

OCAK, 2013

Yüksek Lisans - Biyoloji Bölümü

MEHMET KAPI

**GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KADMİYUM VE REACTIVE RED 120**  
**UYGULAMALARINA *Scenedesmus quadricauda* var.**  
***longispina*'nın BİYOKİMYASAL CEVABI**

**BİYOLOJİ BÖLÜMÜ**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MEHMET KAPI**

**OCAK 2013**

**Kadmiyum ve Reactive Red 120 Uygulamalarına  
*Scenedesmus quadricauda* var. *longispina*'nın Biyokimyasal  
Cevabı**

**Gaziantep Üniversitesi**

**Biyoloji Bölümü**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Danışman**

**Doç. Dr. Abuzer ÇELEKLİ**

**Mehmet KAPI**

**Ocak 2013**

©2013 [Mehmet KAPI].

T.C.  
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Tezin Adı : Kadmiyum ve Reactive Red 120 Uygulamalarına *Scenedesmus quadricauda* var. *longispina* 'nın Biyokimyasal Cevabı

Öğrencinin, Adı Soyadı : Mehmet KAPI

Tez Savunma Tarihi : 23.01.2013

Fen Bilimleri Enstitüsü onayı



Doç. Dr. Metin BEDİR

FBE Müdürü

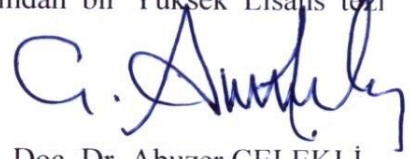
Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.



Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Enstitü ABD Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.



Doç. Dr. Abuzer ÇELEKLİ

Tez Danışmanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Canan CAN

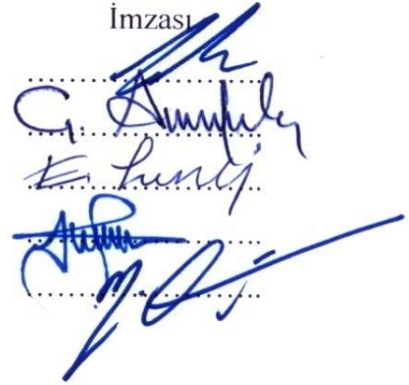
Doç. Dr. Abuzer ÇELEKLİ

Yrd. Doç. Dr. Erdihan TUNÇ

Yrd. Doç. Dr. Ali ÖZKAN

Öğr. Gör. Dr. Muhittin DOĞAN

İmzası



**İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.**

**Mehmet KAPI**

## ÖZ

### KADMIYUM VE REACTIVE RED 120 UYGULAMALARINA *Scenedesmus quadricauda* var. *longispina*'nın BİYOKİMYASAL CEVABI

KAPI Mehmet

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Abuzer ÇELEKLİ

Ocak 2013, 51 sayfa

Bu çalışmada; kadmiyumun ( $Cd^{+2}$ ) ve Reactive Red (RR) 120'nin *Scenedesmus quadricauda* var. *longispina* üzerine etkileri araştırılmıştır. İnkübasyon boyunca  $Cd^{+2}$  (0; 2,5; 7,5; 15 ve 30 mg/l) ve RR 120 (0, 5, 10, 20 ve 40 mg/l) derişimlerinin mikroalg klorofil *a*, *b*, toplam karoten, malondialdehit (MDA) ve prolin üzerindeki etkileri belirlenmiştir.  $Cd^{+2}$  ve RR 120 uygulamaları ve uygulanmamış mikroalgal biyokütlenin yüzey yapıları FTIR–ATR spektroskopi kullanarak karakterize edilmiştir. Yüksek  $Cd^{+2}$  ve RR 120 derişimleri *S. quadricauda* var. *longispina*'nın biyokütlesini inhibe edici etki göstermiştir. Kültürde  $Cd^{+2}$  konsantrasyonlarının artması ile *S. quadricauda* var. *longispina*'da klorofil *a*, *b* ve toplam karoten miktarları azalmıştır ( $p<0,05$ ). Diğer taraftan  $Cd^{+2}$  derişimlerine maruz kalan *Scenedesmus* türünde prolin ve MDA miktarları artmıştır. Kültürde RR 120 konsantrasyonunun artması ile mikroalg türünde klorofil *a*, *b*, toplam karoten, MDA ve prolin miktarlarında önemli artışa neden olmuştur ( $p<0,05$ ). Sonuç olarak  $Cd^{+2}$  ve RR 120'nin uygulamaları *S. quadricauda* var. *longispina*'nın klorofil *a*, *b*, toplam karoten, MDA ve prolin miktarlarını etkilemiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kadmiyum, *Scenedesmus quadricauda* var. *longispina*, Reactive Red 120

## ABSTRACT

### BIOCHEMICAL RESPONSE OF *Scenedesmus quadricauda* var. *longispina* TO CADMIUM AND REACTIVE RED 120 APPLICATIONS

KAPI Mehmet

M.Sc. in Biology Department

Supervisor: Assoc. Prof.Dr. Abuzer ÇELEKLİ

January 2013, 51 pages

In present study, effects of cadmium ( $\text{Cd}^{2+}$ ) and Rective Red (RR) 120 on *Scenedessmus quadricauda* var. *longispina* was studied. Effects of  $\text{Cd}^{2+}$  (0.0, 2.5, 7.5, 15.0, and 30.0 mg/l) and RR 120 (0, 5, 10, 20, and 40 mg/l) concentrations on chlorophyll *a*, *b*, total carotene, malondialdehyde (MDA), and proline content of *S. quadricauda* var. *longispina* were determined during incubation. Applications of  $\text{Cd}^{2+}$  and RR 120 and untreated of algal biomass were characterized by using a FTIR–ATR spectroscopy. High  $\text{Cd}^{2+}$  and RR 120 concentrations indicated inhibitory effect on the biomass production by *S. quadricauda* var. *longispina*. Amounts of chlorophyll *a*, *b*, total carotene in *S. quadricauda* var. *longispina* decreased with increasing  $\text{Cd}^{2+}$  concentration ( $p < 0.05$ ) in the culture. On the other hand, MDA and proline contents by *Scenedesmus* species increased under exposed of  $\text{Cd}^{2+}$  concentrations. Amounts of chlorophyll *a*, *b*, total carotene, MDA and proline contents in the microalga species increased with increasing RR 120 concentrations ( $p < 0.05$ ) in the culture. As a result, applications of  $\text{Cd}^{2+}$  and RR 120 affected on the values of biomass, chlorophyll *a*, *b*, total carotene, MDA, and proline of *S. quadricauda* var. *longispina*.

**Keywords:** Cadmium, *Scenedesmus quadricauda* var. *longispina*, Reactive Red 120

*En sevdiğime...*

## TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam süresince tüm bilgilerini benimle paylaşmaktan kaçınmayan, maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen ve tezimde büyük emeği olan bana çok şey katan değerli danışman hocam, Sayın Doç. Dr. Abuzer ÇELEKLİ'ye,

Desteklerinden ve katkılarından dolayı değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Hüseyin BOZKURT ve Öğr. Gör. Dr. Muhittin DOĞAN'a,

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen annem, babam ve kardeşlerime,

Her konuda bana destek veren Uzman Biyolog Emine GÜLTEKİN'e,

Laboratuvar çalışmalarında en başından beri bana destek veren dostum Biyolog Baki ÖZTÜRK'e,

Yardımlarını benden esirgemeyen değerli arkadaşlarım Biyolog Ali TOPYÜREK ve Uzman Biyolog Hamdullah ARSLANARGUN'a,

Teknik ve idari yardımlarından dolayı Gaziantep Üniversitesi Rektörlüğü'ne, Fen-Edebiyat Fakültesi Dekanlığı'na, Biyoloji Bölüm Başkanlığı'na,

Teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa No

|                                                          |      |
|----------------------------------------------------------|------|
| ÖZ .....                                                 | v    |
| ABSTRACT.....                                            | vi   |
| TEŞEKKÜR.....                                            | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                     | xi   |
| TABLolar DİZİNİ .....                                    | xiii |
| SİMGE VE KISALTMALAR-SEMBOLLER DİZİNİ.....               | xiv  |
| BÖLÜM 1: GİRİŞ.....                                      | 1    |
| 1.1. Ağır Metaller .....                                 | 2    |
| 1.1.1. Kadmiyum.....                                     | 2    |
| 1.2. Reaktif Boyar Maddeler .....                        | 3    |
| 1.3. Chlorophyceae (Yeşil Algler) .....                  | 4    |
| 1.4. Ksenobiyotiklerin etkileri .....                    | 5    |
| BÖLÜM 2: KAYNAK ÖZETLERİ.....                            | 10   |
| BÖLÜM 3: MATERYAL VE METOD .....                         | 14   |
| 3.1. Çalışmada Kullanılan Alg Türü .....                 | 14   |
| 3.2. <i>Scenedesmus</i> Kültür Ortamı ve İzolasyonu..... | 14   |
| 3.3. Kadmiyum.....                                       | 16   |
| 3.4. Reactive Red 120 .....                              | 16   |
| 3.5. Kadmiyum Konsantrasyonlarının Etkisi .....          | 18   |
| 3.6. Reactive Red 120 Etkisi .....                       | 18   |
| 3.7. Analizler .....                                     | 18   |
| 3.7.1. Biyokütle Belirlenmesi .....                      | 18   |
| 3.7.2. Pigment Analizi .....                             | 18   |
| 3.7.3. Prolin Analizi .....                              | 19   |
| 3.7.4. Malondialdehit (MDA) Analizi .....                | 19   |

|                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------|----|
| 3.7.5. Alg Materyalinin Karakterizasyonu .....              | 20 |
| 3.7.6. İstatistiksel Analizler.....                         | 20 |
| BÖLÜM 4: BULGULAR VE TARTIŞMA.....                          | 21 |
| 4.1. Çalışılan Türün İzolasyonu ve Biyokütle Eldesi.....    | 21 |
| 4.2. Başlangıç Kadmiyum Konsantrasyonlarının Etkileri ..... | 22 |
| 4.3. Kadmiyum FTIR-ATR Analizi .....                        | 29 |
| 4.4. Reactive Red 120'nin Etkileri .....                    | 32 |
| 4.5. Reactive Red 120 FTIR-ATR Analizi .....                | 37 |
| BÖLÜM 5: SONUÇLAR.....                                      | 39 |
| KAYNAKLAR .....                                             | 42 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

|                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1. Ağır metal stresi altında hücrede oluşan reaktif oksijen türleri (ROT) üretimi .....                                             | 7  |
| Şekil 1.2. Reaktif oksijen türlerinin hücresel düzeyde etki mekanizmaları .....                                                             | 8  |
| Şekil 3.1. <i>S. quadricauda</i> var. <i>longispina</i> kesikli kültürü .....                                                               | 15 |
| Şekil 3.2. <i>S. quadricauda</i> var. <i>longispina</i> 'nın orbital çalkalayıcı üzerindeki kesikli kültürü .....                           | 16 |
| Şekil 3.3. RR 120 boyar maddesinin moleküler yapısı .....                                                                                   | 17 |
| Şekil 4.1. <i>Scenedesmus quadricauda</i> var. <i>longispina</i> 'nın mikroskopik görüntüsü ..                                              | 22 |
| Şekil 4.2. Kadmiyum stresinin <i>Scenedesmus</i> türünün morfolojisi üzerine etkisi .....                                                   | 23 |
| Şekil 4.3. Kadmiyum konsantrasyonlarının klorofil <i>a</i> miktarı üzerine etkisi .....                                                     | 25 |
| Şekil 4.4. Kadmiyum konsantrasyonlarının klorofil <i>b</i> miktarı üzerine etkisi .....                                                     | 26 |
| Şekil 4.5. Kadmiyum konsantrasyonlarının toplam karoten miktarı üzerine etkisi ..                                                           | 27 |
| Şekil 4.6. Kadmiyum konsantrasyonlarının MDA ve prolin miktarı üzerine etkisi ..                                                            | 28 |
| Şekil 4.7. <i>S. quadricauda</i> var. <i>longispina</i> 'nın (a) doğal ve (b) kadmiyum uygulamasından sonraki FTIR–ATR analizi .....        | 31 |
| Şekil 4.8. RR 120 konsantrasyonlarının <i>S. quadricauda</i> var. <i>longispina</i> 'nın biyokütlesi üzerine etkisi .....                   | 32 |
| Şekil 4.9. RR 120 konsantrasyonlarının <i>S. quadricauda</i> var. <i>longispina</i> 'da klorofil <i>a</i> miktarı üzerine etkisi .....      | 33 |
| Şekil 4.10. RR 120 konsantrasyonlarının <i>S. quadricauda</i> var. <i>longispina</i> 'da klorofil <i>b</i> miktarı üzerine etkisi .....     | 34 |
| Şekil 4.11. Farklı RR 120 konsantrasyonlarının <i>S. quadricauda</i> var. <i>longispina</i> 'da toplam karoten miktarı üzerine etkisi ..... | 35 |

|                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.12. Farklı RR 120 derişimlerinin <i>S. quadricauda</i> var. <i>longispina</i> 'da (a) |    |
| MDA ve (b) prolin miktarı üzerine etkisi .....                                                | 36 |
| Şekil 4.13. <i>S. quadricauda</i> var. <i>longispina</i> 'nın (a) doğal ve (b) RR 120         |    |
| uygulamasından sonraki FTIR–ATR analizi .....                                                 | 38 |

## TABLÖLAR DİZİNİ

### Sayfa No

|                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 3.1. Modifiye Bold 3N besin çözeltisi içeriği .....                                                                           | 14 |
| Tablo 3.2. RR 120 boyar maddesinin genel karakteristik özellikleri.....                                                             | 17 |
| Tablo 4.1. Kadmiyum konsantrasyonlarının <i>S. quadricauda</i> var.<br><i>longispina</i> 'nın biyokütlesi üzerindeki etkileri ..... | 23 |

## SİMGE VE KISALTMALAR–SEMBOLLER DİZİNİ

|                               |                                     |
|-------------------------------|-------------------------------------|
| ANOVA                         | Varyans analizi                     |
| APX                           | Askorbat Peroksidaz                 |
| $C_a$                         | Klorofil <i>a</i>                   |
| CAT                           | Katalaz                             |
| $C_b$                         | Klorofil <i>b</i>                   |
| EMA                           | Etil 2-Metil Asetoasetat            |
| FTIR                          | Frouier Transform Infrared Spectrum |
| GPX                           | Glutasyon Peroksidaz                |
| GSH                           | Redüktaz Glutasyon                  |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Hidrojen Peroksit                   |
| MDA                           | Malondialdehit                      |
| ROT                           | Reaktif Oksijen Türleri             |
| RR 120                        | Reactive Red 120                    |
| SOD                           | Süperoksit Dismutaz                 |

## BÖLÜM 1

### GİRİŞ

Yeryüzünde insan nüfusunun artışına paralel olarak artan endüstriyel faaliyetler hızlıca sucul ekosistemleri tahrip etmektedir. Sanayi devriminden sonra artan endüstriyel gelişmelerin beraberinde getirdiği kirlilik günümüzde tüm canlıları tehdit eder hale gelmiştir. Günümüzde çevre kirliliği dünyadaki en önemli sorunlardan biri olup canlıları olumsuz yönde etkileyen faktörlerdendir. Sucul ortamlar, insanoğlunun yol açtığı çeşitli aktiviteler sonucu ksenobiyotikler tarafından artan düzeylerde etkilenmektedir. Endüstriyel faaliyetler sonucunda açığa çıkan ağır metal, boya ve tuz gibi maddeler kirliliğinin artmasında önemli rol oynamaktadır. Ayrıca maden yatakları ve işletmeleri, motorlu taşıtlar, volkanik faaliyetler, tarımda gübreleme ve ilaçlama gibi yollarla çeşitli ksenobiyotikler biyosfere verilmektedir. Güçlü ksenobiyotiklerden olan ağır metaller toksik etkilerinin yanı sıra alınmaları ve biriktirmeleri bakımından öneme sahiptir. Algler sucul ortamlardaki besin zincirinin ilk basamağında bulunduklarından dolayı ksenobiyotiklerin daha yüksek basamaklara taşınmasından sorumludurlar.

Boyar maddeler tekstil, deri, kağıt ve plastik endüstri gibi farklı endüstri alanlarında yaygın şekilde kullanılmaktadır. Tekstil sektörü dünyada ve ülkemizde önde gelen sektörlerden biri olup gün geçtikçe gelişmektedir. Yüksek oranda boyar madde içeren ve tekstil sektöründen kaynaklanan atık sular ciddi problemlere yol açmaktadır. Boyar maddelerin çok az miktarı bile alıcı ortamlarda istenmeyen durumlara yol açmaktadır. Bununla beraber alıcı ortam eğer su ekosistemi ise burada güneş ışığının geçişini önleyerek üretici faaliyetlerini olumsuz yönde etkiler. Ekosistemlere karışan metal ve boyar madde karışımları birincil üreticiler olan algleri etkilemektedir. Her geçen gün biyolojik parçalanmaya karşı dirençli boyar maddeler daha çok kullanılmaya başlanmıştır. Algler besin zincirinin üreticiler grubunu oluşturduğundan dolayı ksenobiyotiklerin bu canlılar üzerine olan toksik etkilerini araştırmaya daha fazla önem verilmektedir.

### 1.1. Ağır metaller

Ağır metaller genel olarak yoğunluğu yüksek, düşük derişimlerde bile toksik özelliğe sahip metalik elementleri ifade etmektedir. Ağır metallere örnek olarak  $Cd^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$  ve  $Cr^{+2}$  verilebilir. Yer kabuğunun bileşenlerinden olan ağır metaller su ve havada bulunabilir. Ağır metaller genellikle antropojenik faaliyetlerin yoğun olarak bulunduğu ortamlarda çevre kirleticileri olarak kabul edilmektedir (Aksu, 2005; Mehta ve Gaur, 2005). Ağır metaller ile kirlenmiş sucul ekosistemlerde besin ağı yoluyla organizmalarda birikim olmaktadır. Ağır metaller düşük derişimlerde bazen gerekli iken yüksek derişimlerinde toksik etki gösterebilir. Günümüzde su ekosistemlerinin ağır metallerle kirlenmesi en önemli çevresel sorunlardan biridir (Nriagu, 1988; Silva vd., 1999). Bu tür ksenobiyotikler besin ağında organizmalarda birikmekte ve çeşitli problemlerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Peña - Castro vd., 2004a). Bu metaller bulunduğu ortamda kalıcı olup çok düşük konsantrasyonlarda bulunsada dahi çevreden doğal olarak elemine edilmesi zordur (Yarsan vd., 2000). Bazı metaller toksik etkilerinin neden olduğu biyokimyasal tepkilere ek olarak oksidatif strese neden olabilmektedir. Ağır metallerin neden olduğu oksidatif hasarın sonucunda metal bağlamasında değişiklikler ve hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gözlenebilmektedir (Pinto vd., 2003).

#### 1.1.1. Kadmiyum

Kadmiyum ( $Cd^{+2}$ ) yer kabuğunda bulunan doğal bir metal elementtir. Diğer ağır metallere oranla teknolojiye son 30 yılda adı daha fazla kullanılmaya başlanan kadmiyum, atomik ağırlığı 112,41 g/mol; yumuşak, gümüş beyazı, elektropozitif bir metaldir. Saf kadmiyum tabiatta bulunmaz. Genellikle oksit, klorür, sülfür ve sülfid gibi moleküller ile çeşitli formlar oluşturur. Kadmiyum elementi ekosistemde en tehlikeli ağır metal kirleticilerinden biri olup diğer metaller gibi hava, toprak ve su ortamıyla bitki ve hayvanlara, bitkisel ve hayvansal kökenli besinlerle de insana yansıdığından dolayı insanlar açısından oldukça toksik bir ağır metaldir. Sanayi devrimine kadar toksikolojik yönden sorun yaratabileceği pek düşünülmeyen kadmiyum son yıllarda endüstriyel kullanıma paralel olarak kurşun, civa gibi ekotoksikolojik yönden önem kazanmıştır (Şener ve Yıldırım, 2000, Conti ve Cecchetti, 2003). Kadmiyum böcek öldürücüler, ısıtma sistemleri, sigara dumanı, nikel-kadmiyumlu piller, kirli hava, boyalar, fosfatlı gübreler, kara yollarındaki

tozlar, çimento fabrikaları ve metal işleyen endüstriler gibi çeşitli kaynaklardan doğaya salınmaktadır. Kadmiyumun bu faaliyetlerden dolayı doğada bulunan konsantrasyonu sürekli olarak artmaktadır (Foy vd., 1978). Endüstri atıkları 0,13–0,18 mmol/l  $\text{Cd}^{+2}$  içermektedir (Srivastava vd., 2009; Çelekli vd., 2011). Kadmiyum çözünme kapasitesi yüksek olan bir ağır metal olduğundan dolayı sucul ekosistemlerde önemli bir kirletici olarak kabul edilmektedir. Temiz sulardaki  $\text{Cd}^{+2}$  konsantrasyonunun genellikle 0,001 mg/l'den düşük olduğu belirtilmiştir (Lockwood, 1976; Mhatre ve Pankhurst, 1997).

Yüksek kadmiyum konsantrasyonlarını içeren atık sular arıtma işleminden geçirilmeden akarsu, göl, baraj ve denizlere bırakıldığından dolayı sucul ekosistemdeki canlılar tarafından alınarak besin ağında biriktirilmektedir. Kadmiyum organlarda hidroksi radikalleri, süperoksit anyonları, nitrik oksit ve peroksitler ile kombine olarak akciğer, böbrek, pankreas, prostat ve karaciğer kanserine neden olabilir. Ekosistemde özellikle birincil üreticiler olan algler en fazla etkilenen canlı grubunda yer alır (Hart ve Scaife, 1977).

Doğadaki canlılar için toksik bir element olan kadmiyum alglerde çeşitli fizyolojik değişikliklere neden olmaktadır. Proteinlerin –SH (sülhidril) gruplarındaki enzimleri inaktive etmekte, kloroplast yapısının ve hücre duvar kompozisyonun bozulmasına neden olmaktadır (Daud vd., 2009; Andosch vd., 2012). Kadmiyum *Thalassiosira weissflogii* (denizel diyatom) hariç diğer organizmalarda faydalı bir rol oynamamaktadır (Lane vd., 2005). Yüksek kadmiyum konsantrasyonları klorofil biyosentezinde görev alan protoklorofil redüktaz ile amino levulinik asit sentezini engeller. Kadmiyum kalsiyum antagonisti olarak kalsiyum yerine kalmoduline bağlanabilmektedir. Kalsiyum rol oynadığı metabolizmada problemlere neden olmaktadır (Andosch vd., 2012). Ayrıca ağır metaller serbest radikal oluşumuna yol açmakta ve bu yolla tilakoid membran lipidlerinin oksidatif yıkımına sebep olmaktadır. Bu yolla da klorofil yıkımının arttığı ve sentezinin engellendiği bilinmektedir (Zengin ve Munzuroğlu, 2005).

## **1.2. Reaktif Boyar Maddeler**

Reaktif boyar maddeler yaygın olarak pamuk ve selüloz liflerini boyamada kullanılmaktadır (Çelekli vd., 2009a). Reaktif boyalar bir veya daha çok azo bağ (–

N≡N-) içeren heterosiklik bir gruptur. Suda kolay çözünen reaktif boyar maddeler pamuk ve selüloz fibrillerine kovalent olarak bağlanırlar (Srinivasan vd. 2010; Çelekli vd., 2010). Reaktif azo boyalar boyama işlemlerinin kolay olması ve yıkama işlemi sırasında iyi sabitlenmesi nedeniyle tekstil endüstrisinde çok yaygın kullanılmaktadır (Çelekli vd., 2012). Boyama işlemi sonucunda atık sularda % 20–40 arasında kalmaktadır. Azo boyar maddeler mutajenik ve karsinojenik ksenobiyotiklerin en büyük grubudur (Srinivasan vd. 2010). Bu boyaların alıcı sulara deşarj edilmesi dünyada önemli çevresel problemlere neden olmaktadır. Bu nedenle bu atık suların sucul ekosistemlere verilmeden önce yaşanabilen bir dünya için arıtılması gerekmektedir (Tanrıverdi, 2010; İlğün, 2012).

Tekstil atık sularında ilk göze çarpan sorun suyun rengidir (Srinivasan, 2010). Sulara karışan atık maddeler, güneş ışığının suya girişini azaltarak bu sularda yaşayan birincil üretici olan alglerin fotosentez aktivitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu durum ekosistemin temel ögesi olan üreticilerin varlığını olumsuz yönde etkileyerek ekolojik dengenin bozulmasına neden olmaktadır. Fotosentetik aktivitenin engellenmesi ile beraber ekosistemde çözünmüş oksijen miktarının azalmasına yol açmaktadır. Oluşan anoksik koşullar sonucunda aerobik mikroorganizmalar yerini anaerobik mikroorganizmalara bırakmakta ve kötü kokuların oluşmasına sebep olmaktadır. Birbirlerini etkileyerek sucul ekosistemin yok olmasına neden olan bu olaylar ekolojik dengenin bozulmasına ve önemli çevre sorunlarının oluşmasına yol açmaktadır (Aksu ve Çağatay, 2006; Kumar vd., 2006).

### **1.3. Chlorophyceae (Yeşil Algler)**

Algler, morfolojik olarak çok çeşitli formlara sahip organizmalardır. Farklı şekillere sahip bu organizmalar tek hücreli veya koloni halinde bulunabilirler. Algler genellikle tatlı , acı ve deniz suları gibi hemen hemen bütün habitatlarda bulunurlar (John vd., 2002; Çelekli, 2006; Bellinger ve Sigee, 2010). Chlorophyta grubu algler; tek hücreli, koloni, sönobiyum, dallanmış veya dallanmamış ipliksi, tübümsü ve parankimatik gibi morfolojik yapılara sahiptir (John vd., 2002; Çelekli, 2006; Bellinger ve Sigee, 2010).

Chlorophyceae üyelerinin yaklaşık % 90'ı tatlı sularda ve % 10'u denizlerde bulunmaktadır. Chlorophyceae grubu alglerinin tatlı su türleri genellikle kozmopolit türlerdir (Güner ve Aysel, 1996; John vd., 2002; Bellinger ve Sige, 2010).

*Scenedesmus* cinsi Chlorophyceae grubuna ait bir cinstir. Bu cinsin hücreleri bir araya gelerek sönobiyum adı verilen koloniler oluşturur. Hücreler, mekik, iğsi, silindirik ve üçgensel yapıdadır. Birçok türü spin adı verilen çıkıntılara sahiptir. Spinlerin sayısı, yeri ve şekli türlere göre değişmektedir. Sönobiyumdaki hücre sayısı 2, 4, 8, bazen 16 ve nadiren 32'dir (Prescott, 1973; John vd., 2002; Wehr ve Sheath, 2003; Bellinger ve Sige, 2010). Farklı besin tuzların varlığı (Egan ve Trainor, 1991), otlama (Peña-Castro vd, 2004b; Verschoor vd., 2004; Lüring, 2006), atık kökenli kirlleticiler, petrol kirliliği, sıcaklık ve tuzluluk (Peña-Castro vd., 2004b) gibi çeşitli çevresel koşullarda *Scenedesmus* hücrelerinde farklılıklar gözlenmiştir. *Scenedesmus* üyelerinin çoğu kozmopolit olup yetiştiriciliği kolay ve çevresel koşullara uyumu zor olmadığından endüstriyel amaçlar doğrultusunda kullanılmaktadır (Borowitzka, 1992; Çelekli vd., 2008).

*Scenedesmus* türünün sistematikteki yeri aşağıdaki gibidir (Komarek ve Fott, 1983).

|                |                      |
|----------------|----------------------|
| <b>Domain</b>  | : Eukaryota          |
| <b>Alem</b>    | : Plantae            |
| <b>Şube</b>    | : Chlorophyta        |
| <b>Sınıf</b>   | : Chlorophyceae      |
| <b>Takım</b>   | : Sphaeropleales     |
| <b>Familya</b> | : Scenedesmaceae     |
| <b>Cins</b>    | : <i>Scenedesmus</i> |

#### 1.4. Ksenobiyotiklerin Etkileri

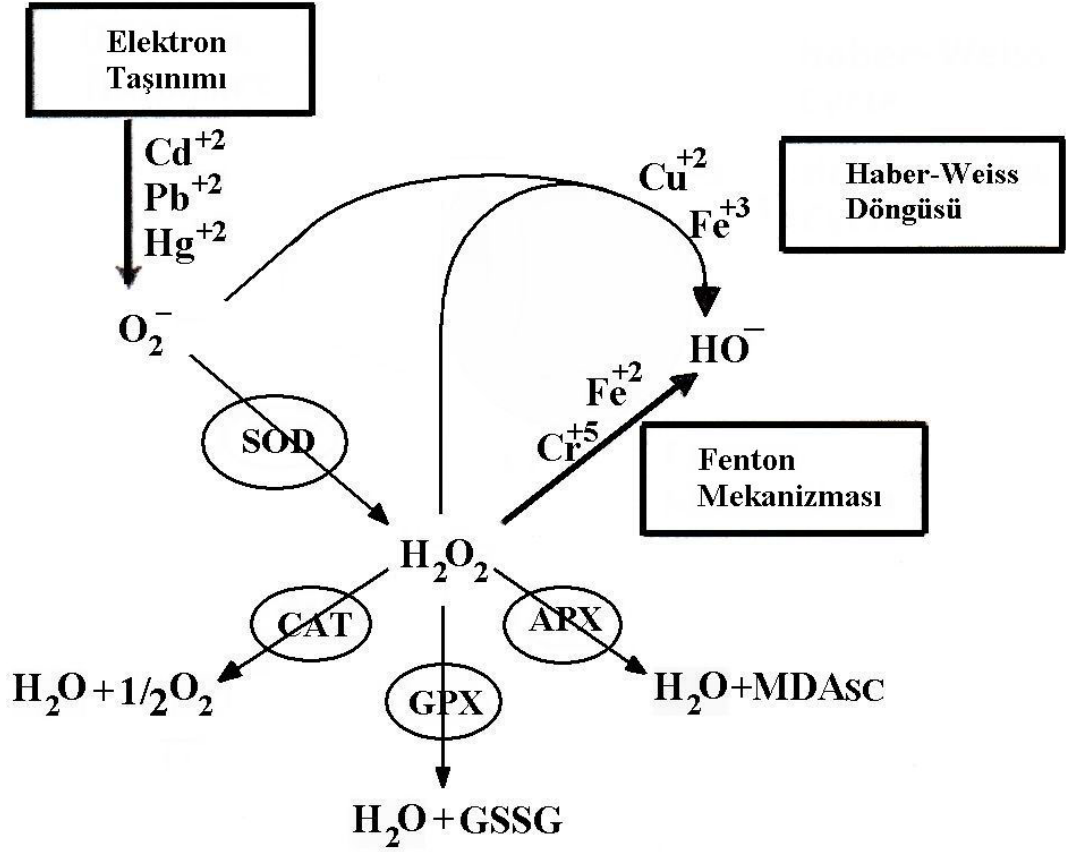
Ksenobiyotikler, canlı organizmalara yabancı olan ilâç, böcek öldürücü, petrol ürünleri gibi yabancı maddelere ksenobiyotik denir. Genellikle sucul ekosistemlerde besin döngüsüne girip canlı yapılarında birikerek canlı faaliyetlerini olumsuz yönde etkilerler. Algler sucul ekosistemlerde ilk üreticiler olup besin ağının ilk halkasını oluştururlar. Algere uygulanan ağır metal ve diğer stres etmenlerinin biyokimyasal bileşim üzerinden besin değerlerini etkilediği görülmüştür. Bitki ve algler üzerine metal toksisitesi son yıllarda çalışılmasına karşın toksisiteye neden olan

mekanizmalar konusunda araştırmalar sürmektedir (Pinto vd., 2003; Tripathi vd., 2006; Arunakumara ve Xuecheng, 2008).

En tehlikeli kirleticilerinden biri olan ağır metaller, ekosistemdeki canlı organizmalar için toksik etkiye sahiptir. Kadmiyum sucul ekosistemlerde birincil üreticiler tarafından ortamdan alınıp besin zinciriyle taşınımı kolay olduğundan algler, bitkiler, hayvanlar ve dolayısıyla insan sağlığı açısından tehlikeli olabilmektedir.

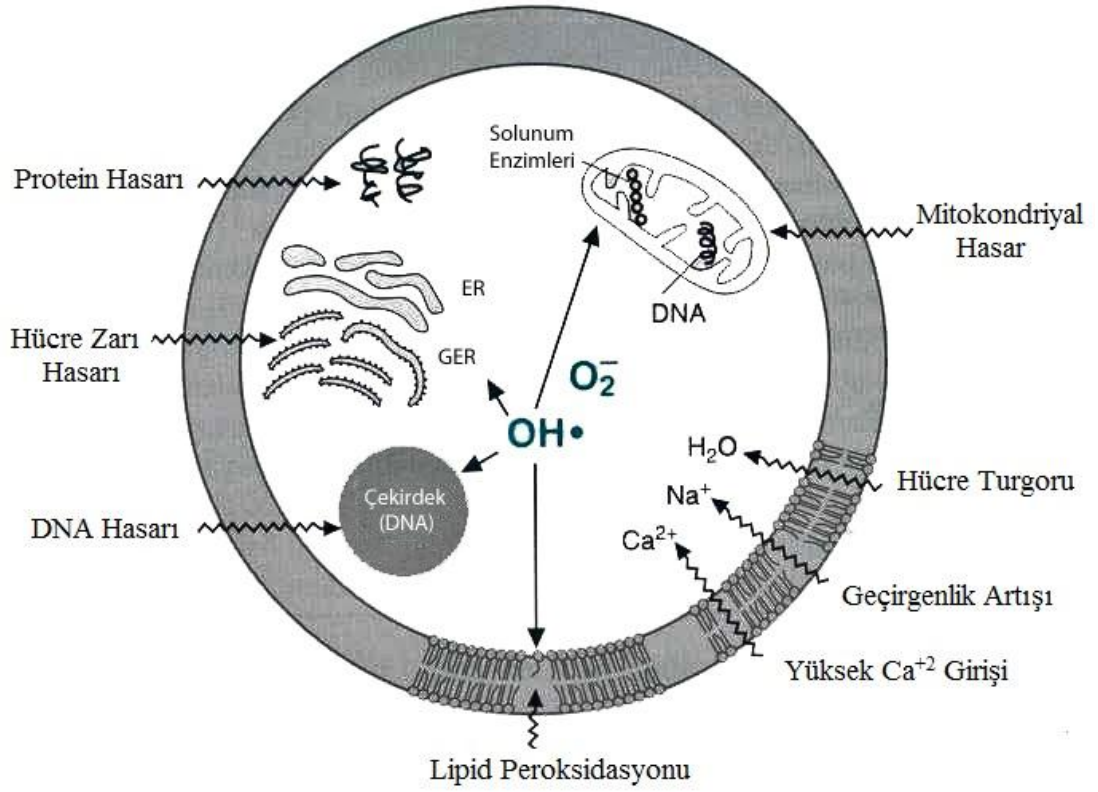
Ksenobiyotikler hücre yüzeyine ya da hücre içi madde birikmesi üzerine etkili olmaktadır. Organizmalarda proteinlerdeki sülfidril grubuna metal bağlanmasında, temel elementlerin yer değiştirmesinde veya protein yapısının bozulmasında rol oynamaktadır (Tripathi vd., 2006; Arunakumara ve Xuecheng, 2008). Ksenobiyotikler canlı sistemlerinde oksidatif strese neden olmaktadır (Pinto vd., 2003; Arunakumara ve Xuecheng, 2008).

Ağır metallerin toksik etkisi sonucunda alglerde reaktif oksijen türü (ROT) oluşmakta ve oksidatif strese sebep olmaktadır (Scandalios, 2002; Pinto vd., 2003; Sabatini vd., 2009). Hücrede ROT üretiminin neden olduğ u ağır metal stresi Şekil 1.1.'de verilmiştir.  $Cd^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$  ve  $Hg^{+2}$  gibi bazı metaller kalsiyuma bağlı sistemleri aktive etmekte ve demir ortamlı süreçleri etkileyen redüktaz glutatyon miktarını etkilemektedir (Pinto vd., 2003; Tripathi ve Gaur, 2004). Ayrıca ağır metaller, fotosentetik elektron işleyiş mekanizmasını bozabilmektedir. Krom ve bakır gibi metaller Fenton reaksiyon ile  $H_2O_2$ 'den OH radikalleri üretimini gerçekleştirebilir. Bundan dolayı çevredeki ağır metal kirliliğine karşı alglerin hoşgörüsü savunma tepkileri ile oldukça ilişkilidir (Pinto vd., 2003).



**Şekil 1.1.** Ağır metal stresi altında hücrede oluşan reaktif oksijen türleri (ROT) üretimi (Pinto vd., 2003).

ROT'ların hücresel düzeyde etki mekanizmaları Şekil 1.2.'de verilmiştir. Ksenobiyotiklere maruz kalan hücrelerde oluşan ROT hücrenin çeşitli kısımlarını etkilemektedir. ROT'lar hücrenin nükleus membranını yıkarak nükleustaki genetik materyale etki edip DNA'yı kırılmaya ve mutasyonlara açık hale getirirler. Ayrıca membran lipitlerini ve proteinlerini yok ederek hücre membranını sertleştirip hücre fonksiyonunu engellerler ve bağışıklık sistemindeki hücreleri yok ederek bağışıklık sistemini zorlarlar (Yan ve Pan, 2002; Pinto vd., 2003; Sabatini vd., 2009).



**Şekil 1.2.** Reaktif oksijen türlerinin hücresel düzeyde etki mekanizmaları

Organizmalar hücresel ROT düzeyini kontrol eden enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmalar geliştirmiştir. Bunlar GSH, fenolik bileşikler, askorbat, flavanoidler,  $\alpha$ - tokoferol (vitamin E) ve karotenoidler gibi moleküller ile süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, askorbat peroksidaz, lipid peroksidaz ve glutatyon reduktaz gibi moleküler enzimler şeklindedir. Ağır metallerin bağlanma faktörleri ve proteinlerin üretimi gibi çeşitli mekanizmalar, iyon seçici metal taşıyıcıları boşaltma ya da bölümlere ayrılma ile hücrelerden toksik ağır metallerin çıkarılması organizmalara ağır metallerin etkisini azaltmaktadır (Torres vd., 1997; Yan ve Pan, 2002; Arunakumara ve Xuecheng, 2008).

Alglerin oksidatif hasara karşı savunma mekanizması, kelatlı bileşiklerin sızma kapasitesi, temel ATPaz pompaları tarafından metal iyonlarının aktif olarak dışarı atılması şeklinde olmaktadır. Alınımın azalması gibi hücresel uyumlarla gerçekleşmekte böylece ağır metallere hoşgörü sağlanmaktadır (Cobbett, 2001; Pinto vd., 2003; Arunakumara ve Xuecheng, 2008; Andosch vd., 2012).

Ülkemizde Gaziantep sanayi bakımından gelişmiş illerden birisidir. Gaziantep'te çok sayıda sanayi tesisi bulunmaktadır. Bu kuruluşlardan açığa çıkan ağır metaller, tekstil boyaları, zirai ilaçlar ve zehirli gazlar gibi kirleticiler ekosistemleri tehdit etmektedir.

Ağır metaller ekosistemin en tehlikeli kirleticilerinden biri olup canlı organizmalar için oldukça toksiktir. Kadmiyum sucul ekosistemlerde birincil üreticiler tarafından ortamdaki besin zinciriyle taşınımı kolay olduğundan algler, bitkiler, hayvanlar ve dolayısıyla insan sağlığı açısından tehlikeli olabilmektedir.

Bu çalışmada, kadmiyumun ( $Cd^{+2}$ ) ve reaktif azo boyar madde olan Reactive Red (RR) 120'nin *S. quadricauda* var. *longispina* 'nın biyokütlesi, pigmentasyonu, prolin ve malondialdehit (MDA) üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca çalışılan ksenobiyotik maddelerin mikroalg yüzey yapısı üzerine etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

## BÖLÜM 2

### KAYNAK ÖZETLERİ

Fayed vd. (1983),  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$  ve  $\text{Pb}^{+2}$  metallerinin *Scenedesmus obliquus* türündeki birikimini çalışmışlardır. Sonuçlar, metallerin alg tarafından çabuk bir şekilde akümüle edildiğini ve birikimin, metal–alg etkileşim oranına bağlı olduğunu göstermiştir. Algin metallere gösterdiği bağlanma affinitesi  $\text{Zn}^{+2} > \text{Cu}^{+2} > \text{Cd}^{+2} > \text{Pb}^{+2}$  şeklinde olmuştur.

Wu vd. (1995), bakır ve kadmiyum elementlerinin tek hücreli alglerin hücre içi prolin akümülyasyonuna etkilerini çalışmışlardır. Her iki metalle test edilen alglerdeki prolin miktarının en fazla *Chlorella*'da en az *Nitzschia*'da meydana geldiğini belirlemişlerdir. Fakat bakır prolin birikimini kadmiyumdan daha fazla arttırmıştır.

Fargasova vd. (1999),  $\text{Cu}^{+}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Mo}^{+6}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{V}^{+5}$  gibi metallerin *Scenedesmus quadricauda*'da toplam klorofil *a* ve *b* miktarları ve büyüme üzerine etkilerini çalışmışlardır. Alg büyümesi inhibisyonu için:  $\text{Cu}^{+2} > \text{Cu}^{+} > \text{Ni}^{+2} > \text{V}^{+5} > \text{Mo}^{+6} > \text{Mn}^{+2}$ ; toplam klorofil miktarı için:  $\text{Cu}^{+2} > \text{Ni}^{+2} > \text{Cu}^{+} > \text{Mn} > \text{V}^{+5} > \text{Mo}^{+6}$ ; klorofil *a* miktarı için:  $\text{Cu}^{+2} > \text{Ni}^{+2} > \text{Cu}^{+} > \text{V}^{+5} > \text{Mn}^{+2} > \text{Mo}^{+6}$  ve klorofil *b* miktarı için:  $\text{Cu}^{+} = \text{Cu}^{+2} > \text{Ni}^{+2} > \text{Mn}^{+2} > \text{Mo}^{+6} > \text{V}^{+5}$  şeklinde olduğunu belirlemişlerdir.

Lopez–Suarez vd. (2000) yaptıkları çalışmada, *Chlorella vulgaris*'in  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Cr}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  ve  $\text{Cu}^{+2}$  gibi ağır metalleri biriktirme yeteneğini araştırmışlardır. *C. vulgaris* çalışılan 5 metali güçlü bir şekilde bağlamıştır. En güçlü bağlanma  $\text{Cr}^{+2}$  ve  $\text{Cu}^{+2}$  için olmuştur.

Rangsayatorn vd. (2002) yaptıkları çalışmada, 100 mg/l'den az kadmiyum içeren atık sulardan kadmiyumun giderilmesi için *Spirulina platensis*'in kullanılabilirliğini araştırmışlardır. Kadmiyum metalinin alımında, kültür ortamı sıcaklığının etkili olmadığını ancak büyümede pH değişiminin çok etkili olduğunu rapor etmişlerdir.

Alg hücrelerinin biyolojik birikimi için optimum pH'ın 7 olduğunu bildirmişlerdir. Kadmiyum metalinin alım mekanizmasının çok hızlı olduğunu, ilk 5 dakikada metal tutumunun % 78'inin tamamlandığını ileri sürmüşlerdir.

Chojnacka vd. (2004) yaptıkları çalışmada bakır fabrikaları ve rafinerilerden çıkan atık sulardaki amonyum azotu, kadmiyum ve civa gibi eser elementlerin farklı derişimlerinin giderilmesi için *Spirulina* sp. kullanılmıştır. Çalışmada, atık su işlemlerinde *Spirulina* sp. ile biyolojik birikim yöntemi kullanılarak bu atıkların düşük maliyetli işlemlerle arıtımı önerilmiştir.

Yap vd. (2004), *Isochrysis galbana* kahverengi alginde kadmiyum, bakır, çinko ve kurşunun toleranslarını ve toksisitelerini çalışmışlardır. Bu ağır metallerin algde beş gün boyunca EC50 ve 24 saat boyunca LC50 değerlerini belirlemişlerdir. EC50 ve LC50 değerleri altında, algin en fazla çinkoya duyarlı olduğunu bunu kadmiyum, bakır ve kurşunun takip ettiğini belirlemişlerdir.

Elmacı vd. (2005), *Chara* sp., *Cladophora* sp. ve *Chlorella* sp. alg türleri ile Remazol Turkish Blue-G ve  $Zn^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Co^{+2}$  ağır metallerinin biyosorpsiyonu için kullanmışlardır. Ağır metal çalışmasında en iyi giderimi *Cladophora* sp. ile elde etmişlerdir. Boyar madde ile yapılan çalışmada en iyi giderim verimini ise *Chlorella* sp. ile elde etmişlerdir. Sonuç olarak seçilen 3 alg türünün hem renk hem de ağır metal gideriminde etkili olduğunu görmüşlerdir.

Özer vd. (2005) çalışmalarında, yeşil bir alg olan *Enteromorpha prolifera* türü, Acid Red 274 boyasının gideriminde kullanılmıştır. Adsorpsiyon işlemi en iyi pH 2–3'te gerçekleşmiştir. Farklı başlangıç boya konsantrasyonlarında çalışmışlar ve boya konsantrasyonu arttıkça adsorpsiyon miktarının arttığı görülmüştür.

Tripathi vd. (2006) yaptıkları çalışmada *Scenedesmus* sp. üzerine kısa ve uzun süre (6 saat ve 7 gün) bakır ve çinko metallerinin neden olduğu oksidatif stresi araştırmışlardır. Çalışma sonunda 6 saatlik uygulama süresince meydana gelen MDA miktarının, 7 günlük olan uygulama süresince meydana gelen MDA miktarından daha fazla olduğunu belirlemişlerdir. Ancak prolin miktarının 7 günlük uygulama sonunda 6 saatlik uygulama sonundaki prolin miktarından daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Nakiboğlu ve Sevindir (2006) deri endüstrisi atık sularından kromun biyosorpsiyonu için *S. obliquus* ve *Chlorella* sp. kullanmışlardır. *S. obliquus* ve *Chlorella* sp. ile gerçek atık su ve yapay atık suda yapılan krom biyosorpsiyon çalışmaları sonucunda en uygun karıştırma sürelerini sırasıyla 24 saat ve 6 saat olarak belirlemişlerdir. En uygun karıştırma hızını her iki alg biyokütlesi için gerçek atık su ve yapay atık suda 150 devir/dk. olarak belirlemişlerdir. Her iki alg türü için gerçek atık su ve yapay atık suda en uygun biyosorpsiyon sıcaklığının 25 °C olduğunu bulmuşlardır.

Tasneem vd. (2007), kurşun, çinko ve bakırın *S. platensis*-S5'te süperoksit dismutaz (SOD), malondialdehit (MDA) ve prolin üzerine etkilerini çalışmışlardır. Metaller, mikroorganizmanın büyümesini azaltmıştır. Diğer taraftan MDA, SOD ve prolin miktarlarında artış görülmüştür.

Şeker vd. (2008)'nin yapmış oldukları çalışmada, bir siyanobakteri türü olan *S. platensis*'in sulardaki  $Pb^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$  ve  $Ni^{+2}$  derişimlerinin belirlenmesinde biyosorbent olarak kullanılmasını amaçlamışlardır. Kesikli çalkalama deneyleriyle çözelti pH'sı, ağır metallerin başlangıç derişimleri, çalkalama ve dengeye ulaşma zamanı, biyosorbente tutturulan metallerin geri alınma koşulları ve bu etkenlerin biyosorpsiyon mekanizmasını nasıl etkilediğini araştırmışlardır. *S. platensis*'in adı geçen ağır metallerin tutulmasında etkin bir şekilde kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Çelekli vd. (2009b) çalışmalarında doğada bol miktarda bulunan, yeşil bir alg olan *Spirogyra majuscula* ile Reactive Red 120 boyar maddesinin uzaklaştırılmasını araştırmışlardır. Adsorbent yüzeyindeki boyar maddeyi tutmakta sorumlu olan fonksiyonel gruplar FTIR analizi ile ortaya konulmuştur. Alg türünün çalışılan reaktif boyar maddesinin gideriminde önemli bir potansiyele sahip olduğu bulunmuştur.

Çelekli vd. (2009c) yaptıkları çalışmalarında, *S. platensis* türünün gelişimi ve boya tutma kapasitesi üzerine Reactive Red 120 boyar maddesinin etkileri araştırılmıştır. *S. platensis* yüksek RR 120 konsantrasyonlarına toleransının geniş olması nedeniyle atık su arıtma sistemlerinden istenilmeyen maddelerin arıtımı için önemli olduğunu belirlemişlerdir.

Oturkar vd. (2011) alışmalarında *Bacillus lentus* BI377 ile Reactive Red(RR) 120 boyar maddesinin yıkımı araştırılmıştır. Boya konsantrasyonu 250 mg/l'den 1500 mg/l'ye doğru arttıķa adsorpsiyon miktarının arttığı grlmştr.

Yuan vd. (2012) enrofloxacinin (ENFX) *S. obliquus* algi üzerine toksik etkilerini çalışmışlardır. Farklı derişimlerde (24, 48, 80, 96 ve 120 mg/l) 96 saat boyunca ENFX uygulamışlardır. ENFX derişimi arttıķa toplam klorofil miktarında azalış meydana geldiğini belirlemişlerdir. Deneme sonucunda klorofil *b* ve karoten miktarı, klorofil *a* miktarından daha düşük bulunmuştur. Aynı zamanda kontrole kıyasla MDA ve prolin miktarlarında da artış meydana gelmiştir.

Popovic vd. (2012), *C. vulgaris* ve *Dunaliella tertiolecta* yeşil alglerinde gümüş nano partiküllerinin 1 mg/l'den 10 mg/l'ye kadar olan derişimlerinin etkilerini çalışmışlardır. 24 saatlik uygulama sonucunda kontrol grubuyla kıyaslandığında toplam klorofil miktarında azalmalar meydana geldiği grlmştr. Uygulanan derişim arttıķa klorofil miktarındaki azalmalar belirgin hale gelmiştir. Uygulanan gümüş nanopartikül derişimlerinin artmasına paralel olarak her iki algin MDA miktarlarında artış gözlenmiştir.

## BÖLÜM 3

### MATERYAL VE METODLAR

#### 3.1. Çalışmada Kullanılan Alg Türü

Çalışmada, yeşil bir alg olan *Scenedesmus quadricauda* var. *longispina* türü kullanılmıştır. Alg türü; Gaziantep Üniversitesi Biyoloji Bölümü alg havuzundan izole edilmiştir. Çalışmalar, Biyoloji Bölümü Hidrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

#### 3.2. *Scenedesmus* Kültür Ortamı ve İzolasyonu

*Scenedesmus* türünün kültürü için Modifiye Bold 3N besi ortamı kullanılmıştır. Modifiye Bold 3N besin ortamı içeriği Tablo 3.1.'de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** Modifiye Bold 3N besin çözeltisi içeriği

| Çözelti A            |          | PIV Çözeltisi          |           |
|----------------------|----------|------------------------|-----------|
| $K_2HPO_4$           | 0,07 g/l | $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ | 0,750 g/l |
| $KH_2PO_4$           | 0,17 g/l | $FeCl_3 \cdot 6H_2O$   | 0,097 g/l |
| Çözelti B            |          | $MnCl_2 \cdot 4H_2O$   | 0,041 g/l |
| $NaNO_3$             | 0,75 g/l | $ZnCl_2$               | 0,005 g/l |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0,02 g/l | $CoCl_2 \cdot 6H_2O$   | 0,002 g/l |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0,07 g/l | $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$  | 0,004 g/l |
| $NaCl$               | 0,02 g/l | Toprak çözeltisi       | 1ml/l     |

Besi ortamını hazırlamak için çözelti A, B, PIV ve toprak çözeltileri ayrı kapaklı cam şişelerde hazırlanmıştır. Hazırlanan besin çözeltileri otoklavda 121 °C’de 15 dk. sterilize edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra çözeltiler soğumaya bırakılmıştır. Çözelti A ve B aynı şişeye aktarıldıktan sonra üzerine PIV (6 ml/l) çözeltisi ve 1 ml/l toprak çözeltisi eklenmiştir. Alg havuzundan alınan su örneği besin çözeltisi içinde dilüsyon yöntemiyle izole edilmiştir. Örnekler alg yetiştirme dolabında 20±1 °C bir hafta süreyle çoğalmaya bırakılmıştır. Bir haftalık süre sonunda tüplerden örnek alınıp sırasıyla ışık mikroskobunda incelenmiş ve kültürlerin saflık durumları değerlendirilmiştir. Daha sonra alg kültürü işlemi 400 ml besi ortamı içeren 500 ml’lik erlenlerde (Şekil 3.1.) orbital çalkalayıcı üzerinde 140 devir/dk.’da, oda sıcaklığında, 2000 lx ışık yoğunluğunda inkübe edilmiştir (Şekil 3.2.).



**Şekil 3.1.** *S. quadricauda* var. *longispina* kesikli kültürü



**Şekil 3.2.** *S. quadricauda* var. *longispina* 'nın orbital çalkalayıcı üzerindeki kesikli kültürü.

*Scenedesmus* türü hücrelerin morfolojik özellikleri ve hücre ebatları BX53 model Olympus marka ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

### 3.3. Kadmiyum

Çalışmada, kadmiyum ( $Cd^{+2}$ ) konsantrasyonlarının *Scenedesmus* türü üzerindeki etkileri çalışılmıştır. Standart kadmiyum çözeltisi Sigma'dan (Sigma–Aldrich GmbH, Almanya) temin edilmiştir. Denemelerde kullanılmak üzere stok ( $Cd^{+2}$ ) çözeltisi (1 g/l) distile suda hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözelti daha sonra kullanılmak üzere  $+4\text{ }^{\circ}C$ 'de saklanmıştır. Deney çözeltileri için gerekli olan  $Cd^{+2}$  konsantrasyonları stok  $Cd^{+2}$  çözeltisinden alınmıştır.

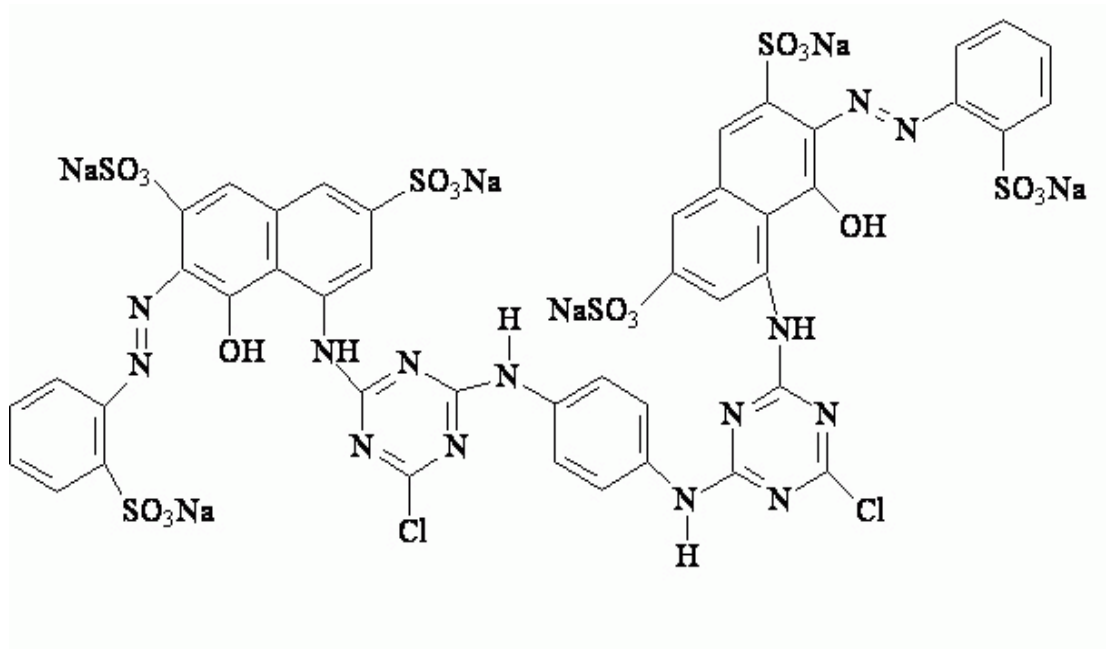
### 3.4. Reactive Red 120

Çalışmanın ikinci bölümünde, Reactive Red (RR) 120 boyar maddesinin *S. quadricauda* var. *longispina* üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Standart RR 120 çözeltisi Sigma'dan (Sigma–Aldrich Chemical Co., St. Louis, USA) temin edilmiştir.

RR 120'nin 1 g/l'lik stok çözeltisi hazırlanıp daha sonra kullanılmak üzere +4 °C'de saklanmıştır. Anyonik bir boyar madde olan RR 120'nin genel karakteristik özellikleri Tablo 3.2.'de ve moleküler yapısı Şekil 3.3.'de gösterilmiştir (Çelekli vd., 2009b).

**Tablo 3.2.** RR 120 boyar maddesinin genel karakteristik özellikleri (Çelekli vd., 2009b).

| Boyarmadde adı       | Procion Red HE-3B                     |
|----------------------|---------------------------------------|
| Kimyasal formülü     | $C_{44}H_{24}Cl_2N_{14}O_{20}S_6Na_6$ |
| Moleküler ağırlığı   | 1469,98                               |
| Color Index adı      | Reactive Red-120                      |
| CAS No               | 61951-82-4                            |
| $\lambda_{max}$ (nm) | 515                                   |



**Şekil 3.3.** RR 120 boyar maddesinin moleküler yapısı (Çelekli vd., 2009b).

### 3.5. Kadmiyum Konsantrasyonlarının Etkisi

*Scenedesmus* türü kesikli kültürlerde inkübe edilerek belirli biyokütleyle ulaşıncaya kadar devam etmiştir. Kesikli kültürler 5 lt'lik steril erlenlerde toplanmıştır. Homojenize edilen ana kültürden 400'er ml alınarak 500 ml'lik erlenlere aktarılmıştır. Mikroalg kültürü  $0,69 \pm 0,02$  g/l olduğunda  $Cd^{+2}$  etkisine maruz bırakılmıştır. Erlenler orbital çalkalayıcı üzerinde 150 devir/dk. çalkalanmış, 2000 lx ışık yoğunluğunda ve  $20 \pm 1$  °C'de 6 gün inkübe edilmiştir. Kültürlerin başlangıç absorbansları spektrofotometre (UV/VIS Jenway 6305) ile  $\lambda = 680$  nm dalga boyunda ölçülmüştür. Çalışmada  $Cd^{+2}$  etkilerini araştırmak için 0; 2,5; 7,5; 15 ve 30 mg/l konsantrasyonları çalışılmıştır. Kadmiyum konsantrasyonlarının *Scenedesmus* kültürü üzerine etkileri 2 tekrarlı olarak uygulanmıştır. İnkübasyon süresi boyunca (0. 2. 4. ve 6 gün) kültür absorbansı, klorofil *a*, *b* ve toplam karoten miktarları ölçülmüştür. Aynı zamanda inkübasyon süresi sonunda *Scenedesmus*'un MDA ve prolin miktarı belirlenmiştir.

### 3.6. Reactive Red 120 Etkisi

RR 120 konsantrasyonlarının *Scenedesmus* türü üzerine olan etkileri, kadmiyum konsantrasyonlarının etkileri çalışmalarına benzer şekilde yapılmıştır. Çalışmada 0, 5, 10, 20 ve 40 mg/l RR 120 konsantrasyonlarının etkileri incelenmiştir.  $Cd^{+2}$  denemelerinde olduğu gibi algin biyokütlesi, pigment, MDA ve prolin miktarları belirlenmiştir. Tüm denemeler iki tekrarlı yapılmıştır.

### 3.7. Analizler

#### 3.7.1. Biyokütle belirlenmesi

İnkübasyon süresince, kadmiyum ve RR 120 konsantrasyonları uygulanan kültürlerin yoğunlukları  $\lambda = 680$  nm'de spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Türün standart eğrisi kullanarak ağırlıkları belirlenmiştir. Absorbans değerleri mikroalgin biyokütle ağırlıklarına karşı çizilen standart eğriden yararlanılarak g/l olarak hesaplanmıştır.

#### 3.7.2. Pigment analizi

*Scenedesmus* türünün birim yaş ağırlık başına pigmentasyon (klorofil *a*, *b* ve toplam karoten) miktarı % 80 aseton metoduna göre belirlenmiştir (Wellburn, 1994). Belirli zamanlarda alınan alg kültürü 5000 devir/dk. 10 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant

uzaklaştırılarak alg biyokütlesi yaş ağırlık olarak belirlenmiştir. Pellet havanda 1–2 ml % 80’lik aseton ile homojenize edilmiştir. Daha sonra ekstraktın son hacmi 10 ml olacak şekilde % 80’lik aseton ile tamamlanmıştır. Bu numuneler kapaklı tüplere konularak sıcak su banyosu içerisinde 70 °C 5 dk. bekletilmiştir. Numuneler karanlıkta 5 dk. bekletildikten sonra 3000 devir/dk’da 5 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatantın absorbansları bir spektrofotometre (UV/VIS Jenway 6305) ile 663, 646 ve 470 nm dalga boylarında okunmuştur. Absorbans değerleri aşağıdaki formüller kullanılarak pigment miktarları hesaplanmıştır.

$$Klorofil \cdot a = 12,21A_{663} - 2,81A_{646}$$

$$Klorofil \cdot b = 20,13A_{646} - 5,03A_{663}$$

$$Toplam \cdot karoten = 1000A_{470} - 3,27C_a - 104C_b / 198$$

### 3.7.3. Prolin analizi

Serbest prolin miktarı Bates vd. (1973)’nin yöntemine göre belirlenmiştir. Yaş ağırlığı belirlenmiş olan alg materyali 5 ml % 3’lük sülfosalisilik asit kullanılarak havanda homojenize edilmiştir. Homojenizat 5000 devir/dk’da 10 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatantın 2 ml’si 2 ml asit-ninhidrin ve 2 ml glasiyel asetik asitle test tüpünde karıştırılmıştır. Bu karışım 100 °C’de 1 saat sıcak su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra tüpler alınarak buz içerisine bırakılıp reaksiyon sonlandırılmıştır. Reaksiyon karışımına 4 ml toluen eklenerek 15–20 sn. tüp karıştırıcıda çalkalanmıştır. Çözeltinin absorbansı 520 nm dalga boyunda spektrofotometrede (UV/VIS Jenway 6305) okunmuştur. Standart olarak L-Prolin (Merck KGaA Darmstadt, Germany) kullanılmıştır.

### 3.7.4. Malondialdehit (MDA) analizi

Alg biyokütlesindeki lipid peroksidasyonu MDA içeriğinin ölçülmesi ile belirlenmiştir (Zhou, 2001). Hasat edilen alg materyali % 10’luk trikloroasetik asit ile havanda homojenize edilmiştir. Homojenizat 10000 devir/dk’da 10 dk. santrifüj edilmiştir. Sonra homojenizattan 2 ml alınıp 2 ml % 1’lik tiyobarbitirik asit eklenerek 95 °C’de 30 dk. bekletilmiştir. Örnekler şok soğutma uygulamasına tabi tutulduktan sonra 532 nm’de spektrofotometrede (UV/VIS Jenway 6305)

okunmuştur. MDA (Merck Schuchardt CHG, Germany) kullanılarak standart eğri hazırlanmıştır.

### **3.7.5. Alg Materyalinin Karakterizasyonu**

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR–ATR; Fourier transform infrared equipped with an attenuated total reflection spectrometer) spektrometre (Perkin Emler Spectrum 100 FTIR–ATR Spectrofotometer) ile *Scenedesmus* türünün yapısı karakterize edilmiştir. Çalışmada, *Scenedesmus* türü biyokütlelerinin yüzey doğal yapısının, kadmiyum ve RR 120 uygulanmasından sonra temin edilen örneklerin yüzey yapıları belirlenerek kıyas yapılmıştır.

### **3.7.6. İstatistiksel Analizler**

Farklı deneme koşullarındaki alg biyokütlesi, pigment, MDA ve prolin ortalama miktarının gruplar arasında farklılıkları istatistiksel olarak belirlemek için Varyans Analizi (ANOVA) kullanılmıştır (Zar, J. H., 1999). Ayrıca ikiden fazla grupların kıyasında Duncan çoklu test kullanılmıştır. İstatistiksel analizler için SPSS versiyon 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) paket programından faydalanılmıştır.

## BÖLÜM 4

### BULGULAR ve TARTIŞMA

Kadmiyum ( $\text{Cd}^{+2}$ ) ve Reactive Red (RR) 120 boyar madde uygulamalarının *Scenedesmus quadricauda* var. *longispina* üzerine etkileri araştırılmıştır. Bunlar;

- (i) Çalışılan türün izolasyonu ve biyokütle eldesi,
- (ii)  $\text{Cd}^{+2}$  konsantrasyonları (0,0; 2,5; 7,5; 15,0 ve 30,0 mg/l) etkisi,
- (iii) RR 120 boyar maddesinin (0, 5, 10, 20 ve 40 mg/l) etkisi ve
- (iv) Uygulamalar sonucunda mikroalgin yüzey yapılarının FTIR–ATR ile belirlenmesi şeklindedir.

#### 4.1. Çalışılan Türün İzolasyonu ve Biyokütle Eldesi

*Scenedesmus* türü Gaziantep Üniversitesi Biyoloji Bölümü Alg Havuzu'ndan dilüsyon tekniği kullanılarak izole edilmiştir.

Çalışmada izole edilen alg türünün özellikleri;

- *Scenedesmus* türü tek hücreli veya 2, 4 ve 8'li hücrelerden oluşmuş sönobiyumlar halinde görülmüştür.
- Hücreler 3,5–5,0  $\mu\text{m}$  çapında ve 7,5–10,5  $\mu\text{m}$  uzunluğundadır. Spinler 7,5–10  $\mu\text{m}$  olduğu skalalı oküler yardımıyla ışık mikroskobu altında ölçülmüştür (Şekil 4.1.).
- Sönobiyumun dışta kalan hücrelerinin uç kısımlarında spin bulunurken içte kalan hücrelerde spin görülmemiştir.
- Her hücre pariyetel kloroplasta ve tek pirenoide sahiptir
- İzole edilen tür *Scenedesmus quadricauda* var. *longispina* özelliklerini göstermiştir. (Prescott, 1973; Komarek ve Fott, 1983).



**Şekil 4.1.** *S. quadricauda* var. *longispina* 'nın mikroskopik görüntüsü

Çalışmada kullanılan *S. quadricauda* var. *longispina* mikroalginin taksonomik sınıflandırılması aşağıda verilmiştir.

|                 |                                                                                     |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Domain</b>   | : Eukaryota                                                                         |
| <b>Alem</b>     | : Plantae                                                                           |
| <b>Şube</b>     | : Chlorophyta                                                                       |
| <b>Sınıf</b>    | : Chlorophyceae                                                                     |
| <b>Takım</b>    | : Sphaeropleales                                                                    |
| <b>Familiya</b> | : Scenedesmaceae                                                                    |
| <b>Cins</b>     | : <i>Scenedesmus</i>                                                                |
| <b>Tür</b>      | : <i>Scenedesmus quadricauda</i> var. <i>longispina</i> (Chodat) G.M. Smith<br>1916 |

#### 4.2. Başlangıç Kadmiyum Konsantrasyonları ve Etkileri

Çalışmada  $Cd^{+2}$ 'nin 0; 2,5; 7,5; 15 ve 30 mg/l konsantrasyonlarının *S. quadricauda* var. *longispina* üzerine etkileri çalışılmıştır. İnkübasyon süresince mikroalgın biyokütlesi, *S. quadricauda* var. *longispina*'nın klorofil *a*, *b*, karoten, MDA ve prolin miktarları kadmiyum derişimlerinden etkilenmiştir.

*S. quadricauda* var. *longispina*'nın kadmiyum konsantrasyonlarında biyokütle değerleri (g/l) Tablo 4.1.'de verilmiştir. Çalışma başlangıcında deneme gruplarının biyokütleleri arasında önemli bir fark görülmemiştir ( $p>0,05$ ).  $Cd^{+2}$  içermeyen ve 2,5 mg/l  $Cd^{+2}$  derişimine sahip grupta çalışma süresince biyokütlerde artış gözlenmiştir. Ancak bu artış istatistiksel olarak önemli bir artış değildir ( $p>0,05$ ). Daha yüksek

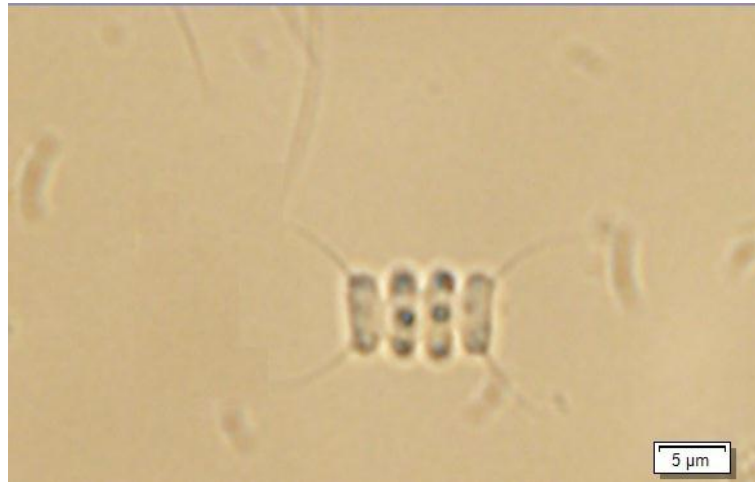
$\text{Cd}^{+2}$  derişimlerinde 2. günde mikroalg biyokütlesinde azalmalar olmuştur.  $\text{Cd}^{+2}$  derişimleri arttıkça algin biyokütlesindeki azalma daha fazla olmuştur. Biyokütledeki bu azalmalar yerini inkübasyonun 4. ve 6.günlerinde artışa bırakmıştır. Ancak bu artışlar istatistiksel olarak önemli değildir ( $p>0,05$ ). En düşük mikroalg biyokütlesi 30 mg/l  $\text{Cd}^{+2}$  konsantrasyonunda elde edilmiştir. Ağır metal alg biyokütlesinin üzerine sınırlayıcı bir etki yapmıştır. *Spirulina platensis* üzerine  $\text{Pb}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  gibi ağır metal uygulamalarında benzer sonuçlar görülmüştür (Tasneem vd., 2007). Düşük  $\text{Cd}^{+2}$  konsantrasyonları *Scenedesmus quadricauda*'da hücre sayısını azaltmıştır (Mohammed ve Markert, 2006). *Scenedesmus acutus* gelişiminin bakır etkisinde azaldığı ifade edilmiştir (Abd-El-Monem vd., 1998).

**Tablo 4.1.** Kadmiyum konsantrasyonlarının *S. quadricauda* var. *longispina*'nın biyokütlesi üzerindeki etkileri.

| t (gün) | 0                    | 2,5 mg/l             | 7,5 mg/l             | 15,0 mg/l            | 30,0 mg/l            |
|---------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 0       | 0,703 <sup>A,a</sup> | 0,672 <sup>A,a</sup> | 0,697 <sup>A,a</sup> | 0,701 <sup>A,a</sup> | 0,712 <sup>A,a</sup> |
| 2       | 0,712 <sup>A,a</sup> | 0,678 <sup>A,a</sup> | 0,676 <sup>A,a</sup> | 0,654 <sup>A,a</sup> | 0,648 <sup>A,a</sup> |
| 4       | 0,723 <sup>A,a</sup> | 0,686 <sup>A,a</sup> | 0,682 <sup>A,a</sup> | 0,663 <sup>A,a</sup> | 0,654 <sup>A,a</sup> |
| 6       | 0,760 <sup>A,a</sup> | 0,711 <sup>A,a</sup> | 0,690 <sup>A,a</sup> | 0,671 <sup>A,a</sup> | 0,661 <sup>A,a</sup> |

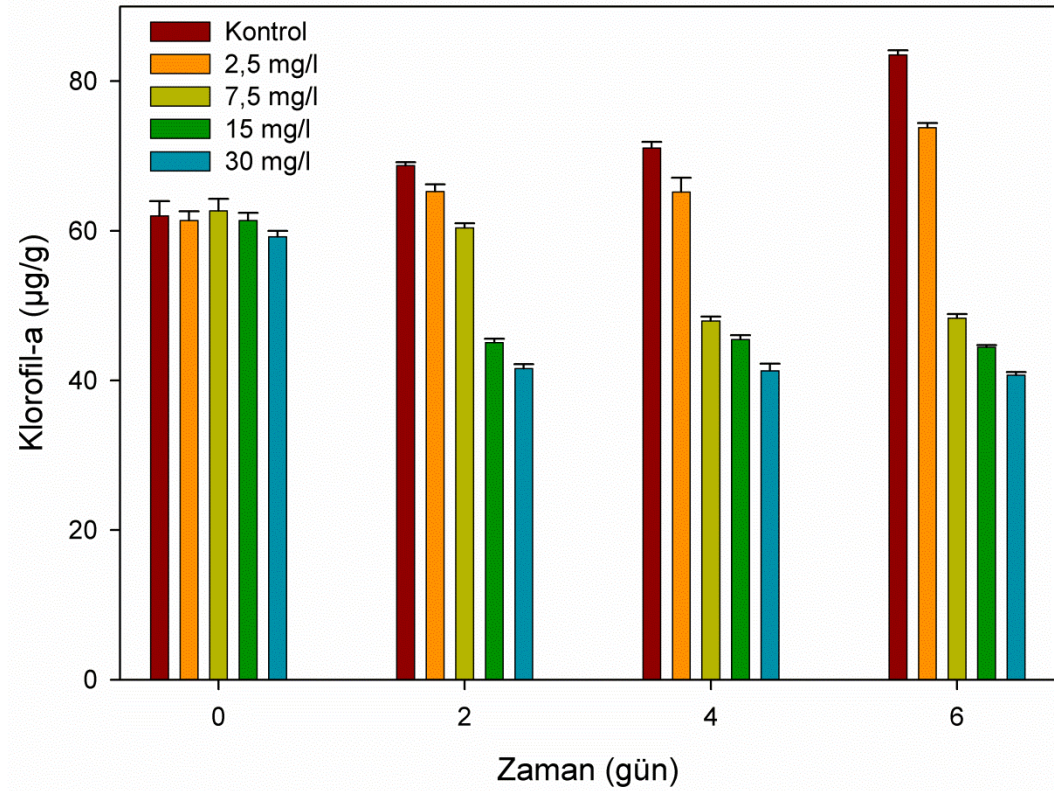
Büyük harfler: Aynı grubun zamana göre kıyasını ifade etmektedir.

Küçük harfler: Belirli kültür zamanında gruplar arasında kıyası ifade etmektedir.



**Şekil 4.2.** Kadmiyum stresinin *Scenedesmus* türünün morfolojisi üzerine etkisi.

Kadmiyum stresinin *Scenedesmus*'ta oluşturduğu morfolojik değişiklikler Şekil 4.2.'te verilmiştir.  $Cd^{+2}$  stresine maruz kalan *Scenedesmus* hücrelerinde klorozis meydana gelmiştir. Kadmiyum konsantrasyonlarının *S. quadricauda* var. *longispina* 'nın fotosentetik pigment miktarları üzerindeki etkileri Şekil 4.3., 4.4. ve 4.5.'te gösterilmiştir. Klorofil *a* miktarının kontrol ve farklı kadmiyum grupları arasındaki değişim Şekil 4.3.'te verilmiştir. Çalışma gruplarının başlangıç klorofil *a* miktarları arasında önemli farklılık gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ). Kontrol ve 2,5 mg/l kadmiyum derişiminde çalışma süresince klorofil *a* miktarında artış gözlenmiştir. Ancak kontrol grubundaki klorofil *a* artışı önemli iken ( $p<0,05$ ) 2,5 mg/l'lik derişimdeki klorofil *a* artışı önemli bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Uygulanan diğer  $Cd^{+2}$  derişimlerinde klorofil *a* miktarı azalmıştır. 7,5 mg/l  $Cd^{+2}$  derişiminde klorofil *a* miktarı çalışmanın ilk iki günündeki azalış önemli görülmez iken ( $p>0,05$ ) daha sonra bu azalma önemli olmuştur ( $p<0,05$ ). 15 ve 30 mg/l'lik  $Cd^{+2}$  konsantrasyonlarında klorofil *a* miktarındaki azalma 2. günde görülmüştür ( $p<0,05$ ) ve daha sonra önemli bir değişim gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ). En düşük klorofil *a* miktarı 30 mg/l'lik  $Cd^{+2}$  derişimde bulunmuştur. Sonuç olarak  $Cd^{+2}$  derişimlerinin klorofil *a* miktarını önemli derecede etkilediği görülmüştür. Ortamda  $Cd^{+2}$  konsantrasyonu arttıkça klorofil *a* miktarının azaldığı görülmüştür. Omar (2002) çalışmasında *Scenedesmus obliquus* ve *Scenedesmus quadricauda* algleri üzerine farklı çinko ( $Zn^{+2}$ ) derişimleri (0,5; 1,5; 4,5 ve 8 mg/l) uygulamıştır. Düşük  $Zn^{+2}$  derişimleri klorofil *a* miktarını önemli şekilde etkilemezken yüksek  $Zn^{+2}$  derişimleri ise klorofil *a* miktarını önemli derecede azalttığı belirtilmiştir. Moradshahi vd. (2009) yaptıkları çalışmada *Dunaliella tertiolecta* algine farklı konsantrasyonlarda civa klorür ( $HgCl_2$ ) (5, 10, 20 ve 50  $\mu M$ ) uygulamışlardır. Civa derişim arttıkça klorofil *a* miktarında azalma gözlenmiştir.  $Cd^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  ve  $Cr^{+2}$  ağır metallerinin *Scenedesmus incrasatulus* algî üzerine etkilerini çalışmışlardır (Pena-Castro vd. 2004a). Ağır metal stresine maruz bırakılan algde klorofil *a* miktarı azalmıştır. Li vd. (2005) yaptıkları çalışmada *Scenedesmus obliquus* büyümesi ve pigmentleri üzerine Cypermethrin'in toksisitesini çalışmışlardır. Çalışma sonucunda bu ilacın klorofil *a* miktarında azalmaya sebep olduğu gözlenmiştir. *Chlorella vulgaris* ve *D. tertiolecta* yeşil alglerinde gümüş nano partiküllerinin etkileri çalışılmıştır (Popovic vd., 2012). Gümüş partikülleri alg türlerinde MDA miktarının artışına sebep olmuştur. Yuan vd. (2012) enrofloxacininin (ENFX) *S. obliquus* algî üzerine etkilerini araştırmışlar. ENFX derişimleri klorofil *a* miktarını azaltmıştır.

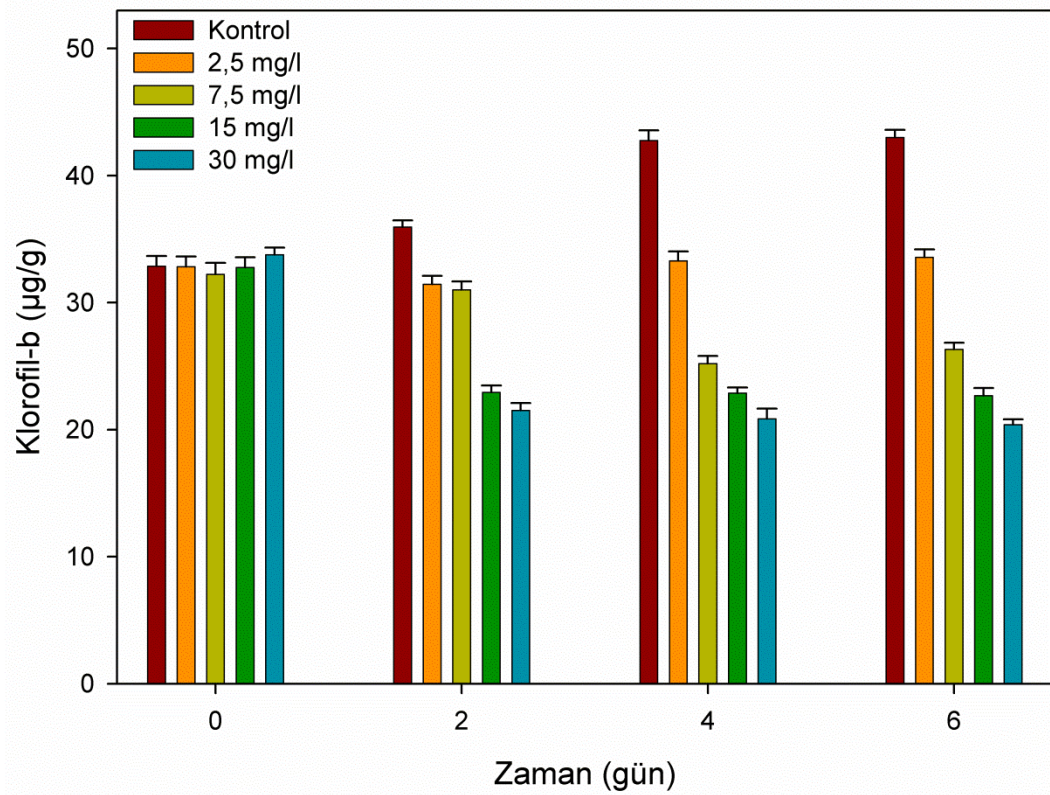


**Şekil 4.3.** Kadmiyum konsantrasyonlarının klorofil *a* miktarı üzerine etkisi

Kadmiyum derişimlerinin *S. quadricauda* var. *longispina*'nın klorofil *b* miktarına etkisi Şekil 4.4.'de verilmiştir. Aynı kültürden oluşturulan çalışma gruplarının başlangıç klorofil *b* miktarları benzer sonuçlar göstermiştir ( $p>0,05$ ). Çalışma süresince kontrol grubunun klorofil *b* miktarı artmıştır. Ancak 2. ve 4. günde artış önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). İnkübasyon süresince 2,5 mg/l  $Cd^{+2}$  derişiminde klorofil *b* miktarında önemli değişimler olmamıştır ( $p>0,05$ ). İnkübasyonun 2. gününde 7,5 mg/l  $Cd^{+2}$  derişiminde klorofil *b* miktarı önemli bir değişiklik göstermezken ( $p>0,05$ ), 4. günde klorofil *b* miktarında istatistiksel olarak önemli bir azalma görülmüştür. Daha yüksek  $Cd^{+2}$  konsantrasyonlarında ise 2. günde önemli azalmalar görülmüştür ( $p<0,05$ ) ve daha sonraki günlerde önemli bir değişim olmamıştır ( $p>0,05$ ). Çalışma sonunda Duncan's testine göre klorofil *b* miktarı gruplar arasında önemli farklılık göstermiştir. En düşük klorofil *b* miktarı 30 mg/l'lik  $Cd^{+2}$  derişiminde elde edilmiştir.

Çinko ( $Zn^{+2}$ ) derişimlerinin (0,5; 1,5; 4,5 ve 8 mg/l) *S. obliquus* ve *S. quadricauda*'da pigmentasyon üzerine etkileri çalışılmıştır (Omar, 2002). Benzer

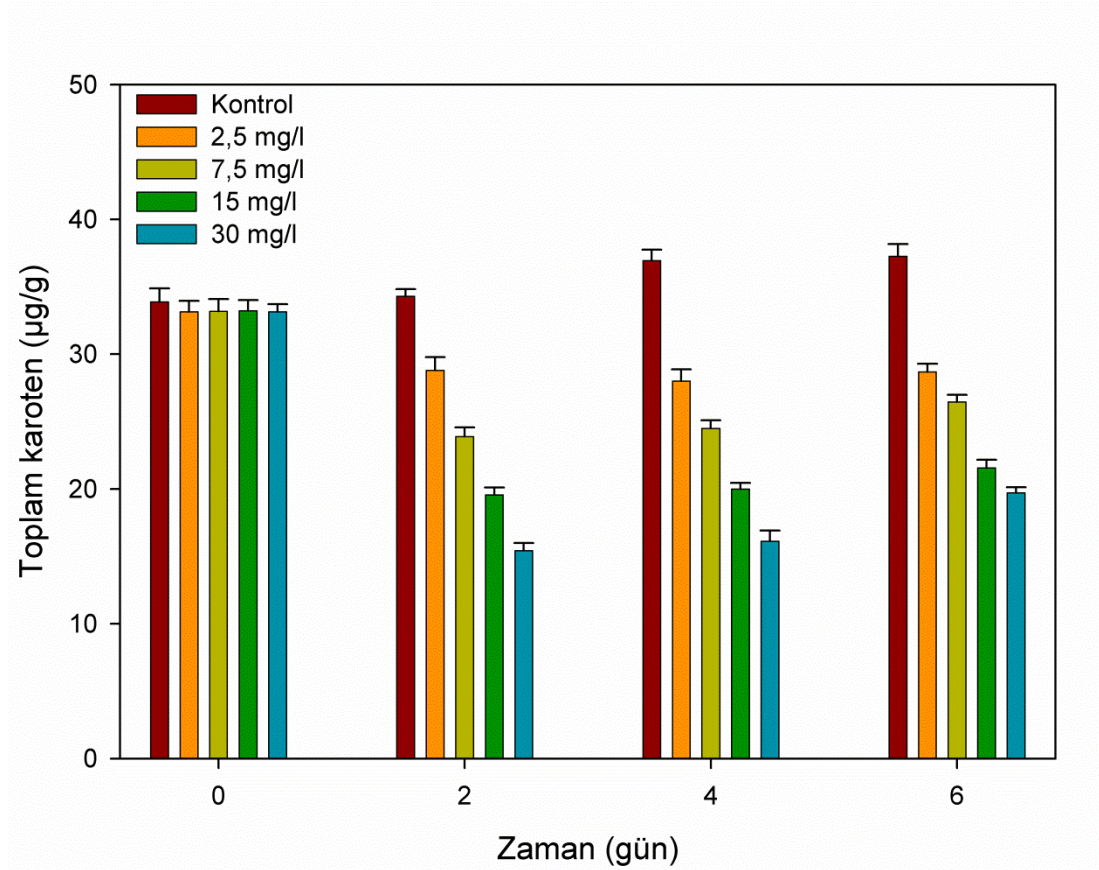
olarak düşük  $Zn^{+2}$  derişimlerinde klorofil *b* miktarı önemli değişimler göstermezken yüksek  $Zn^{+2}$  derişimlerinde klorofil *b* miktarında önemli derecede azalmasına neden olmuştur. Chen vd. (2012) çalışmalarında *S. obliquus* türüne bakır derişimleri uygulamışlardır. Bakır derişiminin artması klorofil *b* miktarının azalmasına neden olmuştur. Kadmiyum toksisitesinden dolayı klorofil miktarında oluşan bu azalmalar, klorofil biyosentezi ile ilişkili enzimlerin inhibisyonu ve/veya klorofil molekülünün tetrapirel halkasındaki  $Mg^{+2}$ ,nin yerine  $Cd^{+2}$  bağlanması sonucunda olmuş olabilir (Padmaja vd., 1990; Van Assche vd., 1990; Küpper vd., 1996).



**Şekil 4.4.** Kadmiyum konsantrasyonlarının klorofil *b* miktarı üzerine etkisi.

Kadmiyum derişimlerinin *S. quadricauda* var. *longispina*'nın toplam karoten miktarlarına etkisi Şekil 4.5.'te verilmiştir. İnkübasyon başlangıcında grupların toplam karoten miktarları arasında önemli fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Çalışma süresince kontrol grubunun toplam karoten miktarında artış olmuş fakat bu artış önemli değildir ( $p>0,05$ ). Kadmiyum uygulanan tüm grupların toplam karoten miktarlarında 2. günde önemli azalmalar görülmüştür ( $p<0,05$ ). 15 ve 30 mg/l  $Cd^{+2}$  derişimlerinde 2. günden sonra toplam karoten miktarında artış olmuştur. Çalışma

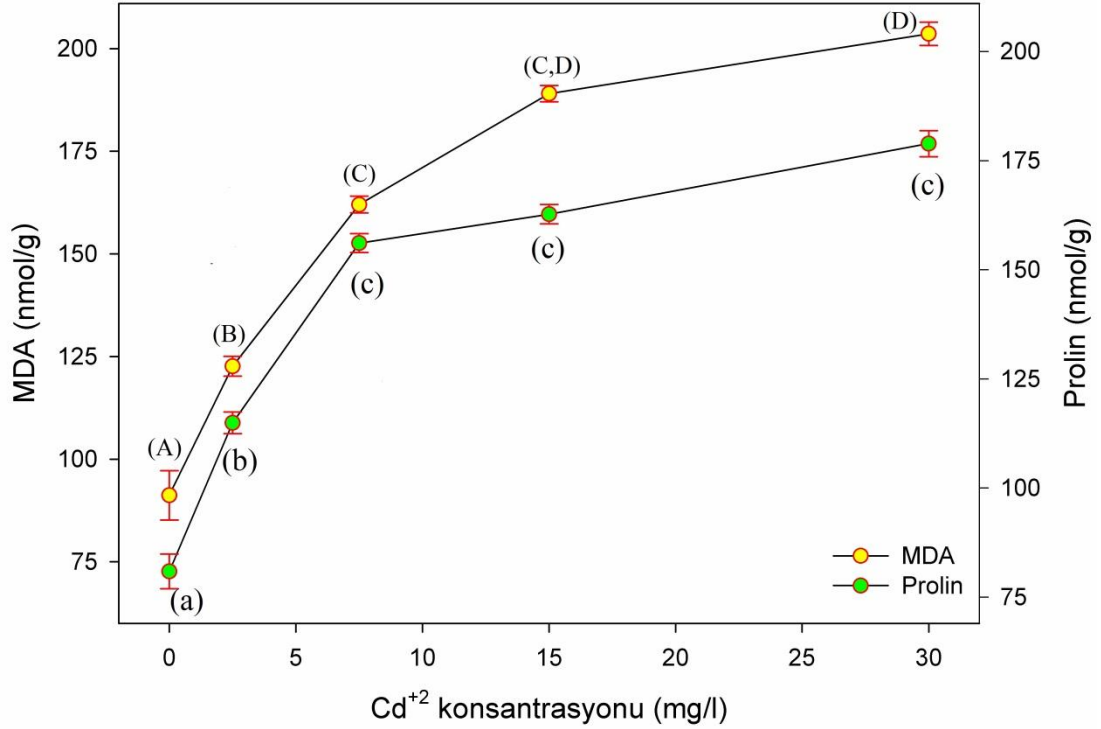
sonunda  $Cd^{+2}$  konsantrasyonlarının artması ile toplam karoten miktarını azaltmıştır. Vela vd. (2007) *S. incrassatus* ile yaptıkları çalışmada öldürücü düzeyde olmayan bakır ( $Cu^{+2}$ ) derişimleri uygulamışlardır. Dört günlük uygulama sonunda karoten miktarında azalış olduğunu belirlemiştir. *Cylindrospermum* sp. mavi yeşil algı UV-B ve tuz stresine maruz bırakılmıştır (Chris vd., 2006). Stres faktörleri alg türlerinde karoten miktarının azalmasına neden olmuştur. Omar (2002) çinko ( $Zn^{+2}$ ) derişimlerinin (0,5; 1,5; 4,5 ve 8 mg/l) *S. obliquus* ve *S. quadricauda* mikroalglerinin karoten miktarı üzerine etkilerini çalışmıştır. *S. obliquus* 'un karoten miktarı 1,5 mg/l  $Zn^{+2}$  derişimine kadar artmış diğer derişimlerde azalmıştır. *S. quadricauda* mikroalginde ise karoten miktarındaki artış 0,5 mg/l  $Zn^{+2}$  derişiminde olmuştur ve diğer derişimlerde azalmıştır.



**Şekil 4.5.** Kadmiyum konsantrasyonlarının toplam karoten miktarı üzerine etkisi

Kadmiyum konsantrasyonlarının (0; 2,5; 7,5; 15 ve 30 mg/l) *S. quadricauda* var. *longispina* 'nın MDA ve prolin miktarları üzerine etkileri Şekil 4.6.'da verilmiştir. Çalışma sonunda kontrol grubunun MDA miktarı 91,20 nmol/g, 2,5 mg/l  $Cd^{+2}$  derişiminde 122,62 nmol/g, 7,5 mg/l  $Cd^{+2}$  derişiminde 162,02 nmol/g, 15 mg/l  $Cd^{+2}$

derişiminde 189,02 nmol/g ve 30 mg/l  $\text{Cd}^{+2}$  derişiminde ise 203,59 nmol/g olarak bulunmuştur. Kontrol grubuyla kıyaslandığında artan kadmiyum konsantrasyonlarına bağılı olarak MDA miktarlarında önemli derecede artış meydana gelmiştir ( $p<0,05$ ). Gruplar arasındaki farklılık büyük harflerle sembolize edilmiştir (Şekil 4.6). En fazla MDA miktarı 30 mg/l kadmiyum derişiminde gözlenmiştir.



**Şekil 4.6.** Kadmiyum konsantrasyonlarının MDA ve prolin miktarı üzerine etkisi.

Büyük harfler: Farklı gruplardaki MDA miktarının kıyasını ifade etmektedir.

Küçük harfler: Farklı gruplardaki prolin miktarının kıyasını ifade etmektedir.

Kadmiyum konsantrasyonlarının *S. quadricauda* var. *longispina*’nın prolin miktarı üzerine etkisi Şekil 4.6.’da verilmiştir. İnkübasyon sonunda kontrol grubunun prolin miktarı 80,89 nmol/g, 2,5 mg/l  $\text{Cd}^{+2}$  derişiminde 114,93 nmol/g, 7,5 mg/l  $\text{Cd}^{+2}$  derişiminde 156,10 nmol/g, 15 mg/l  $\text{Cd}^{+2}$  derişiminde 162,71 nmol/g ve 30 mg/l  $\text{Cd}^{+2}$  derişiminde 178,89 nmol/g olarak bulunmuştur. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında kadmiyum uygulanan bütün grupların prolin miktarında önemli derecede artış meydana geldiği görülmüştür ( $p<0,05$ ). Ancak 7,5; 15 ve 30 mg/l  $\text{Cd}^{+2}$  uygulanan gruplarda prolin miktarındaki artış kontrole göre önemliyken ( $p<0,05$ ) kendi aralarında önemsiz bulunmuştur ( $p>0,05$ ). Prolin miktarı en fazla 30 mg/l  $\text{Cd}^{+2}$  derişiminde bulunmuştur. Tripathi ve Gaur (2004), *Scenedesmus* sp. algi üzerine

farklı derişimlerde  $\text{Cu}^{+2}$  ve  $\text{Zn}^{+2}$  uygulamışlardır.  $\text{Cu}^{+2}$  ve  $\text{Zn}^{+2}$  elementlerine maruz kalan mikroalgde prolin ve MDA miktarlarında artış olmuştur. Zn uygulamalarına göre Cu derişimlerinde prolin ve MDA miktarı daha fazla olmuştur. El- Enany ve Issa (2001), yaptıkları çalışmada *Scenedesmus armatus* algine  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$   $\text{Ni}^{+2}$  ağır metallerini uygulamışlardır. Uygulama sonucunda her metal prolin miktarında artış sebep olmuştur. En fazla prolin miktarı  $\text{Cd}^{+2}$ 'de bulunmuştur. ENFX derişimlerinin *S. obliquus* algi üzerine etkileri çalışılmıştır (Yuan vd., 2012). ENFX derişimleri MDA ve prolin miktarını arttırmıştır. Bakır ve kadmiyumun *Chlorella* ve *Nitzschia* üzerine prolin akümülyasyonunun etkileri çalışılmıştır (Wu vd., 1995). Her iki metalle test edilen prolin miktarının en fazla *Chlorella*'da en az *Nitzschia*'da meydana geldiğini belirlemişlerdir.

$\text{Cd}^{+2}$  derişimlerinin artmasının alglerde doğrudan veya dolaylı ROT'ları tetikleyerek lipit peroksidasyonuna neden olduğu belirtilmiştir (Smeets vd., 2005). Uygulanan  $\text{Cd}^{+2}$  konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak *S. quadricauda* var. *longispina* alginde MDA miktarındaki artışlar metalin toksisitesinin alg membranlarında neden olduğu oksidatif hasarın bir indikatörü olabilir. Kadmiyum derişimleri etkisinde algin prolin miktarındaki bu artışların nedenleri hücre içi pH ve  $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$  oranlarının düzenlenmesinde ve/veya reaktif oksijen türlerinin temizlenmesinde bu aminoasidin bir rolünün olmasından dolayı olabilir (Sharmila ve Pardha Saradhi, 2002). Bazı araştırmacılar metalin prolin tarafından şelatlanıp detoksifikasyonunda görev yaptığını da belirtmiştir (Farago ve Mullen, 1979).

#### 4.3. Kadmiyum FTIR–ATR Analizi

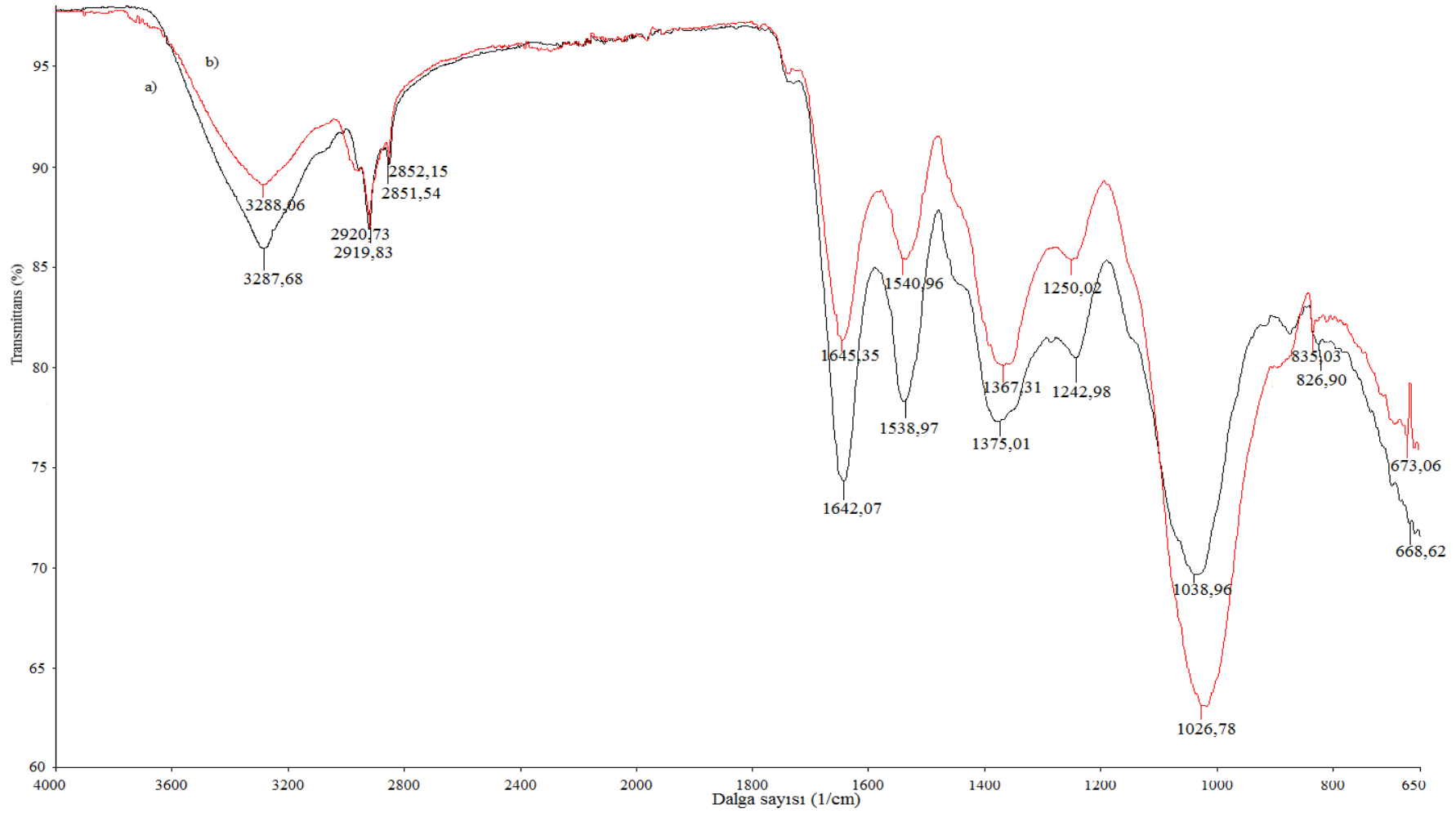
*S. quadricauda* var. *longispina*'nın doğal,  $\text{Cd}^{+2}$  uygulamalarından sonraki yüzey yapıları FTIR–ATR ile analiz edilmiştir. FTIR-ATR analizi sonuçları Şekil 4.7a ve b'de verilmiştir.

*S. quadricauda* var. *longispina*'nın doğal yapısının FTIR-ATR analizi sonucunda 3288, 2920, 2852, 1642, 1539, 1375, 1243 ve 1039  $1/\text{cm}$  gibi pikler önemli görülmüştür. Spektrumda 3288 ve 2920  $1/\text{cm}$ 'deki pikler –OH ve  $\text{NH}_2$  gruplarını, 2852  $1/\text{cm}$ 'deki pik –CH grubunu göstermektedir (Arief vd., 2008; Çelekli vd., 2012). 1642  $1/\text{cm}$ 'deki pik amid, N–H, imin gruplarını, 1539  $1/\text{cm}$ 'deki bant –N–H grubunu, 1375  $1/\text{cm}$ 'deki pik – $\text{CH}_3$  antisim etkileşimini 1243  $1/\text{cm}$ 'deki pik – $\text{SO}_3$

grubunu, 1039 1/cm'deki pik ise –C–O gruplarını göstermektedir (Arief vd., 2008; Onyancha vd., 2008; Vijayaraghavan ve Yun, 2008; Çelekli vd., 2009c; Çelekli vd., 2012).

*S. quadricauda* var. *longispina*'nın kadmiyum uygulamasından sonraki yüzey yapısının FTIR analizi sonuçları Şekil 4.7b.'de gösterilmiştir. Kadmiyum uygulaması sonrası *Scenedesmus* üzerindeki bazı pikler aynı kalırken bazı piklerin değiştiği görülmüştür. Uygulamadan önce oluşan 1375, 1243, 1642, 1039 1/cm pikleri uygulamadan sonra değişip yerini, 1367, 1250, 1645, 1027 1/cm piklerine bırakmıştır.  $Cd^{+2}$  derişimine maruz kalan mikroalgdeki hücre yapısı değişmiştir. Bu durum *Scenedesmus* biyokütlesi üzerinde kadmiyumun tutulduğunu göstermiştir.

FTIR–ATR analizleri  $Cd^{+2}$  'un biyosorpsiyonunda mikroalgin yüzey yapısındaki amino, amid ve anyonik gruplar rol oynamıştır (Onyancha vd., 2008; Vijayaraghavan ve Yun, 2008; Çelekli vd., 2010; Çelekli vd., 2012).

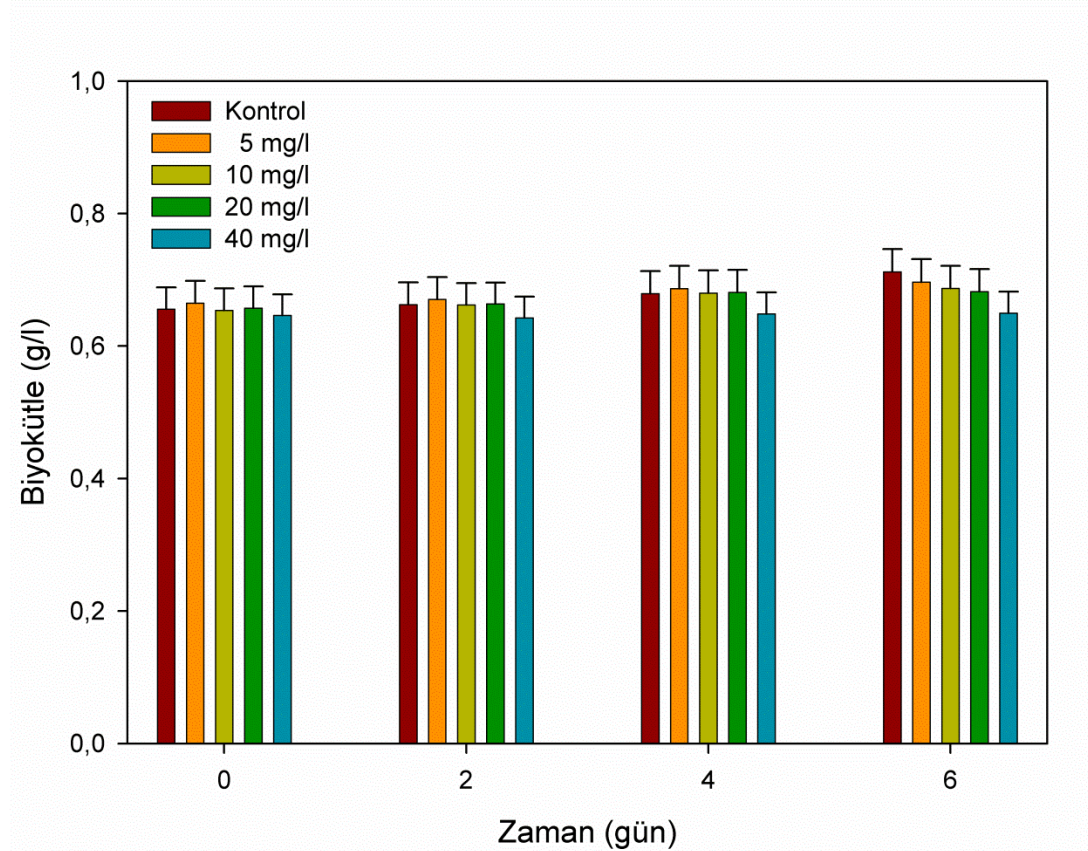


Şekil 4.7. *S. quadricauda* var. *longispina*'nın (a) doğal ve (b) kadmiyum uygulamasından sonraki FTIR–ATR analizi

#### 4.4. Reactive Red 120'nin Etkileri

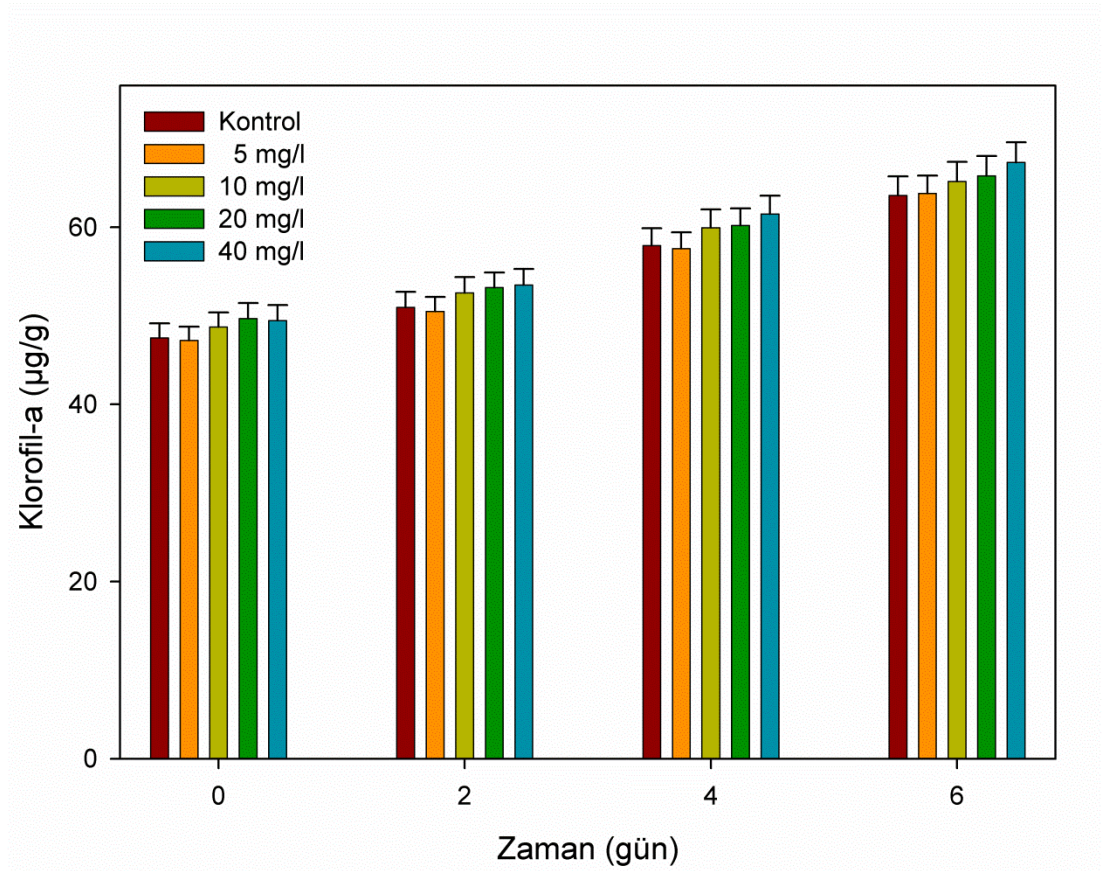
Çalışmada inkübasyon süresince RR 120 derişimlerinin inkübasyon *S. quadricauda* var. *longispina*'nın biyokütle, klorofil *a*, *b*, karoten, MDA ve prolin miktarı üzerine etkileri araştırılmıştır.

RR 120 konsantrasyonlarında *S. quadricauda* var *longispina*'nın biyokütlesindeki değişimler Şekil 4.8.'de verilmiştir. Çalışma başlangıcında grupların biyokütleleri arasında önemli bir fark yoktur ( $p>0,05$ ). Kontrol grubunda inkübasyon süresince biyokütlede az bir artış olup istatistiksel olarak önemli değildir ( $p>0,05$ ). Çalışmada RR 120 derişimleri etkisinde biyokütlede gerek grup içi gerekse gruplar arası önemli bir fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Dolayısıyla RR 120 mikroalgin biyokütlesi üzerinde herhangi önemli bir etkiye sebep olmamıştır. *Spirulina platensis*'in boya alımı ve biyokütle üzerine başlangıç RR 120 derişimlerinin etkileri araştırılmıştır (Çelekli vd., 2009c). Uygulanan boya konsantrasyonları arttıkça (15, 25, 50, 75 ve 100 mg/l) biyokütle üretimininde kontrole göre azaldığı görülmüştür. .



Şekil 4.8. RR 120 konsantrasyonlarının *S. quadricauda* var. *longispina*'nın biyokütlesi üzerindeki etkisi.

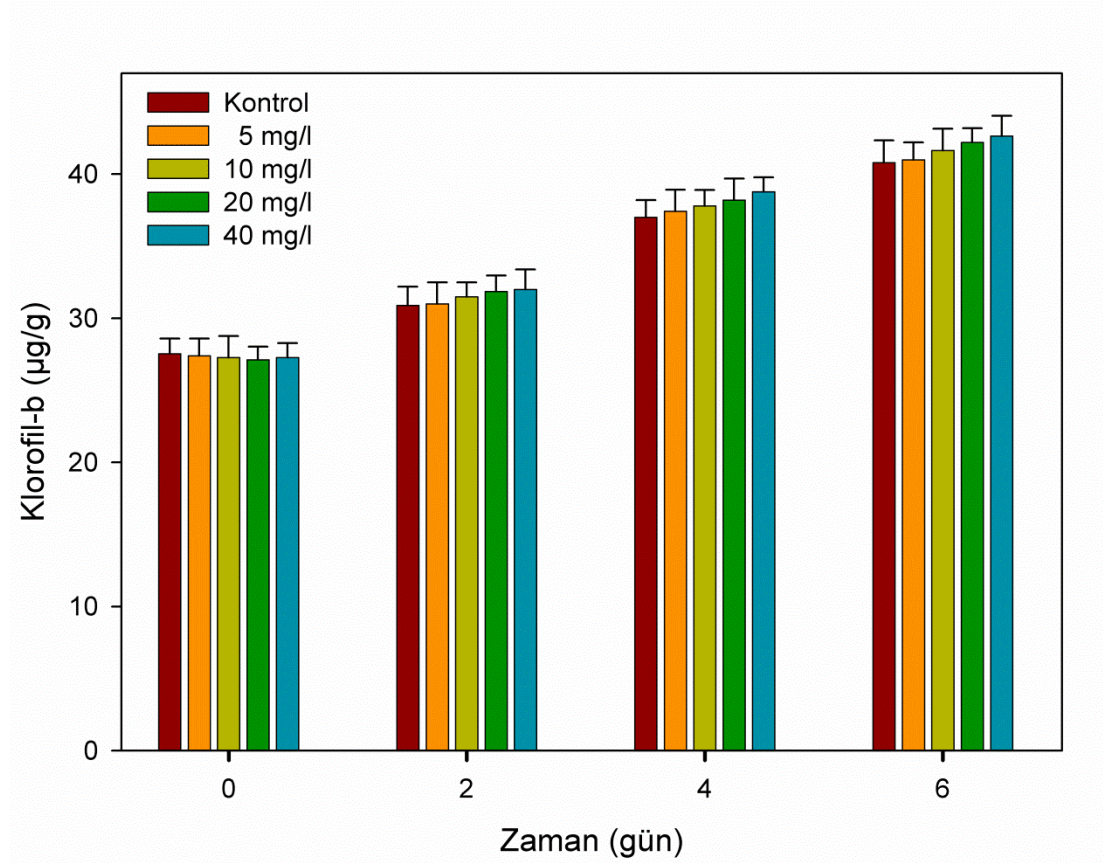
Farklı RR 120 konsantrasyonlarının *S. quadricauda* var. *longispina* 'nın fotosentetik pigment miktarları üzerindeki etkileri Şekil 4.9., 4.10. ve 4.11.'de gösterilmiştir. RR 120 derişimi klorofil *a* miktarı üzerine etkileri Şekil 4.9.'da verilmiştir. Başlangıç klorofil *a* miktarları gruplar arasında önemli bir fark görülmemiştir ( $p>0,05$ ). İnkübasyonun 2. gününde 40 mg/l RR 120 içeren grup hariç diğer gruplarda klorofil *a* miktarında önemli bir değişim olmamıştır. 40 mg/l RR 120'de klorofil *a* miktarı inkübasyon süresince artmıştır ve bu artış önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Çalışma sonunda klorofil *a* miktarlarında bütün gruplarda başlangıç miktarlarına göre önemli bir artış gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). En yüksek klorofil *a* miktarı 40 mg/l RR 120'de görülmüştür.



**Şekil 4.9.** RR 120 konsantrasyonlarının *S. quadricauda* var. *longispina* 'da klorofil *a* miktarı üzerine etkisi

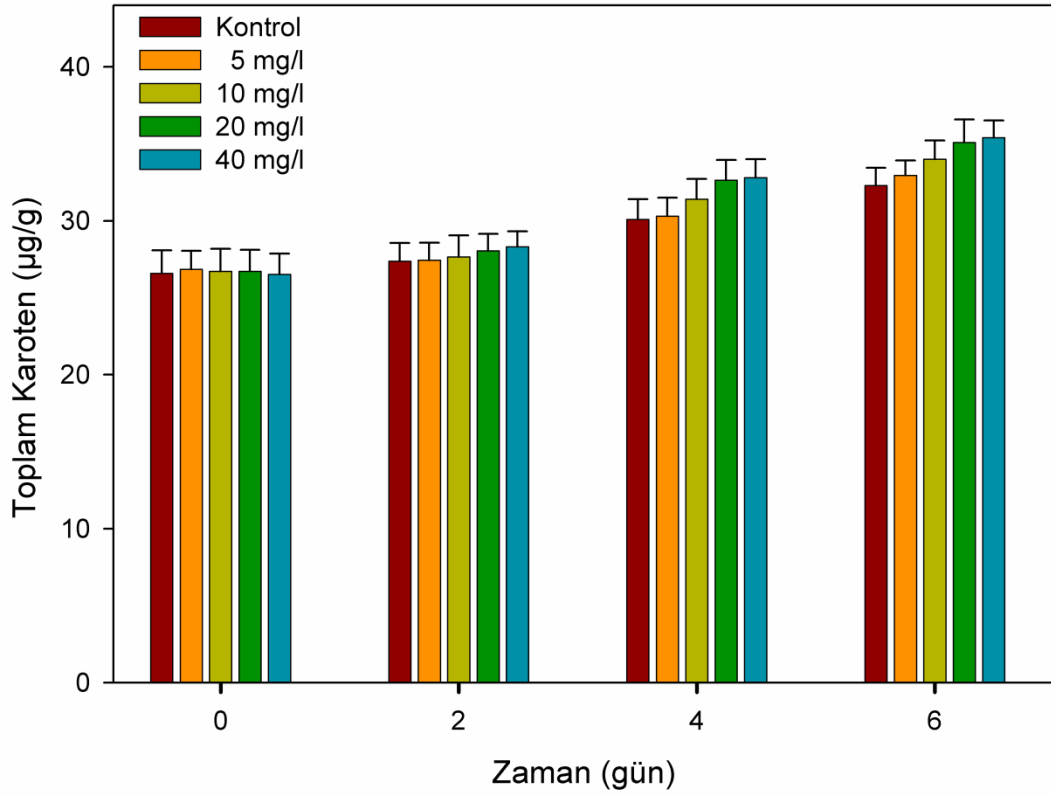
RR 120 konsantrasyonlarının klorofil *b* miktarı üzerine etkileri Şekil 4.10.'da verilmiştir. Çalışma başlangıcında benzer olan klorofil *b* miktarları inkübasyon süresince değişmiştir. Klorofil *b* miktarlarındaki artış sadece kontrol grubunda olmayıp RR 120 derişimlerinde de görülmüştür. Gruplardaki bu artış istatistiksel

olarak önemlidir ( $p<0,05$ ). İnkübasyonun 0. 2. 4. ve 6. günlerde gruplar arası önemli farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Çalışma sonunda en yüksek klorofil *b* miktarı 40 mg/l RR 120’de görülmüştür.



**Şekil 4.10.** RR 120 konsantrasyonlarının *S. quadricauda* var. *longispina*’da klorofil *b* miktarı üzerine etkisi

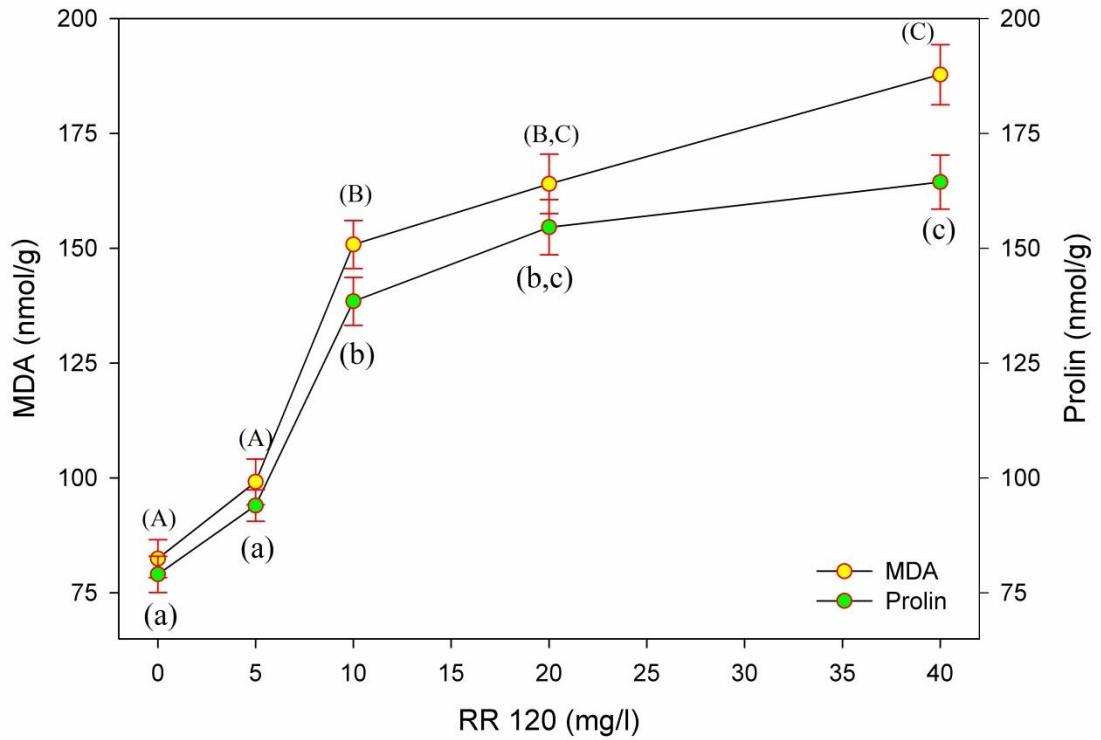
RR 120 uygulamalarının *S. quadricauda* var. *longispina*’nın toplam karoten miktarına etkisi Şekil 4.11’de verilmiştir. Çalışma başlangıcında grupların toplam karoten miktarları arasında önemli fark yoktur ( $p>0,05$ ). İnkübasyon süresince bütün grupların karoten miktarları artış göstermiştir. Toplam karoten miktarlarındaki bu artışlar 40 mg/l RR 120 derişimine sahip grupta 2. günden başlayıp çalışma sonuna kadar önemli olmuştur ( $p<0,05$ ). Diğer gruplarda ise karoten miktarındaki artışlar 4. günden itibaren önemli görülmeye başlayıp çalışma sonuna kadar artış önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Çalışma sonunda en yüksek karoten miktarı 40 mg/l RR 120 derişimine sahip grupta görülmüştür.



**Şekil 4.11.** Farklı RR 120 konsantrasyonlarının *S. quadricauda* var. *longispina*'da toplam karoten miktarı üzerine etkisi

RR 120 etkisindeki mikroalg kültüründe RR 120 konsantrasyonlarının ışığı maskeleye özelliği olduğundan dolayı ışıktan daha fazla yararlanabilmek için klorofil *a*, *b* ve karoten miktarlarında artış olmuş olabilir.

RR 120 konsantrasyonlarının *S. quadricauda* var. *longispina*'nın MDA ve prolin miktarları üzerine etkisi Şekil 4.12'de verilmiştir. Çalışma sonunda MDA miktarı kontrol grubu için 82,43 nmol/g, 5 mg/l RR 120 için 99,15 nmol/g, 10 mg/l RR 120 için 150,80 nmol/g, 20 mg/l RR 120 için 163,99 nmol/g ve 40 mg/l RR 120 de 187,78 nmol/g olarak ölçülmüştür. Kontrol grubuna göre RR 120 derişimlerinde grupların MDA miktarı artmıştır. Bu artışlardan sadece 5 mg/l RR 120 de MDA miktarı ile kontrol grubu arasında önemli bir fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Diğer RR 120 gruplarında MDA miktarlarındaki artış önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). RR 120 konsantrasyonlarının artması *S. quadricauda* var. *longispina*'da MDA miktarının artmasına neden olmuştur.



**Şekil 4.12.** Farklı RR 120 derişimlerinin *S. quadricauda* var. *longispina*'da MDA ve prolin miktarı üzerine etkisi.

Büyük harfler: Farklı gruplardaki MDA miktarının kıyasını ifade etmektedir.

Küçük harfler: Farklı gruplardaki prolin miktarının kıyasını ifade etmektedir.

Prolin miktarı kontrol grubunda 79,00 nmol/g, 5 mg/l RR 120'de 94,00 nmol/g, 10 mg/l RR 120'de 138,44 nmol/g 20 mg/l RR 120'de 154,59 nmol/g ve 40 mg/l RR 120'de 164,40 nmol/g bulunmuştur. Kültürde RR 120 miktarının artması ile mikroalgde prolin miktarının arttığı görülmüştür. En fazla prolin miktarı 40 mg/l RR 120'de bulunmuştur. Prolin miktarında kontrol ve 5 mg/l RR 120 grupları arasında önemli bir fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Ancak kontrol ile diğer RR 120 grupları arasında miktarları bakımından önemli artışlar görülmüştür ( $p<0,05$ ). Choo vd. (2004) yaptıkları çalışmada, sıcaklık ve ışığın *Cladophora glomerata* ve *Enteromorpha ahlneriana* türlerindeki oksidatif stres toleransını çalışmışlardır. Yüksek sıcaklık ve yüksek foton etkisindeki MDA miktarı düşük sıcaklık ve yüksek foton etkisindeki MDA miktarından daha fazla olmuştur. Aynı şartlarda bu iki alg türü kıyaslandığı zaman ise *E. ahlneriana* tarafından üretilen MDA miktarı, *C. glomerata*'da meydana gelen MDA miktarından daha fazla olduğunu belirlemişlerdir. Bu durum her türün belirli çevresel koşullara karşı tepkisinin ve

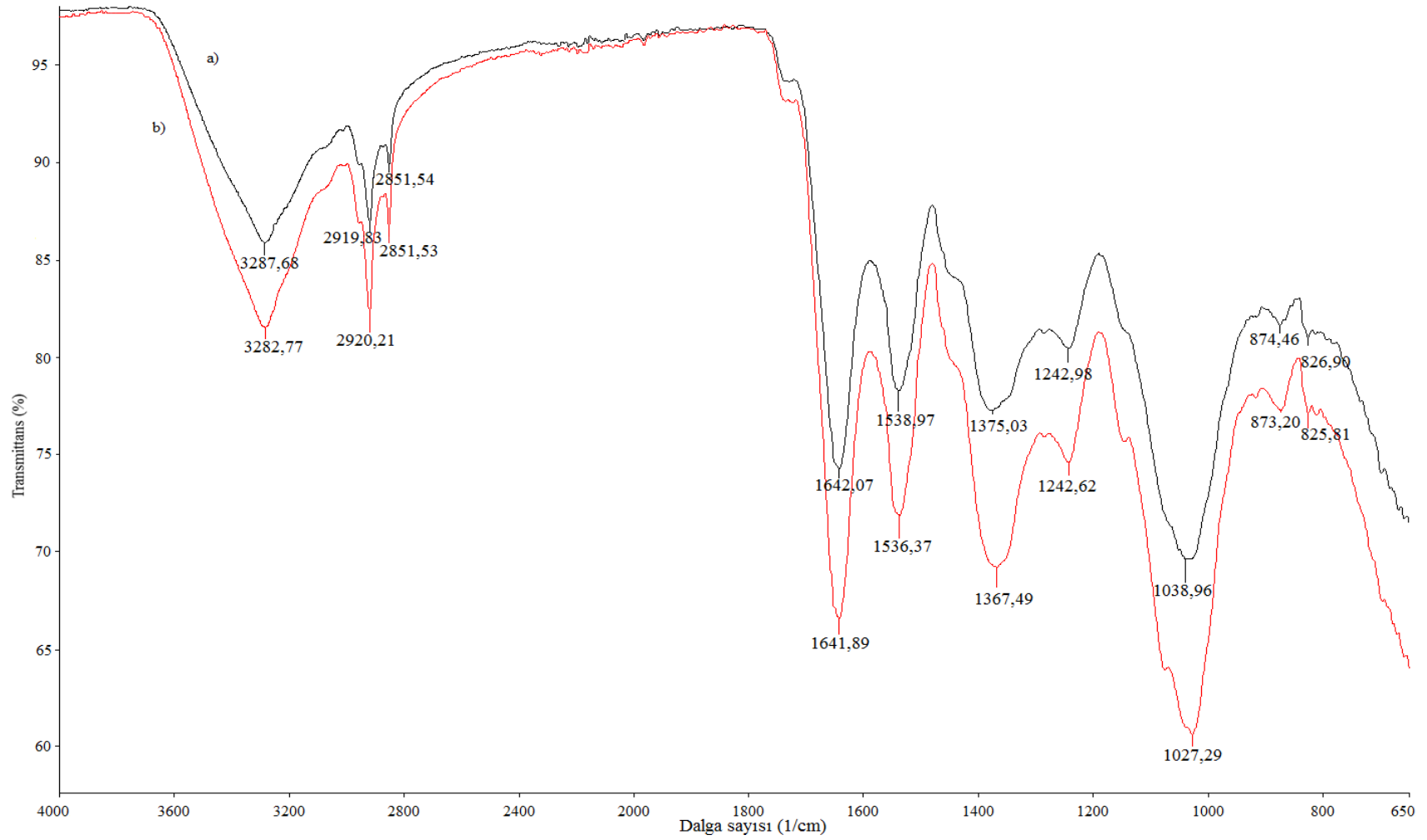
oluşturduğu biyokimyasal cevabın farklı olduğunu göstermektedir. *Phaeodactylum tricornutum* üzerine etil 2-metil asetoasetat (EMA) konsantrasyonlarının etkileri çalışılmıştır (Yun vd., 2011). EMA 3, 5, 7 ve 10,5 mmol/l derişimlerinde maruz bırakılan *P. triornutum* 'da MDA miktarlarında neredeyse hiç değişiklik olmamıştır. Ancak 14 mmol/l EMA konsantrasyonunda çalışılan türde MDA miktarında önemli artış gözlenmiştir. *Sedum alfredii* bitkisi üzerine (200, 400, 600, 800 µmol/l) CdCl<sub>2</sub> etkileri araştırılmıştır (Zhang ve Qui, 2007). Uygulama sonunda Cd<sup>+2</sup> derişimi arttıkça MDA miktarının da artma eğiliminde olduğunu belirlemişlerdir.

#### 4.5. Reactive Red 120 FTIR-ATR Analizi

Doğal ve RR 120 uygulamasına maruz bırakılan *S. quadricauda* var. *longispina* 'nın yüzey yapılarının FTIR-ATR spektrumu Şekil 4.13a, b.'de gösterilmiştir. *Scenedesmus* türünün doğal yapısında 3288, 2920, 2852, 1642, 1539, 1375, 1243 ve 1039 1/cm gibi önemli pikler bulunmuştur (Şekil 4.13a). Mikroalg yüzeyinde RR 120 uygulaması sonrasında 3283, 2920, 2852, 1642, 1536, 1367, 1243 ve 1027 1/cm pikleri görölmüştür (Şekil 4.13b).

FTIR-ATR spektrumları incelendiği zaman RR 120 boyar maddesinin *S. quadricauda* var. *longispina* 'nın yüzey yapısında bazı piklerin aynı kaldığı ve bazı piklerin değiştii görölmüştür. Uygulama sonrasında 3288, 1539, 1375, 1039 1/cm pikleri 3283, 1536, 1367, 1027 1/cm piklerine dönüşmüştür. Mikroalg üzerindeki bu değişimler RR 120 derişimlerinin etkilerini göstermektedir.

FTIR-ATR analizleri sonucunda RR 120 biyosorpsiyonunda *S. quadricauda* var. *longispina* 'nın amino ve amid grupları rol oynamıştır. (Onyanha vd., 2008; Vijayaraghavan ve Yun, 2008; Çelekli vd., 2009b; Çelekli vd., 2010; Çelekli vd., 2012).



Şekil 4.13. *S. quadricauda* var. *longispina*' nın (a) doğal ve (b) RR 120 uygulamasından sonraki FTIR–ATR analizi

## BÖLÜM 5

### SONUÇLAR

Çalışmada belirlenen önemli sonuçlar;

Sanayi devriminden günümüze kadar artan endüstriyel faaliyetler sonucunda bırakılan atık sular ağır metaller, boyalar, pestisitler ve tuzlar içermektedir. Bu durum besin ağının ilk halkası olan algler başta olmak üzere bütün canlıları tehdit etmektedir. Ksenobiyotiklerin algler üzerine olan toksik etkileri son yıllarda daha fazla araştırılmıştır.

$Cd^{+2}$  derişimleri *S. quadricauda* var. *longispina* 'nın biyokütle, klorofil *a*, *b* ve karoten, MDA ve prolin miktarlarını etkilemiştir.

- Biyokütlenin azalmasına en fazla neden olan kadmiyum derişimi 30 mg/l olarak belirlenmiştir. Ancak bu düşüş istatistiksel olarak önemli değildir ( $p>0,05$ ).
- Yüksek kadmiyum derişimleri mikroalgde pigmentasyon miktarlarını azaltmıştır.
- En düşük klorofil *b* miktarı 30 mg/l  $Cd^{+2}$  derişiminde bulunmuştur.
- Karoten miktarı kültür ortamında  $Cd^{+2}$  konsantrasyonlarının artmasına paralel olarak azalmıştır. En düşük karoten miktarı 30 mg/l  $Cd^{+2}$  derişime sahip grupta bulunmuştur.
- $Cd^{+2}$  derişimi arttıkça *Scenedesmus* türünde MDA içeriği istatistiksel olarak önemli miktarda artmıştır. En fazla MDA miktarı 30 mg/l  $Cd^{+2}$  derişiminde bulunmuştur.

- $\text{Cd}^{+2}$  derişimi arttıkça *Scenedesmus* türünde istatistiksel olarak önemli miktarda prolin içeriği artmıştır. En yüksek prolin miktarı 30 mg/l  $\text{Cd}^{+2}$  derişiminde bulunmuştur.
- $\text{Cd}^{+2}$  uygulaması sonucunda mikroalgin yüzey yapısında amino ve amid gruplarını gösteren bantlar değişmiştir.
- Reactive Red 120'den *S. quadricauda* var. *longispina*'nın biyokütle, klorofil *a*, *b*, karoten, MDA ve prolin miktarı etkilenmiştir.
- RR 120 derişimlerinin mikroalg biyokütlesi üzerine önemli bir etkisi olmamıştır ( $p>0,05$ ). En yüksek biyokütle miktarı kontrol grubunda bulunmuştur.
- RR 120 derişimleri klorofil *a*, *b* ve karoten miktarlarının artmasına neden olmuştur.
- En yüksek klorofil *a*, *b* ve karoten miktarları 40 mg/l RR 120 derişiminde ölçölmüştür.
- RR 120 derişimleri *S. quadricauda* var. *longispina*'da MDA ve prolin miktarlarında önemli artışlara neden olmuştur ( $p<0.05$ ). RR 120 derişimi arttıkça MDA ve prolin miktarlarındaki artış devam etmiştir.
- RR 120 uygulaması neticesinde *Scenedesmus*'un yüzey yapısında amino ve amid gruplarını gösteren pikler etkilenmiştir.

Çalışmada, *S. quadricauda* var. *longispina*'nın  $\text{Cd}^{+2}$  ve RR 120 toksisitesine oldukça duyarlı olduğu görölmüştür. Bu nedenle *S. quadricauda* var. *longispina*'nın ortamdaki kadmiyum toksisitesinin ve RR 120 azo boyar maddesinin etkisinin değerlendirilmesinde biyoindikatör bir tür olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

*Scenedesmus* ksenobiyotiklere karşı toleransı geniş olan bir mikroalgdir. Çalışmada, *S. quadricauda* var. *longispina*'nın kadmiyum ve RR 120 toksisitesine karşı toleransı bulunmuştur. Bu nedenle ortamdaki kadmiyum ve RR 120 toksisitesinin değerlendirilmesinde biyoindikatör bir tür olarak kullanılabilir. Çalışılan mikroalgin  $\text{Cd}^{+2}$  ve RR 120 derişimlerine karşı enzimatik savunmasının belirlenmesi önem

taşımaktadır. Böylece *S. quadricauda* var. *longispina*'nın ksenobiyotiklere karşı biyokimyasal cevabı daha iyi anlaşılmış olacaktır. Çalışılan türün sucul ortamlardaki ağır metaller ve boyar maddeler ile etkileşimi arasındaki bağlantıdan faydalanarak diğer sucul canlılarda ya da besin zincirinin daha üst basamaklarında ortaya çıkabilecek zararlı etkiler önlenabilir. Reaktif boyar maddelerin *S. quadricauda* var. *longispina* üzerine etkileri ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma olmadığından yaptığımız çalışma, bundan sonraki çalışmalara ışık tutacaktır.

## KAYNAKLAR

- Abd-El-Monem, M.H., Corradi, M.G., Gorbi, G. (1998). Toxicity of copper and zinc to two strains of *Scenedesmus acutus* having different sensitivity to chromium. *Environmental and Experimental Botany*. **40**, 59–66
- Aksu, Z. (2005). Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. *Process Biochemistry*. **40**, 997–1026.
- Aksu, Z., Çağatay, Ş. Ş. (2006). Investigation of biosorption of Gemazol Turquoise Blue-G reactive dye by dried *Rhizopus arrhizus* in batch and continuous systems. *Separation and Purification Technology*. **48**, 24–35.
- Algaebase, (2013). <http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species>.
- Andosch, A., Affenzeller, M. J., Lütz, C., Lütz-Meindl, U. (2012). A freshwater green alga under cadmium stress: Ameliorating calcium effects on ultrastructure and photosynthesis in the unicellular model *Micrasterias*. *Journal of Plant Physiology*. **12**.
- Arief, V. O., Trilestari, K., Sunarso, J., Indraswati, N., Ismadji, S. (2008). Recent progress on biosorption of heavy metals from liquids using low cost biosorbents: characterization, Biosorption Parameters and Mechanism Studies. *Clean*. **36 (12)**, 937–962.
- Arunakumara, K. K. I. U., Xuecheng, Z. (2008). Heavy metal bioaccumulation and toxicity with special reference to microalgae. *Journal of Ocean University China (Oceanic and Coastal Sea Research)*. **7 (1)**, 60–64.
- Bates, L. S., Waldren, R. P., Teare, D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*. **9**, 205–297.

- Bellinger, E. G., Sigee, D. C. (2010). Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators. *Journal of Applied Phycology*. 284.
- Borowitzka M. A. (1992). Algal biotechnology products and processes. Matching science and economics. *Journal of Applied Phycology*. **4**, 267–279.
- Chen, H., Chen, J., Guo, Y., Wen, Y., Liu, J., Liu, W. (2012). Evaluation of the role of the glutathione redox cycle in Cu(II) toxicity to green algae by a chiral perturbation approach. *Aquatic Toxicology*. **120 (121)**, 19–26.
- Chris, A., Zeeshan, M., Abraham, G., Prasad, S. M. (2006). Proline accumulation in *Cylindrospermum* sp.. *Environmental and Experimental Botany*. **57**, 154–159.
- Chojnacka, K., Chojnacki, A., Gorecka, H. (2004). Trace element removal by *Spirulina* sp. from copper smelter and refinery effluents. *Hydrometallurgy*. **73**, 147–153.
- Choo, K. S., Snoeijs, P., Pedersen, M. (2004). Oxidative stress tolerance in the filamentous green algae *Cladophora glomerata* and *Enteromorpha ahlneriana*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. **298**, 111–123.
- Cobbet, C. S. (2001). Heavy metal detoxification in plants: Phytochelatin biosynthesis and function. *IUBMB Life*. **51**, 183–188.
- Conti, E. M., Cecchetti, G. (2003). A biomonitoring study: Trace metals in algae and mollusks from tyrrhenian coastal areas. *Environmental Research*. **93**, 99–112.
- Çelekli, A. (2006). Comparative analysis of seasonal water quality changes and algae potential between lake Abant and lake Gököy. Abant İzzet Baysal Üniversitesi Doktora tezi. 418s.
- Çelekli, A., Balcı, M., Bozkurt, H. (2008). Modelling of *Scenedesmus obliquus*; function of nutrients with modified Gompertz Model. *Bioresource Technology*. **99**, 8742–8747.
- Çelekli, A., Yavuzatmaca, M., Beyazçiçek, E., Bozkurt, H. (2009a). Effect of Initial Reactive Red 120 concentrations on the biomass production and dye uptake by *Spirulina platensis*. *Fresenius Environmental Bulletin*. **6**, 18.

- Çelekli, A., Yavuzatmaca, M., Bozkurt, H. (2009b). Kinetic and equilibrium studies on biosorption of reactive red 120 from aqueous solution on *Spirogyra majuscula*. *Chemical Engineering Journal*. **152**, 139–145.
- Çelekli, A., Yavuzatmaca, M. (2009c). Predictive modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of nitrate and NaCl concentrations. *Bioresource Technology*. **100**, 1847–1851.
- Çelekli, A., Yavuzatmaca, M., Bozkurt, H. (2010). Removal of lanaset red G from aqueous solution on *Chara contraria*: Application of isotherm and kinetic models. *Journal of Biotechnology*. **150S**. S1–S576.
- Çelekli, A., Bozkurt, H. (2011). Bio-sorption of cadmium and nickel ions using *Spirulina platensis*: Kinetic and equilibrium studies. *Desalination*. **275**, 141–147.
- Çelekli, A., İlğün, G., Bozkurt, H. (2012). Sorption equilibrium, kinetic, thermodynamic, and desorption studies of Reactive Red 120 on *Chara contraria*. *Chemical Engineering Journal*. **191**, 228–235.
- Daud M. K., Sun Y., Dawood M., Hayat Y., Variath M. T, Wu Y. X. (2009). Cadmium-induced functional and ultrastructural alterations in roots of two transgenic cotton cul-tivars. *Journal Hazard Mater*. **161**, 463–73.
- Egan, P. F., Trainor, F. R. (1991). Phenotypic plasticity in *Scenedesmus communis* Hegew (Chlorophyceae). II. examples of algal cyclo- and noncyclomorphosis. *American Journal of Botany*. **78 (1)**, 37–52.
- El-Enany, A. E., Issa, A. A (2001). Proline alleviates heavy metal stress in *Scenedesmus armatus*. *Folia Microbiol*. **46 (3)**, 227–230.
- Elmacı, A., Yonar, T., Özengin, N., Türkoğlu, H. (2005).  $Zn^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Co^{+2}$  ve Remazol Turkish Blue-G boyar maddesinin sulu çözeltilerinde kurutulmuş *Chara* sp., *Cladophora* sp. ve *Chlorella* sp. türleri ile biyosorpsiyonun araştırılması. *Uludağ Üniversitesi, Mühendislik- Mimarlık Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü*. 16059 Görükle-Bursa.

- Farago, M. E., Mullen, W. A. (1979). Plants which accumulate metals. Part IV. A possible copper-proline complex from the roots of *Armeria maritima*. *Inorganica Chimica Acta*. **32**, 93–94.
- Fargasova, A., Bumalova, A., Havranek, E. (1999). Ecotoxicological effects and uptake of metals in freshwater alga *Scenedesmus quadricauda*. *Chemosphere*. **38**, 1165–1173.
- Fayed, S. E., Abdel, S. H. I., Khalifa, N. M. (1983). Accumulation of  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$  and Pb by *Scenedesmus obliquus* under nongrowth conditions. *Environment International*. **9**, 409–413.
- Foy, C. D., Chaney, R. L., White, M. C. (1978). The physiology of metal toxicity in plants. *Annual Review Plant Physiology*. **29**, 511–566.
- Güner, H., Aysel, V. (1996). Tohumusuz bitkiler sistematigi. *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi*. **108**, 251 İzmir.
- Hart, B. A., Scaife, B. D. (1977). Toxicity and bioaccumulation of cadmium in *Chlorella pyrenoidosa*. *Environment. Research*. **14**, 401–413.
- İlgün, G. (2012). Reactive Red 120'nin *Chara contraria* İle Giderimi. Gaziantep Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi. 69s.
- John, D. M., Whitton, B. A., Brook, J. A. (2002). The freshwater algal flora of the British Isles. 1<sup>st</sup> edn. Cambridge University Press, Cambridge, 392.
- Komarek, J., Fott, B. (1983). Das phytoplankton des süBwassers, *Systematik und Biologie*. 1043, Stuttgart.
- Kumar, K. V., Ramamurthi, V., Sivanesan, S. (2006). Biosorption of malachite green, a cationic dye onto *Pithophora* sp., a freshwater alga. *Dyes and Pigment*. **69**, 102–107.
- Küpper, H., Küpper, F., Spiller, M. (1996). Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the exaple of water plants. *Journal of Environmental Botany*. **295**, 259–266.

- Lane, T. W, Saito, M. A., George, G. N., Pickering, I. J, Prince, R. C., Morel, F. M. M (2005). Biochemistry: a cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature*. 435,4–42.
- Li, X., Ping, X., Xiumei, S., Zhenbin, W., Liqiang, X. (2005). Toxicity of cypermethrin on growth, pigments, and superoxide dismutase of *Scenedesmus obliquus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **60** 188–192.
- Lockwood, M. P. (1976). Effects of pollutants on aquatic organisms. *Cambridge University Press*. NewYork.
- Lopez-Suarez, C. E., Castro-Romero, J. M., Gonzalezrodriguez, M. V., Gonzalez-Soto, E., Perez- Iglesias, J., Seco- Lago, H. M., Fernandez- Solis, J. M. (2000). Study of the parameters affecting the binding of metals in solution by *Chlorella vulgaris*. *Talanta*. **50**, 1313–1318.
- Lürling, M. (2006). Effects of surfactant (FFD-6) on *Scenedesmus* Morphology and growth under different nutrient conditions. *Chemosphere*. **62**, 1351–1358.
- Mehta, S. K., Gaur, J. P. (2005). Use of Algae for Removing Heavy Metal Ions from Wastewater: Progress and Prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*, **25**, 113-152.
- Mhatre, G. N., Pankhurst, C. E. (1997). Bioindicators to detect contamination of soils with special reference to heavy metals. In: Pankhurst, C. E., Doube, B. M.,-Gupta, V. V. S. R. (Eds.), *Biological Indicators of Soil Health and Sustainable Productivity*. CAB International, 349–369 New York.
- Mohammed, M. H., Markert, B. (2006). Toxicity of heavy metals on *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) de Brebisson in batch cultures. *Environmental Science and Pollution Research*. **13**, 98–104.
- Moradshahi, A., Zamani, N., Ghahremanpour, M. M., Kholdebarin, B., Rasekh, F. (2009). Physiological responses of *Dunaliella Tertiolecta* to Hg<sup>2+</sup>-induced oxidative stress. *Iranian Journal of Science & Technology, Transaction A*, 33, No. A1.
- Nakiboğlu, N., Sevindir H. C. (2006). Deri endüstrisi atıksularından kromun çeşitli alglerle biyosorpsiyonu. *Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. **10 (2)**, 284–291.

Nriagu, J. O. (1988). Production and uses of chromium. In *Natural and Human Environment*. New York, USA: John Wiley and Sons. 81–105.

Omar, H. H. (2002). Bioremoval of zinc ions by *Scenedesmus obliquus* and *Scenedesmus quadricauda* and its effect on growth and metabolism. *International Biodeterioration and Biodegradation*. **50**, 95–100.

Onyancha, D., Mavura, W., Ngila, J. C., Ongoma, P., Chacha, J. (2008). Studies of chromium removal from tannery wastewaters by algae biosorbents, *Spirogyra condensata* and *Rhizoclonium hieroglyphicum*. *Journal of Hazardous Materials*. **158**, 605–614.

Oturkar, C. C., Nemade, H. N., Mulik, P. M., Patole, M. S., Hawaldar, R. R., Gawai, K. R. (2011). Mechanistic investigation of decolorization and degradation of Reactive Red 120 by *Bacillus lentus* BI377. *Bioresource Technology*. **102**, 758–764.

Özer, A., Akaya, G., Turabik, M. (2005). Biosorption of Acid Red 274 (AR 274) on *Enteromorpha prolifera* in a batch system. *Journal Hazardous Materials*. **126**, 119–127.

Padmaja, K., Parsad, D. D. K., Parsad, A. R. K. (1990). Inhibition of chlorophyll synthesis in phaseolus vulgaris l. seedlings by cadmium acetate. *Photosynthetica*. **24**, 399–404.

Peña-Castro, J. M., Martínez-Jerónimo, F., Esparza-García, F. ve Cañizares-Villanueva, R. O. (2004a). Phenotypic plasticity in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae) in response to heavy metals stress. *Chemosphere*. **57**, 1629–1636.

Peña-Castro, J. M., Martínez-Jerónimo, F., Esparza-García, F., Cañizares-Villanueva, R. O. (2004b). Heavy metals removal by the microalga *Scenedesmus incrassatulus* in continuous cultures. *Bioresource Technology*. **94**, 219–222.

Pinto, E., Sigaud-Kutner, T. C. S., Leitão, M. A. S., Okamoto, O. K., Morse, D., Colepicolo, P. (2003). Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology*. **39**, 1008–1018.

Popovic, R., Qukaroum, A., Perreault, F., Bras, S. (2012). Inhibitory effect of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **78**, 80–85.

Prescott, G. W. (1973). *Algae of the western great lakes area*. Wm. C. Brown Company Publishers. USA, 977.

Rangsayatorn, N., Upathame, S., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., Lanza, G. R. (2002). Phytoremediation potential of *Spirulina (Arthrospira) platensis*: biosorption and toxicity studies of cadmium. *Environmental Pollution*. **119**, 45–53.

Sabatini, S. E., Juárez, A. B., Eppis, M. R., Bianchi, L., Luquet, M. C., Molina, M. C. R. (2009). Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **72**, 1200–1206.

Scandalios, J. G. (2002). The rise of ROS. *Trends in Biochemical Sciences*. **27**, 483–486.

Sharmila, P., Saradhi, P. P (2002). Proline accumulation in heavy metal stressed plants: an adaptive strategy. In: Prasad MNV, Strazlka K (eds) *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*. 179–199. Kluwer, Dordrecht.

Silva, A. M. M., Novelli, E. L. B., Fascinelli, M. L., Almeida, J. A. (1999). Impact of an environmentally realistic intake of water contaminants and superoxide formation on tissues of rats. *Environmental Pollution*. **105**, 243–249.

Smeets, K., Cuypers, A., Lambrechts, A., Semane, B., Hoet, P., Laere, A. V., Vangronsveld, J. (2005). Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after  $\text{Cd}^{+2}$  application. *Plant Physiology and Biochemistry*. **43**, 437–444.

Srinivasan, T.N. (2010). Chapter 32—economic growth as a path toward poverty reduction, better nutrition and sustainable population growth. *Obesity Prevention*. 407–416.

- Srivastava, V. C., Mall, I. D., Mishra, I. M. (2009). Competitive adsorption of cadmium(II) and nickel(II) metal ions from aqueous solution onto rice husk ash, *Chemical Engineering Processing*. **48**, 370–379.
- Şeker, A., Shahwan, T., Eroğlu A. E., Yılmaz, S., Demirel, Z., Dalay, C. M. (2008). Equilibrium, thermodynamic and kinetic studies for the biosorption of aqueous lead(II), cadmium(II) and nickel(II) ions on *Spirulina platensis*, Department of Chemistry, İzmir Institute of Technology. Urla 35430, İzmir, Turkey.
- Şener, S., Yıldırım, M. (2000). Veteriner toksikoloji. *Teknik Yayıncılık*. 343. İstanbul.
- Tanrıverdi, B. (2010). *Chara contraria* İle Lanaset Red G ‘nin Artımı. Gaziantep Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi. 80s.
- Tasneem, F., Zutshi, S., Khan, M. A., Jetley, U. K., Choudhary, M. (2007). Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis*-S5. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **(66)**, 204–209.
- Torres, E., Cid, A., Fidalgo, P., Herrero, C., Abalde, J. (1997). Long-chain class III metallothioneins as a mechanism of cadmium tolerance in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *Aquatic Toxicology*. **39**, 231–246.
- Tripathi, B. N., Gaur, J. P. (2004). Relationship between copper and zinc induced oxidative stress and proline accumulation in *Scenedesmus* sp. *Planta*. **219**, 397–404.
- Tripathi, B. N., Gaur, J. P., Mehta, S. K., Amar, A. (2006). Oxidative stress in *Scenedesmus* sp. during short- and long-term exposure to  $\text{Cu}^{+2}$  and  $\text{Zn}^{+2}$ . *Chemosphere*. **62**, 538–544.
- Van-Assche, F., Clijsters, H. (1990). Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell and Environment*. **13**, 195–206.
- Vela, H. V. P., Moreno, S. G., Horcasitas, C. M., Villanueva, R. O. V. (2007). Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae). *Chemosphere*. **67**, 2274–2281.

- Verschoor, A. M., Stap, I., Helmsing, N. R., Lüring, M., Vandonk, E. (2004). Inducible colony formation within the scenedesmaceae: adaptive responses to infochemicals from two different herbivore taxa. *Journal of Phycology*. **40**, 808–814.
- Vijayaraghavan, K., Yun, Y. S. (2008). Biosorption of C.I. Reactive Black 5 from aqueous solution using acid-treated biomass of brown seaweed *Laminaria* sp. *Dyes and Pigments*. **76**, 726–732.
- Wehr, J. D., Sheath, R. G. (2003). *Freshwater Algae of North America Ecology and Classification*.
- Wellburn, R. A. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal Plant. Physiology*. **144**, 307–313.
- Wu, J. T., Chang, S. C., Chen, K. S. (1995). Enhancement of intracellular proline levels in cells of *Anacystis nidulans* (cyanobacteria) exposed to deleterious concentrations of copper. *Journal Phychology*. **31**, 376–379.
- Yan, H., Pan, G. (2002). Toxicity and bioaccumulation of copper in three green microalgal species. *Chemosphere*. **49**, 471–476.
- Yap, C. K., Ismail, A., Omar, H., Tan, S. G. (2004). Toxicities and tolerances of  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Pb}^{+2}$  and  $\text{Zn}^{+2}$  in a primary producer (*Isochrysis galbana*) and in a primary consumer (*Perna viridis*). *Environment International*. **(29)**, 1097–1104.
- Yarsan, E., Bilgili, A., Türel, İ. (2000). Van gölü'nden toplanan midye (*unio stevenianus krynicki*) örneklerindeki ağır metal düzeyleri. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*. **24**, 93–96.
- Yuan, X., Qin, H., Chen, L., Lu, N., Zhao, Y. (2012). Toxic effects of enrofloxacin on *Scenedesmus obliquus*. *Frontiers Environmen. Science Engineering*. **6(1)**, 107–116.
- Yun, C. Y., Liu, S. J., Zhou, S. W., Wu, H. F., Yu, J. B., Xia, C. H. (2011). Allelochemical ethyl 2-methyl acetoacetate (EMA) induces oxidative damage and antioxidant responses in *Phaeodactylum tricornutum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. **100**, 93–103.

Zar, J. H. (1999). Biostatistical analysis 4<sup>th</sup> edn., London: Prentice-Hall International Limited. 929 pp.

Zengin, K. F., Munzuroğlu, Ö. (2005). Fasulye fidelerinin (*Phaseolus vulgaris* L.strike) klorofil ve karotenoid miktarı üzerine bazı ağır metallerin ( $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Cr}^{+3}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ) etkileri. *F.Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*. **17(1)**, 164–172.

Zhang, Z.C., Qiu B.S. (2007). Reactive oxygen species metabolism during the cadmium hyperaccumulation of a new hyperaccumulator *Sedum alfredii* (Crassulaceae). *Journal of Environmental Sciences*, **19**, 1311–1317.

Zhou, Q. (2001). The measurement of malondialdehyde in plants. In: Zhou Q. (Ed.): Methods in Plant Physiology. *China Agricultural Press*, Beijing. 173–174.