ve Aysel, 1996). *Scenedesmus* cinsi hızlı gelişebilmesinden dolayı ilk kültürü yapılan alglerden birisidir. Çevresel koşullara uyumu ve yetiştiriciliği kolay olduğundan endüstriyel amaçlar için de yaygın olarak kullanılmaktadır (Çelekli ve ark., 2008).

1.7.1. *Scenedesmus ellipsoideus* Chodat

Avrupa, Güney Amerika ve Asya'da dağılım gösteren (Guiry ve Guiry, 2016), ülkemiz sularında da bulunan bir algdir. 2, 4, 8 ya da 16 hücreli kolonide hücreler lineer olarak dizilmiştir. Hücreler silindirik oval, 8-12 μ m uzunluğunda, 4-5 μ m genişliğindedir. Terminal hücrelerden 2 uzun seta çıkar. Hücre duvarı düzdür (Huber-Petalozzi, 1983).

1.8. Kaynak Özetleri

Chlorella vulgaris alginin yaşadığı kültür ortamına belirli konsantrasyonlarda IAA (indol-3-asetik asit), IBA (indol-3-bütirik asit), FAA (fenil asetik asit) ve NAA (1-naftalen asetik asit) ilave edilerek 24, 48, 72. saatlerde antioksidan parametrelerdeki değişimler gözlenmiştir. Deney sonucunda 72 saat aralığında klorofil-*a* miktarında artış, askorbat ve glutatyon miktarları ile SOD ve APOD aktivitesinde önce artış (48. saat) sonra azalma (72. saat) olduğu gözlemlenmiştir (Piotrowska ve ark., 2013). Tripathi ve ark. (2005), *Scenedesmus sp.* algine bakır ve çinko ağır metallerini uygulamışlar ve SOD, KAT, APOD ve GR enzimlerinin aktivitelerini incelemişlerdir. İki metalin de artan konsantrasyonlarına bağlı olarak enzim aktivitelerinde azalma görülmüştür. Romero ve ark. (2011), *Chlorella kessleri* alginde glifosat uygulaması sonucunda SOD aktivitesinin arttığını belirtmişlerdir. Oto ve ark. (1996), *Tetraselmis gracilis* ve Rijstenbil ve ark. (1994), *Ditylum brightwellii* algleri üzerine kadmiyum toksisitesi çalışmaları yapmış ve sonuçta SOD aktivitesinin arttığını bulmuşlardır. Nagalakshmi ve Prasad (2001), *Scenedesmus bijugatus* algini farklı bakır konsantrasyonlarına tabii tutmuşlar; APOD, SOD ve GPX aktivitesinde artış olmasına rağmen hücrenin GSH içeriğinde kademeli olarak azalma olduğunu gözlemlemişlerdir. Li ve ark. (2006), *Pavlova viridis* yeşil algine farklı konsantrasyonlarda bakır uygulamışlar ve bakır toksisitesinin SOD ile KAT enzimlerinin aktivitesini artırdığını bulmuşlardır. Wu ve ark. (2009), *Ulva fasciata*'da antioksidan sistemin bazı parametrelerinde kadmiyum uygulamalarına bağlı değişimleri araştırmışlardır. Sonuçta kadmiyum konsantrasyonunun artışına bağlı olarak GSH ile okside GSH değerlerinde azalma, APOD, FeSOD, GR ve KAT aktivitesinde artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Elbaz ve ark. (2010), *Chlamydomonas reinhardtii*'de civanın oluşturduğu oksidatif stresi ve antioksidan enzimlere olan etkisini araştırmışlardır. Sonuçta civa toksisitesinin ROT üretiminin yanı sıra, KAT ve APOD enzimlerinin aktivitesini de arttırdığını bulmuşlardır. Srivastava ve ark. (2005), *A. doliolum* ile yaptığı bir çalışmada bakırın algde oksidatif strese yol açtığını ve antioksidan savunma sisteminde değişikliklere yol açtığını bulmuşlardır. Benzer sonuçlar Siripornadulsil ve ark.'nın (2002), *Chlamydomonas reinhardtii* ile yaptıkları başka bir çalışmadan da elde edilmiştir. Popovic ve ark. (2005), *Scenedesmus obliquus*

üzerinde bakır ile yaptıkları bir çalışmada KAT, APOD ve GR enzimlerinin aktivitelerini incelemişlerdir. Sonuçta KAT aktivitesinde önemli bir değişimin olmadığını, APOD aktivitesinin belli bir miktar artmasına rağmen belli konsantrasyonlarda sabitleştiğini, GR aktivitesinde ise artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Wong ve Chang (1991), *Chlorella pyrenoidosa* algine bakır, krom ve nikel uygulayarak bu ağır metallerin büyüme, fotosentez ve klorofil-*a* miktarı üzerine etkileri incelenmişler ve sonuçta bu ağır metalleri sebep oldukları toksik etkilerin derecesine göre Cu>Cr>Ni şeklinde sıralamışlardır. Mehta ve Gaur (1999), *Chlorella vulgaris* ile yaptıkları bir çalışmada yüksek dozda bakır uygulanan alglerin bu metali hücrede intraselüler olarak biriktirdiğini bulmuşlardır. Ayrıca yüksek metal birikiminin alg hücrelerinde intraselüler prolin miktarını da artırdığını belirlemişlerdir. Mamboya (2001), kahverengi bir makroalg olan *Padina boeagesenni* ile yaptığı bir çalışmada alge bakır uygulamış artan bakır konsantrasyonu ile algin gelişiminde önemli sayılabilecek bir yavaşlama gözlemlemiştir. Surosz ve Palinska (2004), *Anabaena flos-aquae* ile yaptıkları bir çalışmada 0.35 ppm bakır uygulanmasının algin gelişimini olumsuz etkilediğini ve artan bakır konsantrasyonunun algin klorofil-*a* miktarını azalttığını belirlemişlerdir. Xylander ve Braune (1994), *Haematococcus* sp. algi üzerine nikel metalinin yüksek konsantrasyonlarını uygulamışlar ve sonuçta protein ile karbonhidrat miktarının azaldığını bulmuşlardır. Pempkowiak ve Kosakowska (1998), *Chlorella vulgaris* üzerinde yaptıkları bir çalışmada kadmiyum toksisitesinin etkisini incelemişler, algin hücre sayısı, biyokütle ve klorofil-*a* miktarındaki değişimi analiz etmişlerdir. Kadmiyum miktarı arttıkça hücre sayısı, biyokütle ve klorofil-*a* miktarında azalma gözlemlemişlerdir. Gensemer (1991), pH 6'da 15 µM'lık alüminyum konsantrasyonunun, *Asterionella ralfsii* var. *americana*'da büyüme hızını azalttığını belirtmiştir. Pettersson ve ark. (1985), *Anabaena cylindrica*'da pH 6'da 3.7 µM'lık alüminyum konsantrasyonunun büyüme hızı ve nitrogenaz aktivitesini inhibe ettiğini belirlemişlerdir. pH 6'da ve 180 µM'lık alüminyum konsantrasyonunda ise 120 saat sonra büyümenin yarı yarıya azaldığını rapor etmişlerdir. Pillsbury ve Kingston (1990) tatlı su fitoplanktonu üzerine yaptıkları bir çalışmada pH 5.7'de 50 µg L⁻¹ alüminyum konsantrasyonunun, hücre yoğunluğunun azalmasına neden olan en düşük etki konsantrasyonu olduğunu belirtmişlerdir. De Jong ve ark. (1994) *Cystoseira barbata*'da 50 ve 150 µg L⁻¹ konsantrasyonlarındaki inorganik cıvanın

(HgCl₂) toksisitesine algin direnç gösterdiğini, fakat 5 ve 15 µg L⁻¹ metil civanın (CH₃HgCl) inorganik civadan daha yüksek toksik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Qian ve ark. (2009), *Chlorella vulgaris*'e bakır ve kadmiyum uygulamışlar ve bu iki metalin ayrı ayrı ve sinerjik etkilerinin algin büyümesine ve klorofil-*a* miktarına etkisine bakmışlardır. Sonuçta bu iki metalin hem ayrı ayrı hem sinerjik olarak algin büyümesini ve klorofil-*a* miktarını azalttığını belirtmişlerdir. Irmer ve ark. (1986) yaptıkları çalışmada *Chlamydomonas reinhardtii* algine farklı konsantrasyonlarda Pb uygulayarak fotosentetik oksijen evolüsyonu, klorofil miktarı, kuru ağırlık ve Pb miktarındaki birikimi incelemişlerdir. 3 saat süreyle 1 M Pb ile etkileşim, fotosentez hızında belirgin azalmalara neden olmuştur. Cvetkovic ve ark. (1991), *Selenastrum capricornutum*'da 0.5 mg L⁻¹'den daha yüksek bakır konsantrasyonlarının 96 saatten sonra fotosentezle ilgili olan biyokimyasal ve fizyolojik prosesleri geri dönüşümsüz olarak inhibe ettiğini bulmuşlardır. Ralph ve Burchett (1998), dört ağır metalin (Pb, Zn, Cu, Cd) laboratuvar koşullarında *H. ovalis*'teki fotosentez üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. 1 mg L⁻¹'den 10 mg L⁻¹'ye kadar olan ağır metal konsantrasyonları bazı akut toksik geri bildirimlere neden olmuştur. Fotosentez üzerine ağır metallerin etkileri karşılaştırıldığında, Cu ve Zn'nin, Pb ve Cd'ye oranla daha olumsuz etkilere sahip olduğu görülmüştür. Li ve ark. (2005), çinko ve bakır ağır metallerinin *Pavlova viridis* algi üzerinde klorofil-*a*, büyüme hızı, antioksidan enzim aktiviteleri ve MDA miktarındaki değişime etkilerini değerlendirmişlerdir. Çinko ve bakırın artan konsantrasyonlarında hücre yoğunluğu, klorofil-*a* ve protein miktarlarında azalmalar gözlenmiştir. MDA miktarı ve SOD aktivitesinde her iki metalin yüksek konsantrasyonlarına bağlı olarak artış ve GSH miktarında düzensiz değişimler görülmesine rağmen, en yüksek konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre artış gözlenmiştir. Bakır uygulamalarında GPX aktivitesinde artış gözlenirken, çinko uygulamalarında ise önemli derecede azalmalar gözlenmiştir. Sotol ve ark. (2001), *Pseudokirchneriella subcapitata* algi üzerinde bakır ve çinkonun biyokütle, klorofil-*a*, MDA ve KAT aktivitesi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Sonuçta her iki ağır metalin artan konsantrasyonlarının klorofil-*a* miktarı ve biyokütleyi azalttığı görülmüştür. Bakır ve çinkonun artan konsantrasyonlarında algde MDA miktarı ve KAT aktivitesinde artış gözlenmiştir. Sabatini ve ark. (2008), *Scenedesmus vacuolatus* ve *Chlorella kessleri* alglerine bakır toksisitesi uygulamışlar; biyokütle, klorofil-*a*,

MDA, ve GSH miktarı ile KAT aktivitesini ölçmüşlerdir. Biyokütle ve klorofil-*a* miktarında azalma, MDA ve GSH miktarı ile KAT aktivitesinde artış görülmüştür. Choudhary ve ark. (2007), *Arthrospira platensis* S5 suşu üzerinde bakır, çinko ve kurşun ağır metallerinin algin gelişimi ve antioksidan enzimlerin aktiviteleri üzerine etkisine bakmışlardır. Metal konsantrasyonlarının artışına bağlı olarak algin gelişiminde azalma görülürken MDA ve prolin miktarında ve SOD aktivitesinde artış görülmüştür. Cao ve ark. (2011), farklı konsantrasyonlarda uygulanan manganın *Amphidinium sp.*'de büyüme hızı ve SOD aktivitesine üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Sonuçta Mn konsantrasyonu yükseldikçe büyüme oranında önce artış daha sonra azalma, SOD aktivitesinde ise azalma olduğu gözlemlenmiştir. Elbaz ve ark. (2010), *Chlamydomonas reinhardtii*'de artan civa konsantrasyonlarının hücre sayısında ve klorofil miktarında azalmaya neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca Hg konsantrasyonunun artmasıyla birlikte SOD ve APOD enzimlerinin aktivitelerinde önce artış, sonra azalma olduğu belirtilmiştir. Kumar ve ark. (2010), 4 gün boyunca 0.4 mM konsantrasyonunda CdCl₂ uyguladıkları *Ulva lactuca* algindeki metabolik değişimleri incelemişlerdir. SOD, GR ve APOD aktivitelerinde kontrole göre artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Liu ve ark. (2010), *Grateloupia turuturu* ve *Palmaria palmata* algleriyle yaptıkları çalışmalarda kadmiyumun (CdCl₂) SOD ve GR gibi antioksidan enzimler üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Sonuçta *P. palmata* alginde SOD aktivitesinin, *G. turuturu*'ya göre daha büyük bir artış gösterdiğini, GR aktivitesinin ise azaldığını gözlemlemişlerdir. Melegari ve ark. (2013), *Chlamydomonas reinhardtii* adlı yeşil alge bakır oksit nanopartikülü (CuO-NP) uygulamışlardır. Sonuçta konsantrasyonların artışına bağlı olarak APOD ve GR aktivitelerinde artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Piotrowska ve ark. (2012), üç farklı ağır metalin (Cd, Pb, Cu) 100 µM'lık konsantrasyonlarının *Chlorella vulgaris* üzerindeki etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, klorofil-*a* ve askorbat miktarında en büyük azalmaya kadmiyumun neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Glutasyon miktarı kadmiyum ve kurşun uygulanan alglerde azalırken, Cu uygulanan alglerde artış göstermiştir. SOD aktivitesi ise tüm uygulamalarda artış göstermiştir. Qian ve ark. (2010), *Microcystis aeruginosa* alginde CuSO₄ ve H₂O₂'nin zamana bağlı etkisini incelemişlerdir. Sonuçta klorofil-*a* miktarının CuSO₄ uygulanan grupta önce arttığını (48 saat) ve sonra azaldığını; H₂O₂ uygulamalarında ise sürekli artış gösterdiğini

gözlemlemişlerdir. SOD aktivesi ise CuSO_4 ve H_2O_2 uygulanan alglerde sürekli artış göstermiş, ancak 96. saatteki artışın 48. saatteki artışa göre daha az olduğu belirlenmiştir. Rai ve ark. (2013), Cr (IV) uyguladıkları *Chlorella vulgaris*'de artan krom konsantrasyonlarının biyokütle miktarını azalttığını gözlemlemişlerdir. Aynı çalışmada SOD aktivitesinde önce artış görülmüş, konsantrasyonlar arttıkça aktivite azalmıştır. APOD aktivitesi ise önce azalmış, sonra artmış, ancak yüksek konsantrasyonlarda APOD aktivitesinin düştüğü görülmüştür. Chien ve Vonshak (2010), *Arthrospira platensis* algine yüksek sıcaklık stresi uygulamışlar ve sıcaklığın 33 °C'den 15 °C'ye düşmesi klorofil-*a* miktarını artırırken, KAT aktivitesinde önce artış, daha sonra azalmaya; SOD ile APOD aktivitesinde ise artışa neden olmuştur. Nalimova ve ark. (2005), bakır ve çinkonun *Arthrospira platensis*'in gelişimi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. *A. platensis*'e uygulanan ağır metallerin letal dozlarının algin büyümenin hangi fazında olduğuna (lineer büyüme fazı yada lag fazı) bağlı olarak farklılık gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Yılmaz ve ark. (2006), farklı sodyum selenit (Na_2SeO_3) içeren ortamlarda kültüre alınan *A. platensis*'in gelişimini belirlemeye çalışmışlardır. *A. platensis*'in gelişimini takip etmek için belirlenen parametrelerden pH, klorofil-*a* ve yaş madde miktarları, artan sodyum selenit miktarına bağlı olarak istatistiki açıdan önemli farklılık göstermemiştir. Solisio ve ark. (2008), *A. platensis*'e farklı konsantrasyonlarda kadmiyum uygulamışlar, sonuçta kadmiyum absorpsiyonunun, biyokütle miktarına bağlı olarak değişiklik gösterdiğini saptamışlardır. Pronina ve ark. (2002) sodyum selenit (Na_2SeO_3) uyguladıkları *A. platensis*'in gelişimini ve selenyum birikimini incelemişler ve 20 mg L⁻¹ nin altındaki sodyum selenit konsantrasyonlarının *A. platensis*'in büyümesini engellemediğini bildirmişlerdir. Bajuz (2010), *Chlorella vulgaris* üzerine Cd, Pb, Cu ve brassinolid (BL) uygulamış, BL uygulanan ve uygulanmayan alglerde antioksidan enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimleri araştırmıştır. BL uygulanan alglerde 24 saat sonra hücresel onarımın başladığını ve hücre sayısında artış olduğunu; ayrıca sadece ağır metal uygulanan alglerde konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre sayısında azalma olduğunu gözlemlemiştir.

1.9. Çalışmanın Amacı

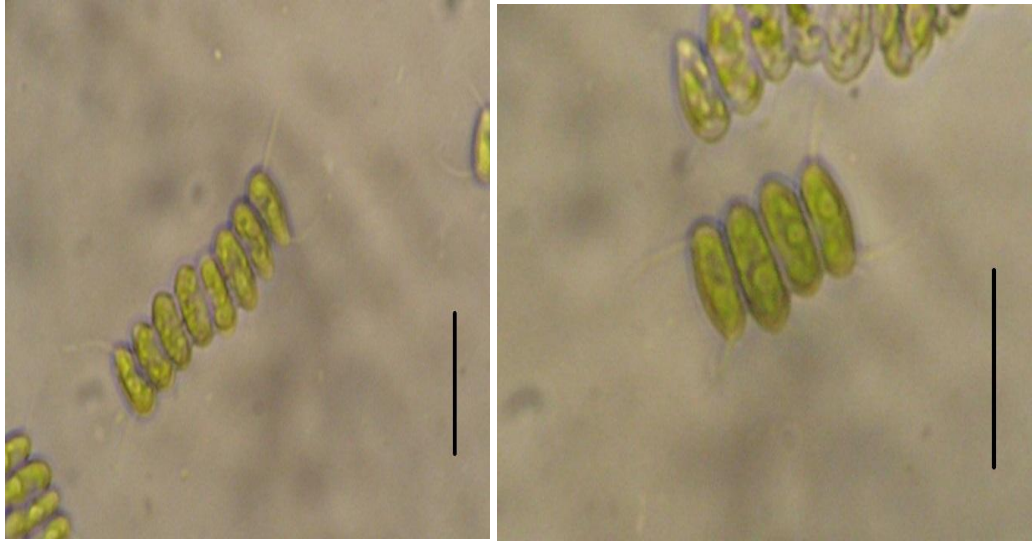
Çalışmamızın amacı, çinko ağır metale maruz bırakılan *Scenedesmus ellipsoideus* Chodat alginde meydana gelen bazı metabolik değişimlerin farklı parametreler yardımıyla incelenmesidir.

Bu amaçla *S. ellipsoideus* laboratuvar koşullarında yetiştirildikten sonra 7 gün süreyle farklı konsantrasyonlarda çinko etkisine maruz bırakılmıştır. Böylece farklı çinko konsantrasyonlarına bağlı olarak canlının klorofil-*a* miktarında, biyokütlesinde, bazı antioksidan enzimlerin aktivitelerindeki [süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon redüktaz (GR) ve askorbat peroksidaz (APOD)] değişimler incelenmiştir. Uzun vadede bu çalışmanın amacı, sucul ekosistem üzerine metal stresinin olası etkisinin belirlenmesi için yapılan ekotoksikoloji çalışmalarına katkıda bulunmaktır.

BÖLÜM 2. MATERYAL VE METOD

2.1. Çalışma Materyali

Çalışmada kullanılan *Scenedesmus elipsoideus* Chodat (SALIM01) suşu (Şekil 2.1.). Ketence Gölü'nden (Kocaeli) izole edilmiş, Sakarya Üniversitesi Biyoloji Bölümü Bitki Fizyolojisi ve Ekolojisi Laboratuvarı'nda aksenik koşullarda çoğaltılmıştır.



Şekil 2.1. *Scenedesmus elipsoideus* Chodat (SALIM01) (Bar 10 µm).

2.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışma süresince kullanılan cihazlar Tablo 2.1.'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Kullanılan cihazlar

Cihaz	İşlev	Marka
İklim kabini (0-50°C, 0-7000 lux)	İnkubasyon	Dev/Pet
Hassas terazi	Tartım	Schimadzu SLB 320
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Solüsyon hazırlanması	Dragon-med-M-10068
Buzdolabı (No-frost)	Numunelerin saklanması	Beko
Etüv	Sterilizasyon	Nüve
Soğutuculu mikrosantrifüj	Süpernatant eldesi	Centurion scientific K3
Otoklav	Sterilizasyon	Alp
pH metre	pH ölçümleri	Metler toledo
Spektrofotometre	Absorbans ölçümü	Schimadzu UV mini 1240 UV

2.3. Yöntem

2.3.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması

Scenedesmus elipsoideus Chodat (SALIM01) suşu BG11 ortamında (Rippka ve ark., 1979) aksenik şartlarda yetiştirilmiştir (Tablo 2.2, Tablo 2.3 ve Tablo 2.4). 250 mL'lik erlenlerde steril olarak hazırlanmış 180 mL'lik kültür besiyerine 20 mL alg kültürü inokule edilerek iklimlendirme kabininde 25 °C sıcaklıkta, full spektrum lambaların kullanıldığı 5000 lux ışık şiddetinde (12 saat aydınlık, 12 saat karanlık), günde 3 defa çalkalanmak şartı ile 10 gün bekleme bırakılmıştır.

Tablo 2.2. BG11 ortamı içeriği (Rippka ve ark., 1979).

Bileşik	Miktar
NaNO ₃	1,5 g L ⁻¹
NaHCO ₃	1 g L ⁻¹
K ₂ HPO ₄ (1M)	0,2 mL L ⁻¹
BG11 konsantre stok solüsyon	10 mL L ⁻¹

Tablo 2.3. BG 11 konsantre stok solüsyonu içeriği

Bileşik	Miktar
MgSO ₄ . 7H ₂ O	7,5 g L ⁻¹
Sitrik asit	0,6 g L ⁻¹
EDTA-Na ₂	0,1 g L ⁻¹
A5 stok solüsyonu	100 mL L ⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	3,6 g L ⁻¹
(NH ₄) ₅ [Fe(C ₆ H ₄ O ₇) ₂]	0,6 g L ⁻¹
Na ₂ CO ₃	2 g L ⁻¹

Tablo 2.4. A5 stok solüsyonu içeriği

Bileşik	Miktar
H ₃ BO ₃	2,86 g L ⁻¹
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81 g L ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,31 g L ⁻¹
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22 g L ⁻¹
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,05 g L ⁻¹
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08 g L ⁻¹

2.3.2. Uygulanan Ağır Metal Çözeltileri

Çalışmada çinko ağır metalinin sırasıyla 20 µg mL⁻¹ ve 100 µg mL⁻¹ konsantrasyona sahip olacak şekilde stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltiler 1 µg mL⁻¹, 2 µg mL⁻¹, 4 µg mL⁻¹, 6 µg mL⁻¹ ve 8 µg mL⁻¹ konsantrasyonlarda kullanılmıştır.

2.3.3. Deney Ortamı ve Düzenegi

Ağır metal uygulamalarından önce 250 mL *S. elipsoideus* kültürü hazırlanmış ve 10 gün boyunca ortama adaptasyon için iklimlendirme dolabında belirtilen şartlarda bekletilmiştir. Kültürler 10 günün sonunda içerdiği klorofil-*a* miktarı 1 µg mL⁻¹ ve kullanılacak kültür miktarı 50 mL olacak şekilde tazelenmiştir.

Belirlenen konsantrasyonlarda çinko çözeltisi hazırlanmış ve taze kültürlerle uygulanmıştır. Ortamın pH'sı 7.4 olarak ayarlanmıştır. Deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Deney süresi boyunca *S. elipsoideus*'un fotosentetik pigment (klorofil-*a*) miktarı ve optik yoğunluğundaki (OD) değişim her gün ölçülerek kaydedilmiştir. Denemenin 7. gününde kültürlerden alınan örnekler 15,000 rpm ve +4 °C'de 20 dakika santrifüj edilerek elde edilen pelletler süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon redüktaz (GR) ve askorbat peroksidaz (APOD) aktivitelerinin ölçümlerinde kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

2.4. Ölçüm ve Analizler

2.4.1. Optik yoğunluğun (OD) belirlenmesi

Mikroalgin optik yoğunluğu (OD) ve büyüme hızı spektrofotometrede 560 nm ve 750 nm'deki absorbans değerleri ölçülerek bulunmuştur. Ölçümlerde 1/10 oranında BG11 besiyeri ile seyreltme yapılmıştır (100 µL kültür, 900 µL BG11 besiyeri). Ölçümler sırasında kör solüsyonu olarak BG11 besiyeri kullanılmıştır. Her ölçüm 7 gün boyunca 24 saat arayla gerçekleştirilmiştir.

2.4.2. Fotosentetik pigment analizi (klorofil-a)

Klorofil-a ölçümlerinde 1/10 oranında saf metanolle seyreltilmiş örnekler kullanılmıştır (100 µL kültür, 900 µL saf metanol). Bir dakikalık vorteksleme işleminden sonra, 2 dakika 13,800 rpm ve +4 °C'de santrifüjlenerek spektrofotometrede 665 nm'deki absorbanslar ölçülmüştür. Ölçümler sırasında kör solüsyonu olarak saf metanol kullanılmıştır (Mackinney, 1941).

2.4.3. Toplam çözüner protein analizi

Toplam çözüner protein miktarı Bradford (1976)'ya göre belirlenmiştir. Protein analizleri SOD, GR ve APOD enzimleri için ayrı ayrı yapılmıştır. Son hacim 5.5 mL olacak şekilde 0.031 M sitrat-fosfat tamponu (pH 5.5), süpernatant ve % 0.01'lik Coomassie Brilliant Blue (G-250) ile reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Deney tüpleri önce vortex ile 10-15 sn süreyle karıştırılmış, daha sonra 30 dk karanlık ortamda ve oda sıcaklığında bekletilmiştir. Protein miktarı spektrofotometrede 595 nm'de elde edilen absorbans değerleri ve BSA (bovine serum albumin) ile hazırlanan standart grafik yardımıyla hesaplanmıştır.

2.4.4. Toplam süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi

Toplam SOD aktivitesi Beyer ve Fridovich (1987)'ye göre belirlenmiştir. 2 mL kültür alınarak 15,000 rpm ve +4 °C'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmış ve pellet ekstraksiyon için kullanılmıştır. Yaklaşık 0.2 g pellet 100 mM potasyum fosfat (pH 7.0), % 2'lik PVP (polivinil pirolidon) ve 1 mM sodyum EDTA (Na₂EDTA) içeren ekstraksiyon çözeltisi ile homojenize edildikten sonra 14,000 rpm ve +4 °C'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Son hacim 1030 µL olacak şekilde 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.8), 9.9×10^{-3} M metionin, 5.7×10^{-5} M NBT (nitroblue tetrazolyum), % 1'lik triton X-100 ve enzim karışımından oluşan bir reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Reaksiyon 0.9 µM riboflavin ilavesi ile başlatılmış, bu karışım 15 dakika boyunca $375 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ şiddetinde ışığa maruz bırakıldıktan sonra 560 nm'de spektrofotometrede absorbans değerleri belirlenmiştir. Toplam SOD aktivitesi daha önce hazırlanmış olan standart grafikten faydalanarak hesaplanmıştır (U mg protein⁻¹).

2.4.5. Süperkoksit dismutaz izozimlerinin aktivitesi

Farklı SOD izozimlerinin aktivitesi, 2 mM potasyum siyanür (KCN) veya 5 mM H₂O₂ ile inhibisyona duyarlılıkları esasına göre belirlenmiştir (Fridovich, 1986).

2.4.6. Toplam glutatyon redüktaz (GR) aktivitesi

Toplam GR aktivitesi Sgherri ve ark. (1994)'e göre belirlenmiştir. 2 mL kültür alınarak 15,000 rpm ve +4 °C'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmış ve pellet ekstraksiyon için kullanılmıştır. Yaklaşık 0.2 g pellet 100 mM potasyum fosfat (pH 7.0), % 2'lik PVP (polivinil pirolidon) ve 1 mM sodyum EDTA (Na₂EDTA) içeren ekstraksiyon çözeltisi ile homojenize edilerek, 14,000 rpm ve +4 °C'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Son hacim 1000 µL olacak şekilde 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.8), 2 mM sodyum EDTA (Na₂EDTA), 0.5 mM okside glutatyon

(GSSG), 0.2 mM nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) ve 100 µg protein içeren süpernatanttan oluşan reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Reaksiyon, NADPH'nin eklenmesiyle başlatılmıştır. Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak 320 nm'de elde edilen absorbans değerleri ile ölçülmüştür. Düzeltme, NADPH yokluğunda GSSG oksidasyonu ile yapılmıştır. Enzim aktivitesi, NADPH'nin ekstinksiyon katsayısı ($6.2 \text{ mM cm}^{-1} \text{ } 340 \text{ nm}^{-1}$) kullanılarak reaksiyonun başlangıç hızından hesaplanmıştır ($\text{nmol NADPH dakika}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$).

2.4.7. Toplam askorbat peroksidaz (APOD) aktivitesi

Toplam APOD aktivitesi Wang ve ark. (1991)'e göre belirlenmiştir. 2 mL kültür alınarak 15,000 rpm ve +4 °C'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmış ve pellet ekstraksiyon için kullanılmıştır. Yaklaşık 0.2 g pellet mM Tris-HCl (pH 7.2), % 2'lik PVP, 1 mM sodyum EDTA (Na_2EDTA) ve 2 mM askorbat içeren ekstraksiyon çözeltisi ile homojenize edilmiştir. Homojenat 14,000 rpm ve +4 °C'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Son hacim 1000 µL olacak şekilde 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 6.6), 2.5 mM askorbat, 10 mM hidrojen peroksit (H_2O_2) ve 100 µg protein içeren süpernatanttan oluşan reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Reaksiyon, H_2O_2 'nin eklenmesiyle başlatılmıştır. Askorbat konsantrasyonundaki azalma, spektrofotometrede 290 nm'de yapılan okumalarla enzim özütü içermeyen reaksiyon çözeltisine karşılık kaydedilmiştir. Enzim aktivitesi, askorbatın ekstinksiyon katsayısı ($2.8 \text{ mM cm}^{-1} \text{ } 290 \text{ nm}^{-1}$) kullanılarak reaksiyonun başlangıç hızından hesaplanmıştır ($\text{nmol askorbat dakika}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$).

2.4.8. İstatistiksel analizler

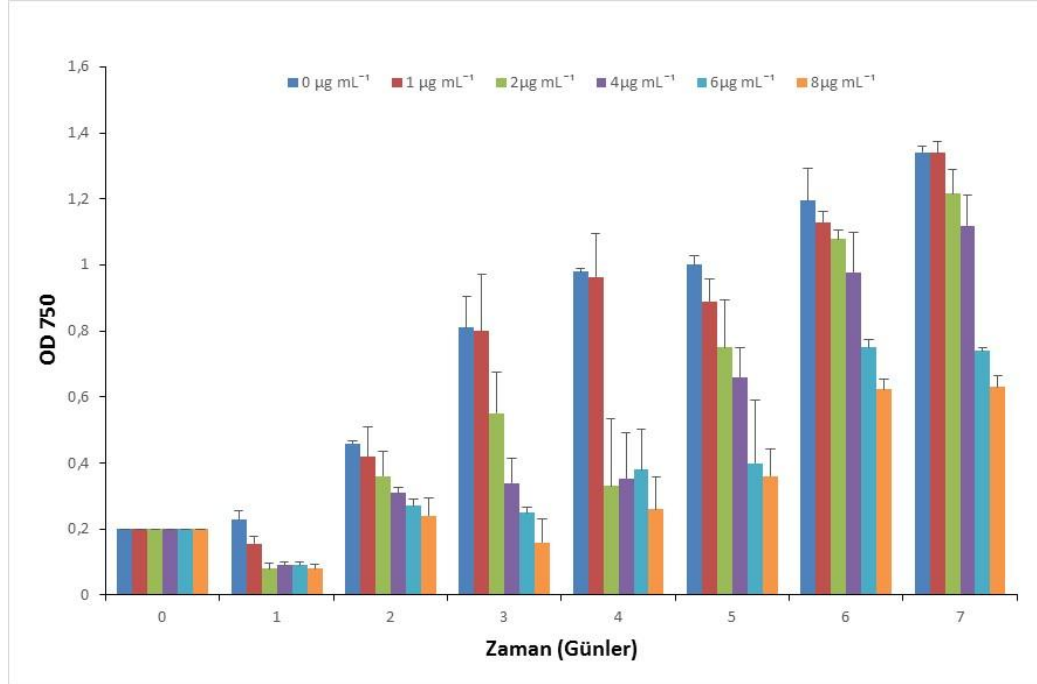
Ölçümlerden elde edilen verilere, SPSS paket programı kullanılarak, istatistiki tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmış ve değişkenler arasındaki farklılığın belirlenmesi için Tukey testi kullanılmıştır. Her bir bağımsız değişken için uygulama ve çeşitler arasındaki farkın önem kontrolü Anlamlı Önemli Fark (AÖF) % 5 düzeyinde hesaplanmıştır.

BÖLÜM 3. BULGULAR

3.1. Biyokütle

S. ellipsoideus'a uygulanan farklı konsantrasyonlardaki çinko ağır metalinin biyokütleyle olan etkisi OD 750 değeri ölçülerek Şekil 3.1.'de verilmiştir. Çinko uygulanan örneklerde EC50 değeri $7.29 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

Farklı konsantrasyondaki çinko uygulamalarının biyokütle üzerinde zamana bağlı olarak neden olduğu değişimler incelendiğinde, biyokütle değerlerinin her çinko konsantrasyonunda 7 günlük deneme süresi boyunca genellikle sürekli bir artış gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 3. 1). Ancak biyokütle değerlerinde günlük olarak meydana gelen değişimler, uygulanan çinko konsantrasyonlarına bağlı olarak değerlendirildiğinde, artan çinko konsantrasyonuna bağlı olarak biyokütlenin de sürekli azaldığı belirlenmiştir ($p<0.05$) (Şekil 3. 1). Bunun dışında çinko uygulamalarının 24. saatten itibaren biyokütle üzerinde inhibisyon etkisini göstermeye başladığı ve en şiddetli inhibisyonun uygulanan en yüksek çinko konsantrasyonunda ($8 \mu\text{g mL}^{-1}$) ortaya çıktığı gözlenmiştir.

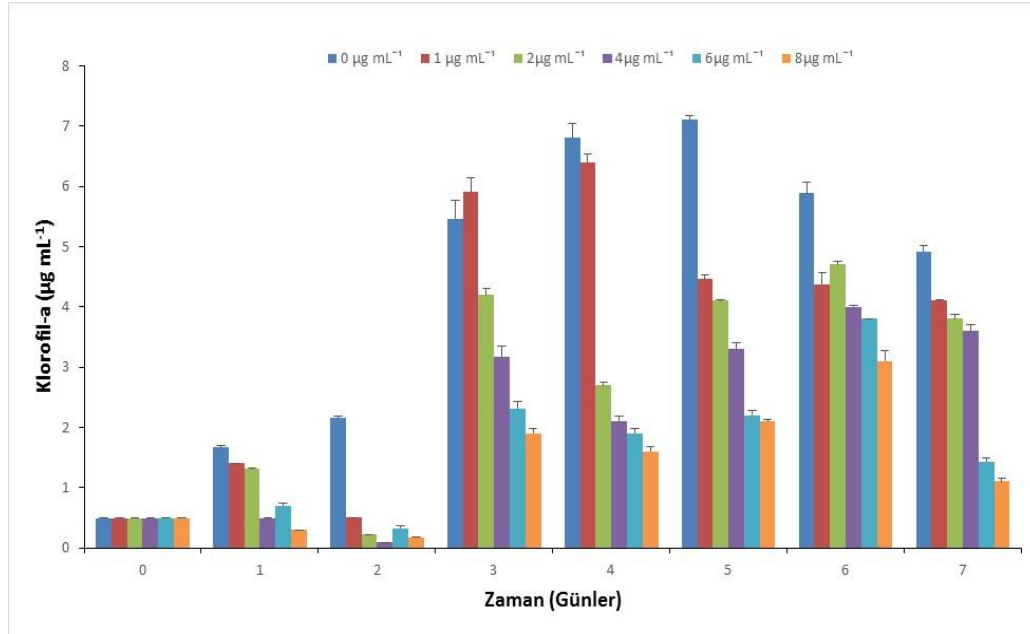


Şekil 3.1. *S. ellipsoideus*'da farklı çinko konsantrasyonlarının biyokütlenin günlük değişimi üzerine etkisi

3.2. Fotosentetik Pigment Analizi (Klorofil-*a*)

S. ellipsoideus'a uygulanan farklı konsantrasyonlardaki çinko ağır metalinin klorofil-*a* miktarı üzerindeki etkisi Şekil 3.2.'de verilmiştir.

Farklı konsantrasyondaki çinko uygulamalarının klorofil-*a* miktarı üzerinde zamana bağlı olarak neden olduğu değişimler incelendiğinde, klorofil-*a* miktarının kontrol grubunda 5. güne kadar, 1 µg mL⁻¹ çinko uygulanan grupta ise 4. güne kadar artıp, daha sonra azaldığı belirlenmiştir (Şekil 3. 2). 2 µg mL⁻¹, 4 µg mL⁻¹, 6 µg mL⁻¹ ve 8 µg mL⁻¹'lik çinko konsantrasyonları ise klorofil-*a* miktarında zamana bağlı olarak düzensiz değişimlere neden olmuştur (Şekil 3. 2). Ancak klorofil-*a* miktarlarında günlük olarak meydana gelen değişimler, uygulanan çinko konsantrasyonlarına bağlı olarak değerlendirildiğinde, artan çinko konsantrasyonuna bağlı olarak klorofil-*a* miktarlarının da genellikle sürekli azaldığı belirlenmiştir ($p < 0.05$) (Şekil 3. 1). Bunun dışında, biyokütle verilerindeki değişimlere benzer olarak, çinko uygulamalarının 24. saatten itibaren klorofil-*a* miktarı üzerinde inhibisyon etkisini göstermeye başladığı ve en şiddetli inhibisyonun uygulanan en yüksek çinko konsantrasyonunda (8 µg mL⁻¹) ortaya çıktığı gözlenmiştir.

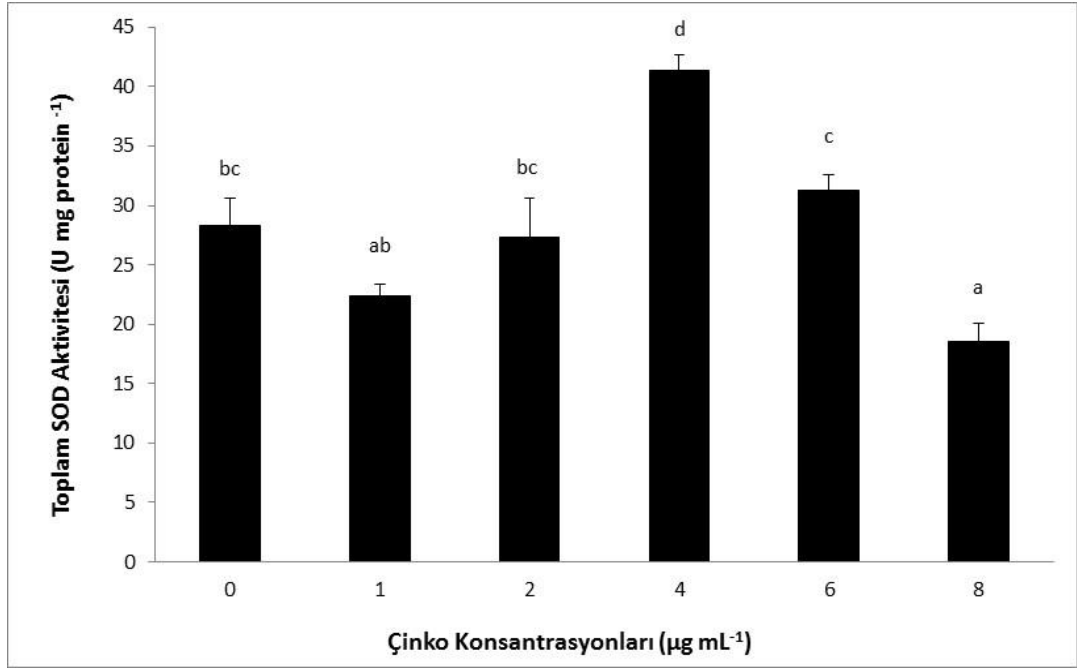


Şekil 3.2. *S. ellipsoideus*'da farklı çinko konsantrasyonlarının klorofil-a miktarının günlük değişimi üzerine etkisi

3.3. Toplam Süperoksit Dismutaz Aktivitesi

S. ellipsoideus'a uygulanan farklı konsantrasyonlardaki çinko ağır metalinin toplam süperoksit dismutaz enzim aktivitesi (SOD) üzerindeki etkisi Şekil 3.3.'de verilmiştir.

Çinko etkisine maruz bırakılan *S. ellipsoideus*'un 4 µg mL⁻¹ ve 6 µg mL⁻¹ çinko konsantrasyonlarındaki toplam SOD aktivitesi kontrole göre artış gösterirken; 1 µg mL⁻¹, 2 µg mL⁻¹ ve 8 µg mL⁻¹ çinko konsantrasyonlarındaki toplam SOD aktivitesi kontrole göre düşüş göstermiştir. Kontrole göre 4 µg mL⁻¹, 6 µg mL⁻¹ ve 8 µg mL⁻¹ çinko konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). SOD aktivitesinin en yüksek (41.3 U mg protein⁻¹) ve en düşük (18.6 U mg protein⁻¹) olduğu değerler sırasıyla 4 µg mL⁻¹ ve 8 µg mL⁻¹ çinko konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.



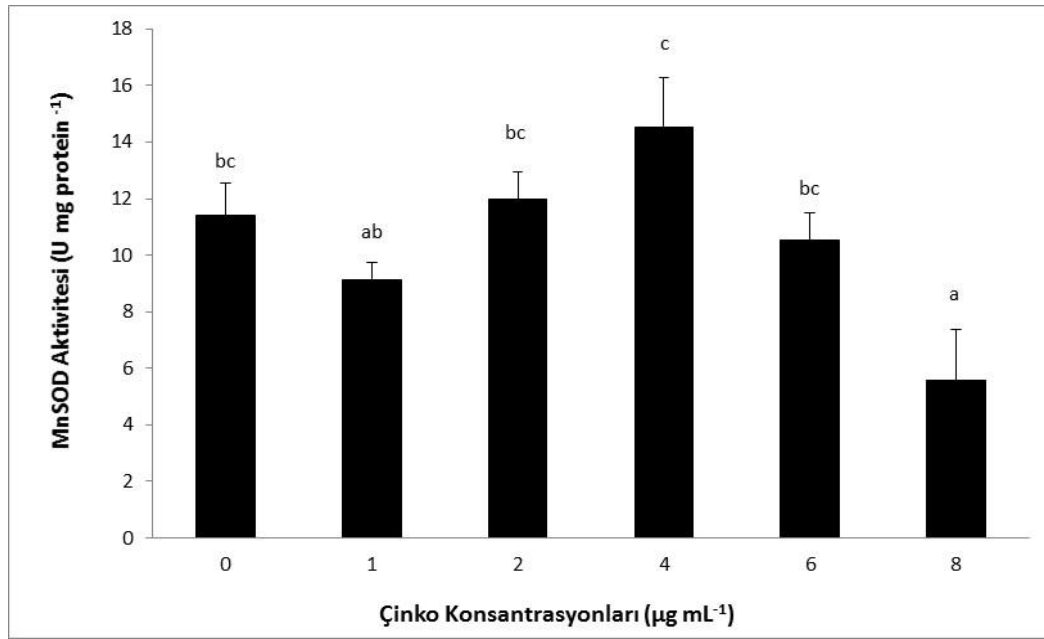
Şekil 3.3. Farklı çinko konsantrasyonlarının *S. ellipsoideus*'da toplam SOD aktivitesi üzerine etkisi

3.4. Süperoksit Dismutaz İzozimlerinin Aktivitesi

3.4.1. MnSOD Aktivitesi

S. ellipsoideus'a uygulanan farklı konsantrasyonlardaki çinko ağır metalinin mangan süperoksit dismutaz enzim aktivitesi (MnSOD) üzerindeki etkisi Şekil 3.4.'de verilmiştir.

Çinko etkisine maruz bırakılan *S. ellipsoideus*'un 2 µg mL⁻¹ ve 4 µg mL⁻¹ çinko konsantrasyonlarındaki MnSOD aktivitesi kontrole göre artış gösterirken; 1 µg mL⁻¹, 6 µg mL⁻¹ ve 8 µg mL⁻¹ çinko konsantrasyonlarındaki MnSOD aktivitesi kontrole göre düşüş göstermiştir. Kontrole göre 1 µg mL⁻¹, 4 µg mL⁻¹ ve 8 µg mL⁻¹ çinko konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p<0.05). MnSOD aktivitesinin en yüksek (14.54 U mg protein⁻¹) ve en düşük (5.6 U mg protein⁻¹) olduğu değerler sırasıyla 4 µg mL⁻¹ ve 8 µg mL⁻¹ çinko konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.

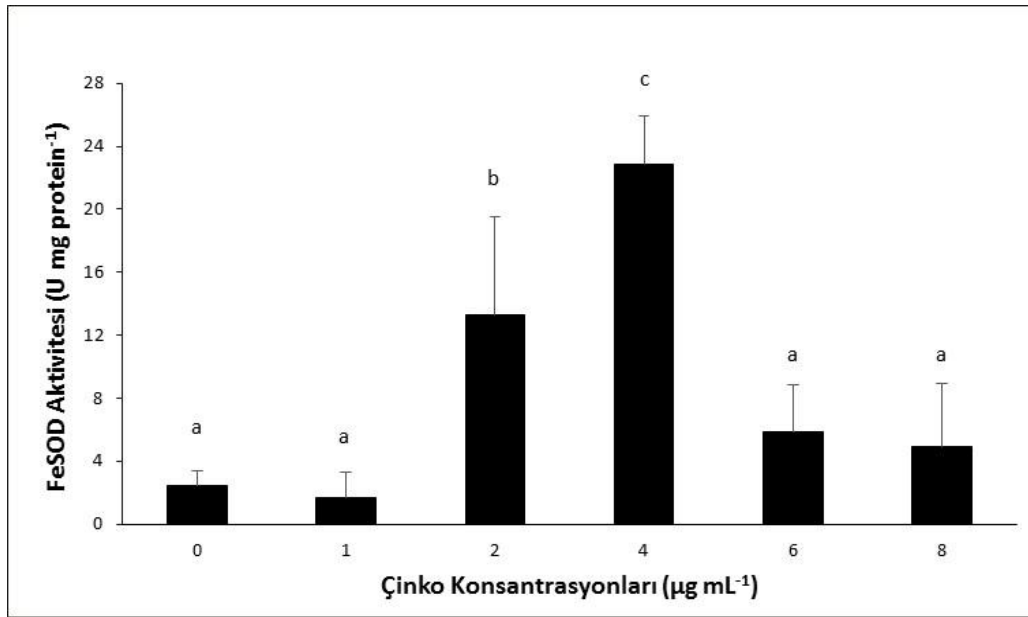


Şekil 3.4. Farklı çinko konsantrasyonlarının *S. ellipsoideus*'da MnSOD aktivitesi üzerine etkisi

3.4.2. FeSOD Aktivitesi

S. ellipsoideus'a uygulanan farklı konsantrasyonlardaki çinko ağır metalinin demir süperoksit dismutaz enzim aktivitesi (FeSOD) üzerindeki etkisi Şekil 3.5.'de verilmiştir.

Çinko etkisine maruz bırakılan *S. ellipsoideus*'un 2 µg mL⁻¹, 4 µg mL⁻¹, 6 µg mL⁻¹ ve 8 µg mL⁻¹ çinko konsantrasyonlarındaki FeSOD aktivitesi kontrole göre artış gösterirken; 1 µg mL⁻¹ çinko konsantrasyonundaki FeSOD aktivitesi kontrole göre düşüş göstermiştir. Kontrole göre 2 µg mL⁻¹ ve 4 µg mL⁻¹ çinko konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). FeSOD aktivitesinin en yüksek (22.85 U mg protein⁻¹) ve en düşük (1.7 U mg protein⁻¹) olduğu değerler sırasıyla 4 µg mL⁻¹ ve 1 µg mL⁻¹ çinko konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.

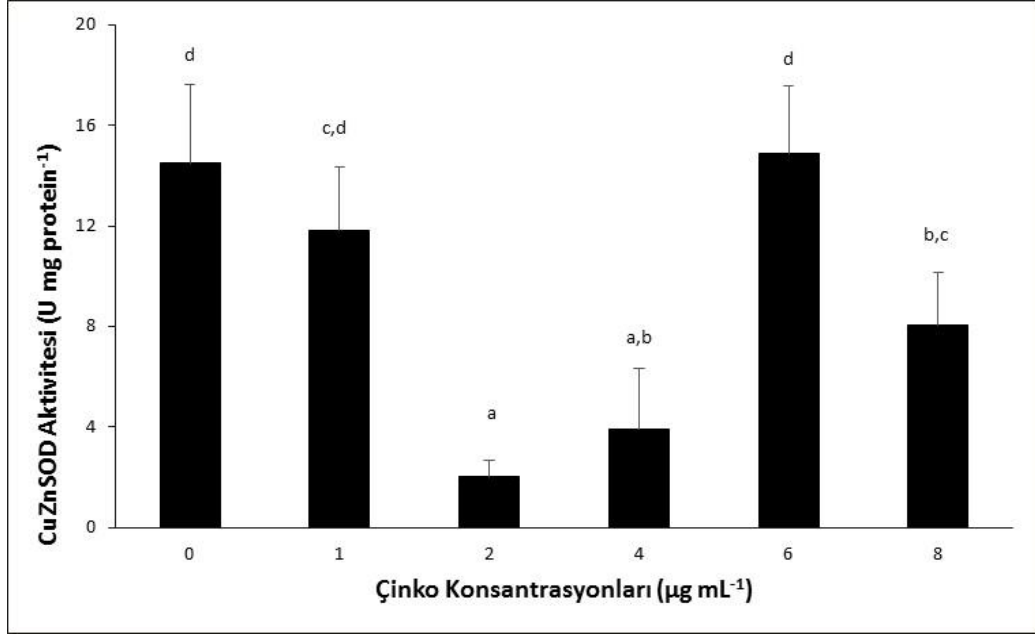


Şekil 3.5. Farklı çinko konsantrasyonlarının *S. ellipsoideus*'da FeSOD aktivitesi üzerine etkisi

3.4.3. CuZnSOD Aktivitesi

S. ellipsoideus'a uygulanan farklı konsantrasyonlardaki çinko ağır metalinin bakır çinko süperoksit dismutaz enzim aktivitesi (CuZnSOD) üzerindeki etkisi Şekil 3.6.'da verilmiştir.

Çinko etkisine maruz bırakılan *S. ellipsoideus*'un 6 µg mL⁻¹ çinko konsantrasyonundaki CuZnSOD aktivitesi kontrole göre artış gösterirken; 1 µg mL⁻¹, 2 µg mL⁻¹, 4 µg mL⁻¹ ve 8 µg mL⁻¹ çinko konsantrasyonlarındaki CuZnSOD aktivitesi kontrole göre düşüş göstermiştir. Kontrole göre 2 µg mL⁻¹, 4 µg mL⁻¹ ve 8 µg mL⁻¹ çinko konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). CuZnSOD aktivitesinin en yüksek (14.9 U mg protein⁻¹) ve en düşük (3.9 U mg protein⁻¹) olduğu değerler sırasıyla 6 µg mL⁻¹ ve 4 µg mL⁻¹ çinko konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.

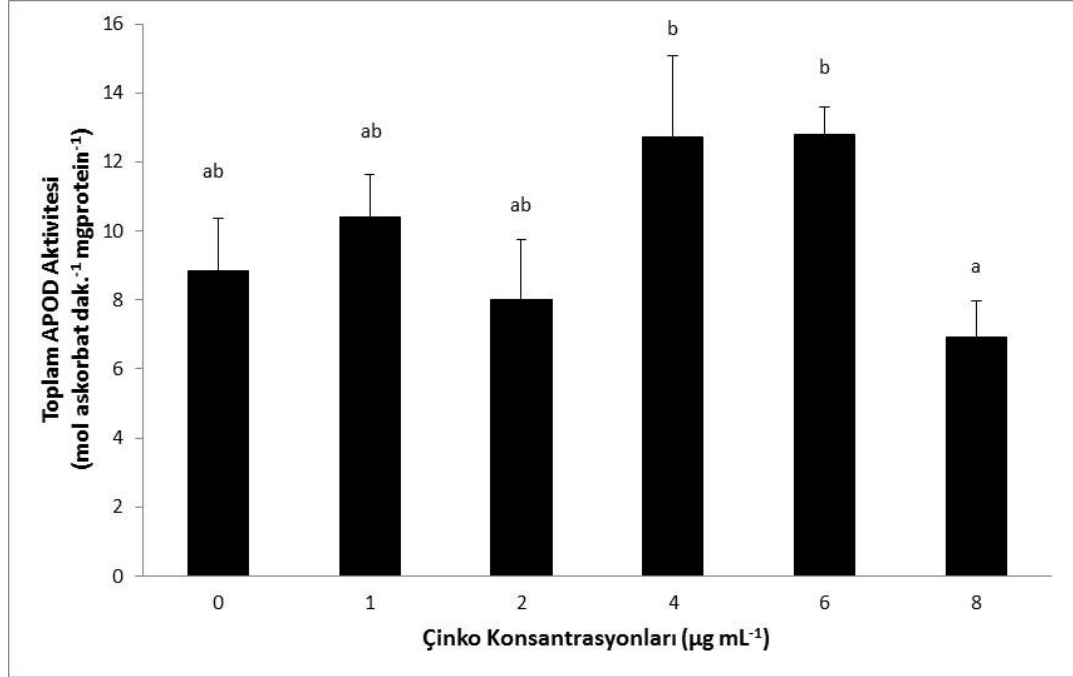


Şekil 3.6. Farklı çinko konsantrasyonlarının *S. ellipsoideus*'da CuZnSOD aktivitesi üzerine etkisi

3.5. Toplam Askorbat Peroksidaz Aktivitesi

S. ellipsoideus'e uygulanan farklı konsantrasyonlardaki çinko ağır metalinin toplam askorbat peroksidaz enzim aktivitesi (APOD) üzerindeki etkisi Şekil 3.7.'de verilmiştir.

Çinko etkisine maruz bırakılan *S. ellipsoideus*'da 1 µg mL⁻¹, 4 µg mL⁻¹ ve 6 µg mL⁻¹ çinko konsantrasyonlarındaki APOD aktivitesi kontrole göre artış gösterirken; 2 µg mL⁻¹ ve 8 µg mL⁻¹ çinko konsantrasyonlarındaki APOD aktivitesi kontrole göre düşüş göstermiştir. Kontrole göre 4 µg mL⁻¹, 6 µg mL⁻¹ ve 8 µg mL⁻¹ konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). APOD aktivitesinin en yüksek (12.8 nmol askorbat dak.⁻¹ mg protein⁻¹) ve en düşük (6.9 nmol askorbat dak.⁻¹ mg protein⁻¹) olduğu değerler sırasıyla 6 µg mL⁻¹ ve 8 µg mL⁻¹ çinko konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.

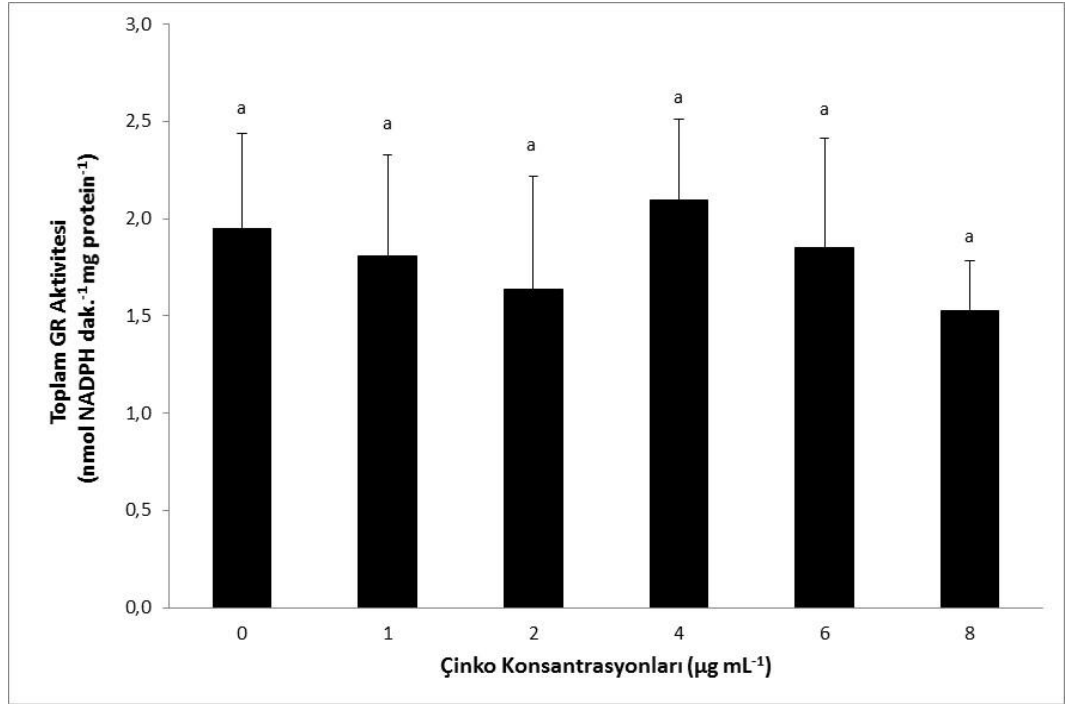


Şekil 3.7. Farklı çinko konsantrasyonlarının *S. ellipsoideus*'da APOD aktivitesi üzerine etkisi

3.6. Toplam Glutasyon Reduktaz Aktivitesi

S. ellipsoideus'e uygulanan farklı konsantrasyonlardaki çinko metalinin toplam glutasyon redüktaz enzim aktivitesi (GR) üzerindeki etkisi Şekil 3.8.'de verilmiştir.

Çinko etkisine maruz bırakılan *S. ellipsoideus*'da 4 µg mL⁻¹ çinko konsantrasyonundaki toplam GR enzim aktivitesi kontrole göre artış gösterirken; diğer çinko konsantrasyonlarında azalma göstermiştir. Kontrol ile diğer tüm konsantrasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark bulunmamıştır. GR aktivitesinin en yüksek (2.09 nmol NADPH dak.⁻¹ mg protein⁻¹) ve en düşük (1.53 nmol NADPH dak.⁻¹ mg protein⁻¹) olduğu değerler sırasıyla 4 µg mL⁻¹ ve 8 µg mL⁻¹ çinko konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.



Şekil 3.8. Farklı çinko konsantrasyonlarının *S. ellipsoideus*'da GR aktivitesi üzerine etkisi

BÖLÜM 4. TARTIŞMA

Yapılan bu çalışma ile *S. ellipsoideus* alginin çinko, ağır metalinin farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılması sonucu bu metallerin klorofil-*a* miktarında, biyokütlesinde ve antioksidan parametrelerinde [toplam süperoksit dismutaz (SOD), mangan süperoksit dismutaz (MnSOD), demir süperoksit dismutaz (FeSOD), bakır çinko süperoksit dismutaz (CuZnSOD), glutatyon redüktaz (GR) ve askorbat peroksidaz (APOD)] oluşan değişimler araştırılmıştır.

Algler üzerine yapılan çalışmalarda alglerdeki metal alınımının ve toksisitesinin, ortamdaki metal derişimine, metal türlerine, metalin kimyasal yapısına, organizmanın toleransına, metal etkileşimine vereceği yanıt ve alg türüne bağlı olduğu bildirilmiştir (Crist ve ark., 1981; Singh ve ark., 1989; Gupta ve ark., 2001; Campbell, 1995; Aksu, 1998; Soldo ve ark., 2005). Yapılan çalışmada çinko ağır metale bağlı olarak *S. ellipsoideus* alginin klorofil-*a* miktarının, biyokütlesinin ve antioksidan parametrelerinin farklı derecelerde etkilendiği gözlenmiştir.

Alglerde ağır metallerin olumsuz etkileri sonucu büyümeleri inhibe olmakta ve bu toksik maddeler büyümenin lag fazının bozulmasına neden olmaktadır (De Filippis ve ark., 1981; Stevenson ve ark., 1996). Bu sebeple organizmada hücre bölünmesi engelleneceği için büyümenin de durduğu belirtilmektedir (Elbaz ve ark., 2010). Çalışmamızda strese maruz bırakılmayan kontrol grubunda biyokütle miktarı yedi gün boyunca artış gösterirken, artan çinko konsantrasyonuna bağlı olarak biyokütle ve klorofil-*a* miktarı azalmıştır. Çok yüksek konsantrasyonlarda ise algler canlılıklarını kaybetmişlerdir.

Li ve ark. (2006), *Pavlova viridis* algi üzerinde çinko ve bakır ağır metallerinin klorofil-*a* üzerine etkilerini incelemişlerdir. Yapılan çalışmada ağır metallerin artan

konsantrasyonlarına bağılı olarak klorofil-*a* miktarında ve fotosentez hızında azalma olduğunu belirtmişlerdir. Bajuz (2010), *C. vulgaris* algine bakır, kurşun ve kadmiyum ağır metallerini uygulamış, ağır metallerin artan konsantrasyonlarında hücre sayısında azalma olduğunu gözlemlemiştir. Surosz ve Palinska (2004), *Anabaena flos-aquae* ile yaptıkları bir çalışmada bakır uygulanmasının algin gelişimini gerilettiğini ve artan bakır konsantrasyonu ile algin klorofil-*a* ve biyokütle miktarlarının azaldığını belirlemişlerdir. Wong ve Chang (1991), *Chlorella pyrenoidosa* algi üzerine bakır, krom ve nikel uygulamışlar, bu ağır metallerin klorofil-*a* miktarı, büyüme ve fotosentez hızları üzerine etkilerini incelemişlerdir. Bu ağır metallerin artan konsantrasyonlarında klorofil-*a* miktarı, büyüme ve fotosentez hızlarında azalma olduğunu gözlemlemiştir. Sunulan çalışmada *S. ellipsoideus* alginin biyokütlesinin ve klorofil-*a* miktarının artan çinko konsantrasyonuna bağılı olarak azaldığı gözlenmiştir. Biyokütle ve klorofil-*a* miktarındaki en şiddetli inhibisyonun uygulanan en yüksek çinko konsantrasyonunda ($8 \mu\text{g mL}^{-1}$) ortaya çıktığı gözlenmiştir. Ağır metaller klorofil pigment biyosentezini ve bu süreçte görev yapan enzimleri inhibe etmektedir (De Fillippis ve Pallaghy, 1994). *S. ellipsoideus* alginde çinko etkisinde klorofil-*a* miktarlarındaki azalma klorofil biyosentez sürecinin bozulmasının, klorofil-*a* biyosentezinde görevli enzimlerin inhibe edilmesinin ya da klorofilin parçalanmasının sonucu olabilir.

Sunulan çalışmada çinko için toplam SOD aktivitesi 4 ve $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ çinko konsantrasyonlarında kontrole göre artış gösterirken; MnSOD aktivitesi 2 ve $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ çinko konsantrasyonlarında, FeSOD aktivitesi 2, 4, 6 ve $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ çinko konsantrasyonlarında ve Cu/ZnSOD aktivitesi $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ çinko konsantrasyonlarında kontrole göre artış göstermiştir. SOD, bitkilerdeki antioksidant sistemin önemli bir enzimatik bileşenidir ve süperoksit radikalini ($\text{O}_2^{\cdot-}$) hidrojen perokside (H_2O_2) parçalayan reaksiyonu katalizler (Raychaudhuri and Deng, 2000). SOD'nin hücre içinde lokalize olduğu bölgeye ve enzimin aktif bölgesinde bulunan metal iyonunun tipine göre farklılık gösteren üç izozimi vardır. Bunlardan FeSOD kloroplastlarda, MnSOD mitokondrilerde, Cu/ZnSOD ise hem sitosolde hem de kloroplastlarda bulunmaktadır (Raychaudhuri ve Deng, 2000). Bu sebeple farklı SOD izozimleri farklı hücresel proteinleri korumaktadır (Lesser ve Stochaj, 1990). Antioksidan enzimler

oksidatif stresin önlenmesinde önemli bileşenler olması sebebiyle, stres oluşturan koşullarda enzim aktivitesi genellikle artmaktadır (Allen, 1995; Mazhoudi ve ark., 1997). Rai ve ark. (2013), Cr (IV) uyguladıkları *C. vulgaris*' de artan krom konsantrasyonlarının SOD aktivitesini önce arttırdığını, konsantrasyonlar arttıkça aktivitenin azaldığını belirtmişlerdir. Elbaz ve ark. (2010), *Chlamydomonas reinhardtii*' de artan civa konsantrasyonlarının SOD enzimlerinin aktivitesinde önce artışa, sonra azalmaya neden olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmaların sonuçları bizim yapmış olduğumuz çalışma ile paralellik göstermektedir. SOD aktivitesinde önce artış sonra düşüş görülmesinin sebebinin, kromun yüksek konsantrasyonlarının SOD geninin etkilemesi olabileceğini belirtmişlerdir. Elbaz ve ark. (2010), yaptıkları çalışmada *Chlamydomonas reinhardtii*' de artan civa konsantrasyonlarının SOD enzimlerinin aktivitesinde önce artışa, sonra azalmaya neden olduğunu tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda çinko etkisine maruz bırakılan *S. ellipsoideus*' da $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ çinko konsantrasyonlarındaki APOD aktivitesi kontrole göre artış gösterirken; $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ çinko konsantrasyonlarındaki APOD aktivitesi kontrole göre düşüş göstermiştir. Nagalakshmi ve Prasad (1998) artan bakır konsantrasyonlarında *Scenedesmus bijugatus* alginde APOD aktivitesinde artış gözlemlemişlerdir. Devez ve ark. (2005), *Scenedesmus obliquus* üzerine yaptıkları çalışmada artan bakır konsantrasyonlarına bağlı olarak APOD aktivitesinde artış olmasına rağmen belli konsantrasyonlardan sonra sabit kaldığını belirtmişlerdir. Melegari ve ark. (2013), *Chlamydomonas reinhardtii* yeşil algine CuO uyguladıklarında, konsantrasyonların artışına bağlı olarak APOD aktivitesinde artış olduğunu belirtmişlerdir. Elbaz ve ark. (2010), *Chlamydomonas reinhardtii* alginde civa ile yaptıkları çalışmada APOD enziminin aktivitesi ile reaktif oksijen türleri seviyesinin arttığını belirtmişlerdir. Yapılan tüm bu çalışmaların bizim çalışmamızla benzerlik gösterdiği görülmektedir. Artan APOD aktivitesinin artan reaktif oksijen türleri konsantrasyonuna işaret ettiği belirtilmektedir (Nagalakshmi ve Prasad, 1998). $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ çinko konsantrasyonundaki APOD aktivitesindeki azalma enzimlerin yüksek dozda ağır metal uygulanması sonucu yapısının bozulmasından kaynaklanmış olabilir.

Çalışmamızda GR aktivitesi, $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ çinko konsantrasyonunda artış gösterirken uygulanan diğer dozlarda kontrole göre azalma göstermiştir. Devez ve ark. (2005), *S. obliquus* algine bakır uyguladıkları çalışmalarında uygulanan bakır konsantrasyonlarında GR aktivitesinde artış olduğunu belirtmişlerdir. Bajguz (2010), *Chlorella vulgaris* alginde bakır, kurşun ve kadmiyum ağır metalleri uygulandıktan sonraki enzim aktivitesine baktıklarında ağır metal konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak GR enzim etkinliğinde artış gözlemlenmiştir. Bizim çalışmamızda en yüksek GR aktivitesi $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ çinko konsantrasyonunda gözlemlenmiştir. Artan GR seviyesinin organizmadaki ağır metal stresine karşı bir yanıt oluşturacağı ve antioksidan parametrelerin herhangi bir stres koşulu altında anti-stres görevi olduğu belirtilmiştir (Sharma, 2015). Çalışmamızda $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonundan sonraki daha yüksek konsantrasyonlarda enzim aktivitesinde azalmalar görülmüştür. Uygulanan yüksek konsantrasyonlar GSH metabolizmasındaki enzimlerin yapısını bozmuş ve hücre zarında oksidatif hasara sebep olmuş olabilir. Bu yüzden belli seviyeden sonra GR aktivitesinde azalma görülmüş olabilir.

Sonuç olarak çalışmamızda uyguladığımız çinko ağır metalinin *S. ellipsoideus* türü üzerindeki etkisinin konsantrasyona bağlı olarak değiştiği söylenebilir. Çinko konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak biyokütle ve klorofil-*a* miktarında azalmanın meydana gelmesi, *S. ellipsoideus* için çinko elementinin artan konsantrasyonlarının toksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Çinko uygulamaları sonucunda 4 ve 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonlarında, SOD aktivitesinin kontrole göre önemli derecede artış göstermesi, *S. ellipsoideus* alginde çinko toksisitesi nedeniyle süperoksit radikali konsantrasyonunun arttığını göstermektedir. SOD'un katalizlediği reaksiyon sonucu oluşan H_2O_2 'yi parçalamaktan sorumlu olan APOD enziminin aktivitesi ise aynı çinko konsantrasyonlarında kontrole göre artış göstermiştir. Bu durumda çinko elementinin *S. ellipsoideus* alginde 4 ve 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonlarının üstünde APOD enziminin sentezini ve/veya aktivitesini selektif olarak belli oranda inhibe ettiği ve toksik etkisini bu şekilde gösterdiği sonucuna varılabilir. Nitekim 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonda çinko uygulamaları sonucunda, SOD ve APOD aktivitelerine benzer şekilde GR aktivitesinde de kontrole göre önemli derecede artış belirlenmiştir. GR enzimi, hücrelerde glutatyon molekülünün indirgenmesini sağlayan reaksiyonu

katalizlemekten sorumludur. İndirgenmiş glutatyonun yapısındaki elektronlar da H_2O_2 'nin detoksifikasyonunu sağlayan reaksiyonda kullanılmak üzere APOD enzimine verilmektedir. Elde ettiğimiz sonuçlar, çinko uygulanan *S. ellipsoideus* alginde bir makinanın dişlileri gibi birlikte çalışan antioksidan enzimlerin $4 \mu g mL^{-1}$ konsantrasyonuna kadar birlikte uyumlu çalıştıklarını ve bu dozun üstünde aktivitelerinin bozulmaya başladığını ve çinko ağır metalinin bu enzimlerin yapısını ve çalışma şeklini inhibe ettiğini göstermektedir.

BÖLÜM 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Sonuç

Sonuç olarak çalışmamızda, biyokütle ve klorofil-a miktarındaki azalmanın artan çinko (Zn) konsantrasyonlarına ve zamana bağlı olduğu bulunmuştur. Araştırmamızda *S. ellipsoideus* antioksidan enzimleri üzerine ise, Zn ağır metalinin etkisinin konsantrasyonlardaki artışla yakından ilişkili olduğu bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda ağır metal konsantrasyonu arttıkça, aşırı reaktif oksijen türü üretiminin nükleik asitler, proteinler ve lipitler gibi pek çok hücrel fonksiyonu etkilediği belirtilmektedir (Mittler ve ark., 2004). Bu sebeple ağır metallerin toksik etkisi, üretilen serbest radikallerin hücredeki metabolik dengeyi bozmasıyla gerçekleşmiştir.

5.2. Öneriler

Bu çalışmanın amacı; uzun vadede sucul ekosistem üzerine metal stresinin olası etkisinin belirlenmesi için yapılan ekotoksikoloji çalışmalarına katkıda bulunmaktır. Bu sebeple ağır metallerin etkisi altında klorofil-a ve biyokütle miktarlarındaki değişimler ile antioksidan parametrelerin aktivitelerindeki değişimler araştırılmıştır. İlerleyen periyotlarda *S. ellipsoideus* algi üzerinde ağır metallerin birikim mekanizması ve antioksidan parametrelerin oluşturduğu yanıtlar ve bunların genetik temeli ile ilgili çalışmalar yapılabilir. Ayrıca çinko uygulamaları sonucunda hangi radikallerin ne oranda oluştuğu belirlenerek, hücrel hasarlardan sorumlu olan radikal çeşidi veya çeşitleri belirlenebilir. Antioksidant sistemin enzimatik olmayan bileşenlerinin (askorbik asit, glutatyon, alfa tokoferol, karotenoidler) miktarlarındaki değişimler de incelenerek, antioksidant savunma sisteminin koruyucu etkisi daha ayrıntılı bir şekilde incelenebilir.

KAYNAKLAR

- Akkuş, İ., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, 38(5): 1-123.
- Aksu, Z., 1998. Biosorption of Heavy Metals by Microalgae in Batch ve Continuous Systems Bioscience, 37-53.
- Allan, R., 1997. Introduction: mining ve metals in the environment. J. Geochem. Expl. 58:95–100.
- Altuner, Z., 1994. Tohumusuz Bitkiler Sistematigi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Yayınları, 2(1).
- Asada, K., 1999, The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens ve dissipation of excess photons, Annual Review of Plant Physiology ve Plant Molecular Biology, 50, 601-639.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances ve Disease Registry), 2005. Toxicological Profile for Zinc. Public Health Service, U.S. Department of Health ve Human Services, 307p, Atlanta, GA.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances ve Disease Registry), 2006. Public Health Service, U.S. Department of Health ve Human Services, Atlanta, GA. Available online at <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/>
- Barceloux, D. G., 1999b. Zinc. Clinical Toxicology. 37 (2), 279-292.
- Baş, A.L., Demet, Ö., “Çevresel toksikoloji yönünden bazı ağır metaller”, Ekoloji, 5: 42- 46 (1992).
- Benzer, F., Ozan, S.T., 2003. Fasciola hepaticae Enfekte Koyunlarda Lipid Peroksidasyonu, Antioksidan Enzimler ve Nitrik Oksit Düzeyleri, Turk J Vet Anim Sci, 27, 657-661.
- Beyer, W. F., Fridovich, I., 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions, Analytical Biochemistry, 161, 559-566.
- Blanck, H. ve Wangberg, S. A., 1988. Validity of an Ecotoxicological Test System: Short- Term ve Long- Term Effects of Arsenate on Marine Periphyton Communities in Laboratory Systems. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 45: 1807- 1815.

Botanica Acta, 104; 169-171.

Bradford, M. M., 1976. A Rapid ve Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

Braek, G.S., Malnes, D., Jensen, A., 1980. Heavy metal tolerance of marine phytoplankton. IV. Combined effect of zinc ve cadmium on growth ve uptake in some marine diatoms, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 42, 39-54.

Bremner. I., 1974. Heavy metal Toxicities *Quart. J. Biophys.*, 7,74–124.

Campbell, P. G. C., 1995. Interaction Between Trace Metals ve Aquatic Organism: A Critique of The Free- Ion Activity Model. *Metal Speciation ve Bioavailability in Aquatic Systems*. 3: 45- 102.

Campbell, P.G.C., Stokes, P.M.,1985. Acidification ve toxicity of metal to aquatic biota. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42, 2034-2049.

Chen, G., 2009. Fu Combined effect of copper ve cadmium on *Chlorella vulgaris* growth ve photosynthesis-related gene transcription *Aquatic Toxicology* 94, 56–61.

Cho, D. Y., Lee, S. T., Park, S. W., Chung, A. S., 1994. Studies on the Biosorption of Heavy Metals on to *Chlorella vulgaris*. *J. Environ. Sci. Health Part A*. A29: 389-409.

Choudhary, M., Jetley, U.M., Abash, M., Zutshi, S., Tasneem, F., 2007. Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, ve superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Arthrospira platensis*-S5, *Ecotoxicology ve Environmental Safety*, 66, 204–209.

Collard, J. M., Matagne, R. F., 1994. Cd+2 Resistance in Wild- Type ve Mutant Strains of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Exp. Bot.*, 34: 235- 244.

Crist, H., Oberholser, K., Shank, N., Nguyen, M., 1981. Nature of Bonding Between Metallic Ions ve Algal Cell Walls. *Environ Sci Technol.*, 15: 1212- 121.

Cross, C.E., Hallivel, B., Borish, E.T., 1987. *Ann Intern Med.* 107: 526- 545.

Çelekli, A., Balcı, M., Bozkurt, H., 2008. Modelling of *Scenedesmus obliquus*; Function of Nutrients with Modified Gompertz Model. *Bioresource Technology* (In press).

Çetinkaya, G., Dönmez, Z., Aksu, A., Öztürk, T., Kutsal, A., 1999. Comparative study on heavy metal biosorption characteristics of some algae, *Process Biochemistry*, 34, 885–892.

- De Filippis, L. F., Hampp, R., Ziegler, H., 1981. . The effect of sub-lethal concentration of zinc, cadmium ve mercury on *Euglena*, *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, (128) 407-411
- De Jong, L., Diana, C., Campos, J.R., Arnoux, A., Pellegrini, L., 1994. Toxicity of methyl mercury ve mercury (II) chloride to a brown alga *Cystoseira barbara* (Fucales) under laboratory culture conditions--Detoxifying role of calcium, *Bot. Mar.*, 4, 367-379.
- Depledge, M.H., Weeks, J.M., Bjerregaard, P., 1995. Heavy metals in: *Handbook of Ecotoxicology*. Blackwell Science., 2, 79-105.
- Devez, D., Geoffray, L., Vermet, G., Popovic, R., 2005. Dtermination of photosynhtetic ve enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper ve fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*. *Aquatic toxicology* 74 (2), 150-159.
- Dönmez, G., Aksu, Z., 2002. Removal of Chromium (VI) From Saline Wastewaters by *Dunaliella* Species. *Process Biochemistry*., 38: 751- 762.
- Dündar, Y., Aslan, R., 2000. Hekimlikte Oksidatif Stres ve Antioksidanlar, *Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları*, 29: 95-101.
- Elbaz, A., Wei, Y.Y., Meng, Q., Zheng, Q., Yang, Z.M., 2010. Mercury-induced oxidative stress ve impact on antioxidant enzymes in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Ecotoxicology*, 19,1285-1293.
- Francesconi, K.A., Hunter, D.A., Bachmann, B., Raber, G., Goessler, W., 1999. Article first published online: Uptake ve transformation of arsenosugars in the shrimp *Crangon crangon*, *Applied Organometallic Chemistry*, 13, 10-18.
- Fridovich, I. 1986. Superoxide dismutases. In: Meister A (ed) *Advances in enzymology ve related areas of molecular biology*, vol 58, Wiley, New York, pp 61–97
- Gadd, G. M., 1988. Accumulation of Metals by Microorganisms ve Algae. In “*Biotechnology*”60: 401- 434.
- Garnham, G. W., Codd, G. A., Gadd, G. M., 1992. Kinetics of Uptake ve Intracellular Location of Cobalt, Manganese ve Zinc in the Estuarine Green Algae *Chlorella salina*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37: 270- 276.
- Gensemer, R.W., 1991. The effects of pH ve aluminum on the growth of the acidophilic diatom *Asterionella ralfsii* var. *americana*, *Limnol. Oceanogr.*, 36, 123-131.
- Greger, M., Tillberg, J. E., Johansson, M., 1992. Aluminum effects on *Scenedesmus obtusiusculus* with different phosphorus status. II. Growth, photosynthesis ve pH, *Physiol. Plant.*, 84, 202-208.

- Gupta, S.L., 1989. Interactive effects of nitrogen ve copper on growth of cyanobacterium *Microcystis*, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 42, 270-275.
- Gupta, V., Shrivastava, A., Jain, N., 2001. Biosorption of chromium (VI) from aqueous solution by green algae *Spirogyra* species. Water research., 35, 4079- 4085.
- Güner, H., Aysel, V., 1996. Tohumusuz Bitkiler Sistematığı. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, 108, 251s, İzmir.
- Hall, J., Healey, F. P., Robinson, G. G. C., 1989. The Interaction of Chronic Copper Toxicity with Nutrient Limitation in Two Chlorophytes in Batch Culture. Aquat. Toxicol., 14: 1- 14.
- Halliwell, B, Gutteridge, J. M. C., Cross, C.E.,1992. Free Radicals,Antioxidants ve Human Disease: Where Are We Now? J Lab Clin Med 119: 598-620.
- Halliwell, B. 1987. Free radicals ve metal ions in health ve disease. Proc Nutr Soc. Feb; 46(1):13-26.
- Halliwell, B., Chirico, S. 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement ve significance. Am. J Clin. Nutr., 57, 715S-725.
- Hilmi, Ş., 1994. Oksidanlar ve antioksidanlar, THTDrg, 48,44-49.
- HOIan, Z.R, B.Volesky ve Prasetyo. 1993 Biosorption of cadmium by biomass of marine algae, Biotechnol.Bioeng., 41: 819-825 p.
- Holan, Z.R., Volesky, B., 1994. Biosorption of lead ve nickel by biomass of marine algae, Biotechnol. Bioeng., 43, 1001-1009.
- Hu, H., 2000. Exposure to metals. Occupational ve Environmental Medicine, 27, 983-996.
- Hurst, R., Bao, Y., Jemth, P., Mannervi, B., Williamson, G., 1997. Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase Activity of Rat Class Theta Glutathione Transferase T2-2. Biochem. Soc. Trans., 25, S559.
- Irmer, U., Wachholz, I., Schafer, H., Lorch, D. W., 1986. Influence of Lead on *Chlamydomonas reinhardtii* Danegard (Volvocales, Chlorophyta), Toxicity ve Ultrastructural Changes. Environmental ve Experimental Botany., 26: 97- 105.
- İnaç, A. 2001. *Scenedesmus obliquus* (Turp.) Kuetzing ve *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Brebisson'nın laboratuar ortamında üretilme şartlarının araştırılması ve fizyolojileri. Doktora Tezi, Gazi Üniv. Fen Bil. Enst. Ankara.
- Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S., 2004. Metallerin Çevresel Etkileri –I, II, III, İTÜ Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü, 2.

- Kayhan, F. E., Muşlu, M. N., Koç, N. D., 2009. Bazı ağır metallerin sucul organizmalar üzerinde yarattığı stres ve biyolojik yanıtlar. *Journal of Fisheries Science*, 3(2), 153-162.
- Kennish MJ (1998) *Pollution Impacts on Marine Biotic Communities*. CRC Press, London.
- Kessler, E. 1991. *Scenedesmus*: Problems of a highly variable genus of green algae.
- Klerks, P.L., Weis, J.S., 1987. Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: A review, *Environ. Pollut.*, 45, 173-205.
- Komarek, J. ve Fott, B. 1983. Chlorococcales. 7. Teil. 1. Halfte. In: J. Elster ve W. Ohle (Eds) *Das Phytoplankton des Süßwassers*, E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, 1049 p.
- Komarek, J., Fott, B., 1983. *Das phytoplankton des süßwassers*, Systematik und Biologie, Stuttgart, 1043 p.
- Lesser, M.P., Stochaj, W.R. 1990. Photoadaptation ve protection against active forms of oxygen in the symbiotic prokaryote *Prochloron* sp. ve its ascidian host. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1530–5.
- Li, H.Y, Yu, Z., Cao Y. Wang W. N 2010 Purification ve Characterization Of Superoxide Dismutase from *Panax ginseng* (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/bmc.1428
- Li, M., Hu, C., Zhu, Q., Chen, L., Kong, Z., Liu, Z., 2006. Copper ve zinc induction of lipid peroxidation ve effects on antioxidant enzyme activities in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae), *Chemosphere*, 62, 565–572.
- Mackinney, G., 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. *The Journal of Biological Chemistry*, 14, 315-322.
- Mallick, N., 2004. Copper- Induced Oxidative Stress in the Chlorophycean Microalga *Chlorella vulgaris*: Response of the Antioxidant System. *J. Plant Physiol.*, 161: 591- 597.
- Mamnoya, F., Pratap, H. B., Mtolera, M., Bjork, M., 2001. The effect of copper on the daily growth rate ve photosynthetic efficiency of the brown macroalgae *Padina boergesenii* in: Richmond, M. D. ve Francis, J. (Eds) *Marine Science*. Tanzania. S 185-192.
- Mehta, S. K., Gaur, J. P., 1999. Heavy-metal-induced proline accumulation ve its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris*. *New Phytol.*, 143, 253-259.
- Mehta, S. K., Gaur, J. P., 2005. Use of Algae for Removing Heavy Metal Ions from Wastewater: Progress ve Prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25, 113-152

- Nagalakshmi, N., Prasad, M.N.V., 1998. Copper-induced oxidative stress in *Scenedesmus bijugatus*: protective role of free radical scavengers. *Bulletin of environmental contamination ve toxicology*, 61, 5, 623-628.
- Nagalakshmi, N., Prasad, M.N.V., 2001. Responses of glutathione cycle enzymes ve glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*, *Plant Sci.*, 160, 291-9.
- Nalimova, A.A., Popova, V.V., Tsoglin, L.N., Pronina, N.A., 2005. The Effects of copper ve zinc on *Spirulina platensis* growth ve heavy metal accumulation in its cells, *Russian Journal Of Plant Physiology* Vol. 52 No. 2.
- Nyholm, N., Kallqvist, T., 1989. Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae, *Environ. Toxicol. Chem.*, 8, 689-703.
- Pawlik, B., Skowrofski, T., 1994. Transport ve toxicity of cadmium: Its regulation in the cyanobacterium *Synechocystis aquatilis*, *Environ. Exp. Bot.*, 34, 225-233.
- Pempkowiak, J., Kosakowska, A., 1998. Accumulation of cadmium by green algae *Chlorella vulgaris* in the presence of marine humic substances, *Environ. Int.*, 24, 583-588.
- Pettersson A., Bergman, B., 1985. Physiological ve structural responses of the cyanobacterium *Anabaena cylindrica* to aluminium, *Physiol. Plant.*, 63, 153-158.
- Phillips, D.I.H., 1995. Bioaccumulation in: *Handbook of Ecotoxicology*, Blackwell Science, Oxford., 1, 378-396.
- Pillsbury R., Kingston, J.C., 1990. The pH-independent effect of aluminum on cultures of phytoplankton from an acidic Wisconsin lake, *Hydrobiologia*, 194, 225-233.
- Pinto, E., Sigaud-Kutner, T.C.S., Leitao, M.A.S., Okamoto, O.K., Morse, D., Colepicolo, P., 2003. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J. Phycol.*, 39, 1008-1018.
- Priya, B., Premanandh, J., Dhanalakshmi, R.T., Seethalakshmi, T., Uma, L., Prabakaran, D., Subramanian, G., 2007. Comparative analysis of cyanobacterial superoxide dismutases to discriminate canonical forms, *BMC Genomics*, 8, 435.
- Rai, L. C., Gaur, J. P., Kumar, H. D., 1981. *Phycology ve Heavy- Metal Pollution*. *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.*, 56: 99- 151.
- Rai, U.N., Tripathi, R.D., Kumar, N., 1992. Bioaccumulation of chromium ve toxicity on growth, photosynthetic pigments, photosynthesis, in vivo nitrate reductase activity ve protein content in a chlorococcalean green alga *Glaucocystis*, *Chemosphere*, 25, 1721-1732.
- Rainbow, P.S., "Biomonitoring of Heavy Metal Availability in the Marine Environment", *Marine Pollution Bulletin*, Vol.31, pp.183-192, (1995)

- Ralph, P. J., Burchett, M. D., 1998. Photosynthetic Response of *Halophila ovalis* to Heavy Metal Stress. *Environmental Pollution* 103: 91- 101.
- Rijstenbil, J.W., Derksen, J.W.M., Gerringa, L.J.A., Poortvliet, T.C.W., Sandee, A., Vanderberg, M., Vandire, J., Wijnholds, J.A., 1994. Oxidative stress induced by copper: Defense ve damage in the marine planktonic diatom *Ditylum brightwellii* grown in continuous cultures with high ve low zinc levels, *Mar. Biol. (Berlin)*, 119, 583-590.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., Stanier, R. Y., 1979. Generic assignments, strain histories ve properties of pure cultures of cyanobacteria, *Microbiology*, 111, 1-61.
- Round, F. E., 1973. *The Biology of Algae*, 2nd. Ed., Edward Arnold, London. P, 910.
- Sandau, E., Pulz, O., 1996. *Acta Biotechnologica* Heavy metal sorption by microalgae, *Acta Biotechnol.*, 16, 227-235.
- Sgherri, C. L. M., Loggini, B., Puliga, S., Navari-Izzo, F., 1994. Antioxidant system in *Sporobolus stapfianus*: changes in response to desiccation ve rehydration, *Phytochemistry*, 35(3), 561-565.
- Sheata, S.A., Lasheen, M.R., Kobbia, I.A., Ali, G.H., “Toxic Effect of Certain Metals Mixtureon Some Physicological ve Morphological Characteristics of Freshwater Algae”, Vol.110, p.p.119-135, (1999)
- Singh, D. P., Khare, P., Bisen, P. S., 1989. Effects of Ni⁺², Hg⁺² ve Cu⁺² on Growth, Oxygen Evolution ve Photosynthetic Electron Transport in *Cylindrospermum* IU 942. *J. Plant Physiol.*, 134: 406- 412.
- Simmons, N.K.,1997. *The Effects of Atrazine on Competitive Interactions of Three Green Algae*. The University of Manitoba Faculty of Graduate Studies, Ph.D.Thesis, 186p, Manitoba.
- Sing, S., Rai, B., Rai, L., 2001. Ni (II) ve Cr (VI) Sorption Kinetics by microcystis in single ve multimetatlic system process *Biochem.* 36, 1205-1213.
- Sipiropornadulsil, S., Traina, S., Verma, D.P., Sayre, R.T., 2002. Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *Plant Cell.*, 14, 2837-2847.
- Skowronski, T., Przytocka- Jusiak, M., 1986. Cadmium Removal by Green Alga *Stichococcus bacillaris*. *Chemosphere.* 15: 77- 79.
- Smirnoff, N.,1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit ve desiccation, *New Phytol.*, 125, 27–58.
- Smith, G. M., 1950. *The Fresh-Water Algae of the United States*. McGraw-Hill Book Company, Inc., 718p, London.

- Sofyan, A., 2004. Toxicity of Metals to Green Algae ve *Ceriodaphnia dubia*: The Importance of Water Column ve Dietary Exposures. The Graduate School University of Kentucky, Dissertation, 161p, Kentucky.
- Soldo, D., Hari, R., Sigg, L., Behra, R., 2005. Tolerance of *Oocystis nephrocitioides* to Copper: Intracellular Distribution ve Extracellular Complexation of Copper. *Aquatic Toxicology*, 71, 307- 317.
- Solisio, C., Lodi, A., Soletto, D., Converti, A., 2008. Cadmium biosorption on *Spirulina platensis* biomass, *Bioresource Technology* 99, 5933-5937.
- Sotol, P., Gaetel, H., Hidalgo, M. E., 2001. Assessment of catalase activity, lipid peroxidation, chlorophyll-a, ve growth rate in the freshwater green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to copper ve zinc, *Latin American Journal of Aquatic Research*, 280- 285, doi: 10.3856/vol39-issue2.
- Srivastava, A., Bhargava, P., Rai, L., 2005. Salinity ve copper-induced oxidative damage ve changes in the antioxidative defence systems of *Anabaena doliolum*. *Microbiol. Biotech.*, 21, 1291-1298.
- Stevenson, R., Bothwell, L., Lowe, L. 1996. *Algal Ecology, Freshwater Benthic Ecosystems*, 3-30.
- Surosz, W., Palinska, K. A., 2004. Effects of heavy metal stress on cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 48, 40-48.
- Surosz, W., Palinska, K. A., 2004. Effects of heavy metal stress on cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 48, 40-48.
- Sze P., 1986. *A Biology of the Algae*, Wm. C. Brown, Dubuque, Iowa.
- Takeda, T., Nakano, Y., Shigeoka, S., 1993. Effects of selenite, CO₂ ve illumination on the induction of selenium-dependent glutathione peroxidase in *Clamydomonas reinhardtii*, *Plant Sci.*, 94, 81-88.
- Taylan, Z. S., Özkoç, H. B., 2007. Potansiyel ağır metal kirliliğinin belirlenmesinde akuatik organizmaların biokullanılabilirliği. *BAÜ FBE Dergisi*, 9(2): 17-33.
- Ting, YP., F. Lawson, ve LG. Prince. 1991. Uptake of cadmium ve zinc by the alga *Chlorella vulgaris*: II Multi-ion stiation, *Biotechnol. Bioeng.* 37: 445 -455.
- Tripathi, B. N., Meththa, S. K., Amar, A., Gaur, J. P., 2006. Oxidative stress in *Scenedesmus* sp. during short- ve long-term exposure to Cu²⁺ ve Zn²⁺, *Chemosphere*, (62) 538-544, doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.06.031
- U.S. EPA, 1992. R.E.D. Facts. U.S. Environmental Protection Agency. EPA-738-F92-007, 4p, Washington, DC.

- U.S. EPA, 2005. Toxicological Review of Zinc ve Compounds. U.S. Environmental Protection Agency, EPA/635/R-05/002, CAS No. 7440-66-6, 71p, Washington, DC.
- Urso, M.L., Clarkson, P.M., 2003. Oxidative stress, exercise, ve antioxidant supplementation, *Toxicology*, 189, 41-54.
- Valentine, J.S., Wertz, D.L., Ltons, T.J., Liou, L.L., Goto, J.J., Gralla, E.B., 1998. The dark side of dioxygen biochemistry *Current Opinion in Chemical Biology*, 2, 253–262.
- Veglio, F., Beolchini, F., 1997. Removal of Metals by Biosorption: A Review. *Hydrometallurgy*, 44, 301-316.
- Wang, S. Y., Jiao, H., Fausth, M., 1991. Changes in ascorbate, glutathione ve related enzyme activity during thidiazuron-induced bud break of apple, *Plant Physiology*, 82, 231-236.
- WHO (World Health Organization), 2001. Copper. Environmental Health Criteria 221. IPCS-International Programme on Chemical Safety, WHO, Geneva.
- Wong, P. K., Chang, L., 1991. Effects of Copper, Chromium ve Nickel on Growth, Photosynthesis ve Chlorophyll a Synthesis of *Chlorella pyrenoidosa* 251. *Environmental Pollution*. 72: 127- 139.
- Wood, J.M., Wang, H.E., 1985. Strategies for microbial resistance to heavy metals, *Chemical Processes in Lakes*, ed: Stumm V., Wiley, Pp: 81-98.
- Wu, T. M., Lee T. M., 2008. Regulation of activity ve gene expression of antioxidant enzymes in *Ulva fasciata* Delile (*Ulva*, *Chlorophyta*) in response to excess copper. *Phycologia*, 47: 346-360.
- Xylander, M., Braune, W., 1994. Influence of nickel on the green alga *Haematococcus lacustris* Rostafinski in phases of its life cycle, *J. Plant Physiol.*, 144, 86-93.
- Yanbeyi, S. (1999). Aspirin ve antioksidant buthylated hydroxyanisole’ün tavşanlarda eritrosit total katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri. Ondokuz Mayıs Üni. Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Samsun, 88s (yayınlanmamış).
- Yılmaz, A.B., Toker, T., Sayın, S., Doğanay, G., 2006. *Spirulina platensis* (*Cyanophyta*) “in gelişimine selenyum”ün etkisi, Mustafa Kemal Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, s, 2-3.
- Yu, Q., Matheickal, J. T., Yin, P., Kaewsarn, P., 1998. Heavy Metal Uptake Capaties of Common Marine Macro Algal Biomass. *Wat. Res.*, 33: 1534- 1537.
- Zamocky, M., Furtmuller, P.G., Obinger, C., 2008. Evolution of catalases from bacteria to humans, *Antioxidants ve Redox Signaling*, 10, 1527–1548.

Zhang, W. X., Majidi, V., 1994. Monitoring the Cellular Response of *Stichococcus bacillaris* to Exposure of Several Different Metals Using in vivo P- 31 NMR ve Other Spectroscopic Techniques. *Environ. Sci. Technol.* 28: 1577- 1581. 199- 223.

ÖZGEÇMİŞ

Hediye Elif Kılıç, 18.12.1974'de Diyarbakır'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Diyarbakır'da tamamladı. Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü 1998 yılında bitirdi. 2013 yılında Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü'nde Yüksek Lisans eğitime başladı. Aynı tarihte Sakarya Üniversitesi Vakfı Özel Anadolu Lisesi'nde Biyoloji Öğretmeni olarak çalışmaya başladı. Halen aynı kurumda Biyoloji Öğretmeni olarak çalışmaya devam etmektedir.