



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



NANOPARTİKÜLLERİN *Ceratophyllum demersum* L.' NİN FİTOREMEDİASYON POTANSİYELİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Serpil BAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Temmuz-2022
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NANOPARTİKÜLLERİN *Ceratophyllum demersum* L.' NİN FİTOREMEDİASYON POTANSİYELİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Serpil BAŞ

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ

2022, 48 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ

Prof. Dr. Esra MARTİN

Prof. Dr. Muhammad ASİM

Hiperakümülatör bitkiler kullanılarak kirli bölgelerin rehabilitasyonu, günümüzde çevre dostu ve uygun maliyetli bir uygulama olarak ele alınmaktadır. Bazı bitkiler ağır metalleri toplama ve biriktirme yeteneğine sahip olduğundan, bizlere kontamine olmuş su ve tortuları iyileştirme potansiyeli sunuyor. *Ceratophyllum demersum* L. (*C. demersum*) gibi su bitkileri bir fitoremediasyon bitkisi olarak tanınır ve metal stresli ortamlarda hayatta kalıp, ağır metallerle kirlenmiş olan akuatik ortamın iyileştirilmesi için kullanılır. Bu çalışmada *C. demersum* bitkisinin Kadmiyum (Cd) ağır metaline farklı konsanstrasyonlarda maruz bırakılması kapsamında bitki iyileştirme potansiyeli incelenecektir. Ayrıca, Metalik Nanopartiküller (NPLer) artan kullanımı, çevrede NP bulma olasılığını artırıyor ve çok sayıda üründen salınmaları nedeniyle ekosistem ve insan sağlığı üzerine endişe etkisi yaratmaktadır. Fakat ne yazıkki güncel çalışmalarda çevreye salınan NPLer hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Tez kapsamında *C. demersum* in vitro doku kültürü yöntemi ile çoğaltılmıştır. Yanıt yüzey yöntemi (RSM) kullanılarak belirlenen girdi değişkenleri (NP, Cd ve maruz kalma süresi) ile çıktı değişkenleri (Cd alımı, ortamda kalan Cd ve % absorpsiyon) arasında ki ilişki tespit edilip, bitkinin fitoremediasyon potansiyeli incelenmiştir. Sonuçlar, girdi ve çıktı değişkenlerinin birbiri ile uyumlu olduğunu göstermiştir. 20 mg/lit ve daha az TiO₂ NP ile 1.8 mg/lit Cd kullanıldığında maksimum Cd alımı gerçekleşmiştir.

Anahtar Kelimeler: Akümülasyon, Fitoremediasyon, *Ceratophyllum demersum* L., Nanopartiküller

ABSTRACT

MSc. THESIS

DETERMINATION OF IMPACT OF NANOPARTICLES ON PHYTOREMEDIATION POTENTIAL OF *Ceratophyllum demersum* L.

Serpil BAŞ

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN BIOTECHNOLOGY

Advisor: Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ

2022, 48 Pages

Jury

Advisor Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ

Prof. Dr. Esra MARTİN

Prof. Dr. Muhammad ASİM

Rehabilitation of contaminated areas using hyperaccumulative plants is currently considered as an environmentally friendly and cost-effective practice. Since some plants have the ability to collect and accumulate heavy metals, they offer us the potential to improve contaminated water and sediment. Aquatic plants such as *Ceratophyllum demersum* L. (*C. demersum*) are recognized as a phytoremediation plant and are used to survive metal stressful environments, improving the aquatic environment contaminated with heavy metals. In this study, the potential of *C. demersum* plants to improve contaminated plants will be examined with the Intention of exposure to Cadmium (Cd) heavy metal in different concentrations. In addition, the increasing use of metallic nanoparticles (NPs) increases the likelihood of finding NPs in the environment and creates concerns on the ecosystem and human health due to their release from a large number of products. However, unfortunately, there is very little information about NPs released into the environment in current studies. Within the scope of the thesis, *C. demersum* was reproduced by in vitro tissue culture method. By using the response surface method (RSM), the relationship between input variables (NP, Cd and exposure time) and output variables (Cd uptake, remaining Cd in the medium and absorption %) was determined and the phytoremediation potential of the plant was investigated. The results showed that the input and output variables are compatible with each other. Maximum Cd uptake was achieved when 1.8 mg/L Cd was combined with 20 mg/L or less TiO₂ NP.

Keywords: Accumulation, *Ceratophyllum demersum* L., Nanoparticles, Phytoremediation

ÖNSÖZ

Yüksek lisans sürecinde desteklerinden dolayı Necmettin Erbakan Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ, Sivas Bilim Ve Teknoloji Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Muhammad ASIM ve Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi Öğr. Gör. Dr. Numan Emre GÜMÜŞ'e teşekkür ediyorum.

Tezimi yazarken daha sessiz bir çalışma ortamı sağlayarak, hassasiyet gösterdikleri için değerli aileme teşekkür ediyorum.

Serpil BAŞ
KONYA-2022



İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Ceratophyllum demersum</i> L. bitkisinin Genel Özellikleri.....	1
1.2. Nanopartiküller	2
1.2.1. Nanopartiküllerin Su Bitkileri üzerine Etkisi	4
1.3. Fitoremediasyon ve Uygulamaları.....	5
1.3.1. Fitoekstraksiyon.....	7
1.3.2. Fitofiltrasyon.....	8
1.3.3. Fitostabilizasyon	8
1.3.4. Fitovolatilizasyon.....	9
1.3.5. Fitodegradasyon.....	9
1.3.5.1. Rizodegradasyon.....	9
1.4. Su bitkilerinde Ağır Metal Kirliliği.....	10
1.5. Kadmiyum	11
1.5.1. Su Bitkilerinde Kadmiyum Toksisitesi.....	12
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	13
2.1. Akuatik Bitkilerde Ağır Metal Etkisi ile İlgili Çalışmalar	13
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	19
3.1. Materyal	19
3.1.1. Deneme yeri.....	19
3.1.2. Bitki materyali	19
3.1.3. Bitki besi ortamı ve kültür koşulları.....	20
3.2. Yöntem.....	21
3.2.1. Bitki eksplant yüzey sterilizasyonu	21
3.2.2. In vitro koşullarda <i>C. demersum</i> ' un çoğaltımı ve deneye hazırlanışı	22
3.3. Fitoremediasyon Çalışmaları	22
3.3.1. RSM deneme tasarlama	22

3.3.2. Stok Çözeltilerin Hazırlanması	23
3.3.3. Invitro Çoğaltılmış bitkinin ağır metallere maruziyeti	23
3.3.4. Doku örneklerinin alımı ve analizi	24
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	26
4.1. <i>C. demersum</i> bitkisinin in vitro çoğaltımı	26
4.2. <i>C. demersum</i> ile fitoremediasyon çalışmaları.....	26
4.2.1. Bitkideki Cd miktarı	27
4.2.2. Ortamda Cd Konsantrasyonu.....	31
4.2.3. <i>C. demersum</i> bitkisinin absorpsiyon kapasitesi	34
4.3. Çoklu Yanıt tahmini.....	37
5. TARTIŞMALAR, SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	39
5.1 Tartışma ve sonuçlar	39
5.2 Öneriler	41
KAYNAKLAR	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1. MS ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları.....	20
Çizelge 3.2. RSM ile tasaralanan deneme planlaması.....	23
Çizelge 4.1. <i>C. demersum</i> tarafından Cd alımının ANOVA analizi.....	27
Çizelge 4.2. Fitoremediasyon ortamında kalan Cd' un ANOVA analizi.....	31
Çizelge 4.3. İn vitro rejenere <i>C. demersum</i> ' un absorpsiyon kapasitesi ANOVA	34
Çizelge 4.4. Yanıt optimizasyonu için hedef çıktı değişkenleri seti	37
Çizelge 4.5. Modelin çoklu yanıt tahmini	37

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.3. Bitki fitoremediasyon stratejileri.....	7
Şekil 3.1.2. <i>C. demersum</i> bitkisinin genel görünümü.....	19
Şekil 3.2.1. <i>C. demersum</i> laminar flow kabin içerisinde otoklavlanmış saf su ile muamele edilmesi.....	21
Şekil 3.2.2. <i>C. demersum</i> bitkisi eksplant sürgün rejenerasyonu bitkinin durumu 20.10.21 (A); bitkinin durumu 11.01.22 (B).....	22
Şekil 3.3. Cd içeren solüsyona konulmuş <i>C. demersum</i> (A)	23
Şekil 3.3.1. Filtre kağıdıyla suyun süzülmesi.....	23
Şekil 3.4.1. Etüvde kurutulmuş <i>C. demersum</i>	24
Şekil 3.4.2. MARS Xpress mikrodalga örnek çözünmesi	25
Şekil 4.1. RSM ile elde edilen fitoremediasyon çalışma sonuçları	27
Şekil 4.2. NP konsantrasyonu, Cd konsantrasyonu ve maruz kalma süresinin <i>C. demersum</i> ' un Cd alımı üzerindeki standartlaştırılmış etkisi	29
Şekil 4.3. NP konsantrasyonu, Cd konsantrasyonu ve <i>C. demersum</i> ' un Cd alımında geriye kalan Cd konsantrasyonuna maruz kalma süresinin eşyükselti grafikleri	30
Şekil 4.4. NP konsantrasyonu, Cd konsantrasyonu ve maruz kalma süresinin ortamda kalan Cd konsantrasyonu üzerindeki standartlaştırılmış etkisi.....	32
Şekil 4.5. NP konsantrasyonu, Cd konsantrasyonu ve fitoremediasyon ortamında kalan Cd konsantrasyonuna maruz kalma süresinin eşyükselti grafikleri.....	33
Şekil 4.6. NP konsantrasyonu, Cd konsantrasyonu ve maruz kalma süresinin <i>C. demersum</i> tarafından kalan Cd absorpsiyonu (%) üzerindeki standartlaştırılmış etkisi. 35	
Şekil 4.7. <i>C. demersum</i> tarafından Cd absorpsiyonunda NP konsantrasyonu, Cd konsantrasyonu ve maruz kalma süresinin eşyükselti grafikleri	36
Şekil 4.8. Girdi değişkenlerinin çıktı değişkenleri ile ilişkisi.....	38

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
Al	Alüminyum
As	Arsenik
Au	Altın
C	<i>Cerataphlyum</i>
C°	Santigrat Derece
Cd	Kadmiyum
cm	Santimetre
Cu	Bakır
CuO	Bakır(II)oksit
g	gram
H ₃ PO ₄	Fosforik asit
HCl	Hidroklorik Asit
HgCl ₂	Civa Klorür
HNO ₃	Nitrik asit
kg	Kilogram
L	Litre
m	metre
Mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
Mn	Mangan
NaOCl	Çamaşır suyu
NaOH	Sodyum Hidroksit
Ni	Nikel
Nm	Nanometre
Pb	Kurşun
pH	Asit-baz belirleme faktörü
TF	Translokasyon faktörü
TiO ₂	Titanyum dioksit

Kısaltmalar

BAP	6-Benzylaminopurine
BCF	Biyokonsantrasyon faktör
MC-LR	Mikrosistin-LR
MS	Murashige and Skoog
NPler	Nanopartiküller

nZVI
ROS
TF

sıfır değerkli demir
Reaktif oksijen türleri
Translokasyon faktörü



1. GİRİŞ

1.1. *Ceratophyllum demersum* L. Bitkisinin Genel Özellikleri

Akuatik bitkiler, suda yaşayan organizmalar için gerekli olan organik madde ve oksijeni sağlayıp, suyun akış hızının düşürülmesine, arıtılmasına ve iyileştirilmesine katkıda bulunurlar. Ağır metaller gibi kirleticilerin bazı akuatik bitkilerin biyo-absorpsiyon veya yaprak yüzey adsorpsiyonu yapması ile doğada yayılması önlenmektedir (Graneli ve Solander, 1986). Akuatik bitkiler kendi arasında free-floating (yüzen bitkiler), submerged (batık bitkiler) ve emergent (köklü su bitkileri) olmak üzere 3 gruba ayrılırlar. Köklü su bitkileri, yüzen bitkiler ve batık bitkilere sırasıyla *Typha angustifolia* L., *Nymphaea mexicana* Zucc. ve *C. demersum* örnek verilebilir. Batık bitkiler, ağır metalleri büyük miktarlarda biriktirebildikleri için akuatik ortamda bulunan ağır metal kirliliğinin giderilmesinde daha faydalıdır (Syed ve ark., 2018).

Ceratophyllum demersum L. kumlu substratlarda gömülü olarak ya da durgun ve yavaş hareket eden suda gelişir, köksüz fakat yoğun yapraklı çok yıllık bir makrofittir. Bitkinin yaprakları tepelere doğru daha çok yoğunlaşır, vejetatif ve tohumla çoğalırlar. *C. demersum* suyun bulanık veya tuzlu olmasına tolerans göstermeyip suda yaşayan otobur canlılar için herhangi bir soruna yol açmaz (Syed ve ark., 2018).

Ceratophyllum demersum L. ağır metaller ile kirlenmiş ortamların iyileştirilmesi için kullanılan bir batık su bitkisidir (Fawzy ve ark., 2012; Chen ve ark., 2015). Abu'nun (2015) çalışmasında öne sürdüğü gibi, *C. demersum*, hava kirliliğinde, radyoaktivite göstergelerinde, su ortamında biyoizlemede, genetik mühendisliğinde ağır metallerin biyoindikatörleri olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca bu bitki balıklar ve diğer akuatik canlılar için barınak işlevi de görmektedir.

Ceratophyllum demersum L. Bilimsel sınıflandırma (Keskinan ve ark., 2004):

Alem: Plantae

Şube: Spermatophyta

Alt-şube: Angiospermae

Sınıf: Dicotyledonae

Takım: Nymphaeales

Aile: Ceratophyllaceae

Cins: *Ceratophyllum*

Tür: *Ceratophyllum demersum*

Ceratophyllum demersum L. herhangi bir kök sistemi bulundurmayıp ihtiyaç duyduğu tüm besin maddelerini yaprakları ile kendisini çevreleyen sudan emer ve kısa sürede yoğun bir sualtı bitki örtüsü oluşturma yeteneğine sahiptir. Ayrıca yapraklarının bir rakun kuyruğuna benzemesi nedeniyle Tilki kuyruğu olarak da adlandırılır (Keskinan ve ark., 2015).

1.2. Nanopartiküller

NPlerin modern yaşamda endüstriyel alanda kullanımının hızla artması çevredeki potansiyel biyolojik etkilerine yönelik endişeleri beraberinde getirmektedir. NPler, küçük boyutları, nispeten geniş yüzey alanları ve yüzey enerjileri nedeniyle nano boyutlu olmayan malzemelerden ayrılırlar. NPlerin çevreye salınmasıyla ilişkili riskleri anlamak için, canlı organizmalar üzerindeki biyolojik etkileri hakkında daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Gill, 2014). Örneğin, altın NPler solüsyonda koyu kırmızı ile siyah arası renklerde, gümüş (Ag) NPler ise kırmızımsı kahverengi ve sarı arasında renklerde bulunmaktadır (Rai ve ark., 2008). Nano ölçekte (1-100 nm) ortaya çıkan yeni fonksiyonlar (örn. katalitik, elektrik, mekanik, optik ve elektromanyetik), elektronik, terapötik, tıbbi teşhis, giyim ve kişisel bakım dahil olmak üzere çok sayıda endüstride nano-etkin ürünlerin üretimine olanak sağlamaktadır (Pokhrel ve ark., 2013).

Partikül boyutu, yüzey yükü ve yüzey alanı genel olarak NP toksisitesine yol açan faktörler arasında tanımlansa da, NPlerin kendisiyle temas halindeki bitki türlerine nasıl toksisite bulaştırdığı belirsizliğini korumaktadır (Pokhrel ve ark., 2013). NPlerin endüstriyel alanda ki kullanımına olan genel ilgi, çevrede hangi etkilere neden olacağı sorusuna yönelik araştırmaları teşvik etmektedir. Bu etkileşimler, genellikle NP boyutuna, şekline ve bileşimine bağlı olarak büyük ölçüde değişir (Marusenko ve ark., 2013).

NPler farklı konsantrasyonlarda bulunduğu zaman tohum çimlenmesi ve büyümesi üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olduğu kadar tohum çimlenmesini ve mahsul performansını iyileştirebildiği de bilinmektedir. NPlerin potansiyel olumlu etkilerinden yararlanmak, çevre kirliliğini azaltmaya yardımcı olup tarımda kimyasalların tüketimini azaltmak için yararlı bir yaklaşım olacaktır. Bazı çalışmalarda nano boyutlu TiO₂' nin 2 ve 10 mg/l gibi düşük konsantrasyonlarda kullanılması, nano boyutlu olmayan Titanyum dioksit (TiO₂)' e kıyasla buğday çimlenmesini teşvik ediyorken 100 ve 500 mg/l gibi yüksek konsantrasyonlarda inhibe edici veya etkisiz olduğu belirlenmiştir (Feizi ve ark., 2013).

NPler, küçük boyutları ve daha hızlı hareket edebilme kabiliyetleri nedeniyle çevrede kolayca dağılmakta ve böylece kısa sürede daha geniş bir alana yayılarak ekotoksisiteye neden

olmaktadır. NPLer doğada uzun süre kalır ve canlı organizmalarda biyolojik olarak birikme riskini barındırır. Kumar ve ark. (2018)'nin araştırmasına göre, insanlar NPLere maruz kaldığı takdirde akciğer hastalığı, genotoksisite, iltihaplanma, lipid peroksidasyonu, oksidatif stress gibi yan etkilerin ortaya çıkacağı ve nihayetinde ölüme yol açabileceği bildirilmiştir. Yüksek yüzey-hacim oranları ile ilişkili nano ölçekli malzemelerin benzersiz özellikleri, son 20 yılda nanoteknolojinin uygulamasında artışa yol açmaktadır. Katalitik reaktivite partiküllerin boyutuna ve şekline bağlı olduğundan, NPLer üzerindeki katalitik işlemlerin etkinliği çok daha yüksektir çünkü reaktif yüzey alanı mikropartiküllere kıyasla önemli ölçüde artmaktadır (Asztemborska ve ark., 2015).

Nanoteknolojilerin artan uygulamasının yan etkilerinden biri, nanomalzemelerin çevreye salınması ve "nano atık" olarak yeni bir atık türü oluşturmasıdır. NPLerin alımı, biyoakümüülasyonu ve biyotransformasyonu ile ilişkili risklerin kapsamlı bir çalışması, gelecekte karşı karşıya kalabileceğimiz tehlikeleri anlamak için faydalı olacağı düşünülmektedir. NPLerin kontamine ortamdan uzaklaştırılması, ekotoksisitelerini önlediğinden bir remediasyon alt başlığı olan fitoremediasyon tekniği, çevrenin dekontaminasyonunu gerçekleştirerek NPLerin geri kazanılmasını sağlar ayrıca uygun maliyetli olduğu için umut verici olmaktadır (Asztemborska ve ark., 2015).

Bitkilerin metallere olan etkileşimi hakkında çok fazla araştırma olmasına rağmen, metalik NPLerin bitkilerle etkileşimi ile ilgili bilgiler hala yetersizdir. Yapılmış çalışmalar ise genellikle NPLerin bitki kök hücrelerine girdiğini göstermiştir. Bakır(II) oksit (CuO) NPLerin diğer NP türlerine kıyasla daha fazla toksik olduğu bilinmektedir, ancak NPLerin biyolojik sistemlerle etkileşimleri hakkındaki sınırlı bilgi nedeniyle uygulamalarıyla ilişkili riskler belirsizdir. *Halimione portulacoides* (L.) Aellen ve *Phragmites australis* ssp. (*P. australis*) dahil olmak üzere bazı tuzlu bataklık bitkileri, Bakır (Cu) ile kontamine olmuş ortamlara karşı fitoremediasyon potansiyeli gösterdiği saptanmıştır (Andreotti ve ark., 2015). Su ortamında, parçacıklar bir araya toplanma eğilimindedir. Tuzlu suda artan tuzluluk ve dolayısıyla artan iyonik kuvvet, parçacıkların elektroforetik hareketliliğini azaltarak kümelenmeyi teşvik etmektedir. Kümelenme ise yüzey alanını ve dolayısıyla çözünme potansiyelini özellikle yüksek konsantrasyonlarda azaltmaktadır (Bundschuh ve ark., 2018).

NPLer, yaşam döngüleri boyunca genellikle hammadde ve nano özellikli ürünlerin üretimi sırasında yayılma, ürünlerin kullanımı sırasında yayılma ve NP içeren ürünlerin atılmasından sonra salınım olmak üzere üç şekilde yayılma gösterirler (Bundschuh ve ark., 2018).

1.2.1. Nanopartiküllerin Su Bitkileri üzerine Etkisi

NPler, 100 nm veya daha az bir boyuta sahip olup nanoteknolojinin yapı taşları olarak kabul edilir ve bu özelliği ona yüksek yüzey / hacim oranı, yüksek reaktivite, hücre membranlarını geçme potansiyelini artırma veya yüzeyin içsel toksisitesine yol açmaktadır. Aslında NPlerin zararlı potansiyele sahip olup olmadığını, küçük boyutları ve geniş yüzey alanları belirlemektedir (Remédios ve ark., 2012).

Ağır metaller su ortamına hem çözünerek hem de NPler şeklinde girebilmektedirler. NPler 100 nm' den küçük olduğu için, "çözünmüş" olarak kabul edilen maddelerden daha küçüktür. Kirletici maddelerin akuatik bitkiler ile etkileşimi üzerine yapılan uygulamalar, çevresel izleme ve kirlenmiş tatlı su ekosistemlerinin iyileştirilmesini içermektedir. Çeşitli su kirliliği sebepleri arasında metal kirliliği en kritik olanıdır ve ağır metal içeren NPlerden kaynaklanan kirlilik de dahil olmak üzere tatlı su makrofitleriyle olan etkileşimleri üzerine çalışmalar yapılmıştır (Johnson ve ark., 2011). Bitkiler, kontamine olmuş karasal, sucul ve atmosferik ortamlarda NPlere maruz kaldıkları zaman, spesifik olarak maruz kalınan yollar NPlerin bitkiye giriş yolunu belirlemektedir. Bitki köklerinde bulunan tüyler, NPlerin kara ve su ortamlarından uzaklaştırılmasında rol oynar. Fakat günümüzde bitkilere aktarılan NPlerin akıbeti ve gelecekteki davranışları hakkında aydınlatılmayı bekleyen birçok soru işareti bulunmaktadır (Juhel vd. 2011). Abdel-Wahab ve ark. (2019), NPlerin artan kullanımının, çevreye yayılımını, tarımsal ekosistem bileşenleriyle etkileşime girmeleriyle ilgili olarak, NPlerin tarım ekosistemine karşı bilgi eksikliklerini gidermeye çalışmışlardır.

NPler bitki köklerine girdikten sonra hücre duvarındaki ozmotik basınç veya gözenekler vasıtasıyla sürgünlerde, gövdelerde, yapraklarda ve köklerde birikebilmektedirler (Domingo ve ark., 2019). Metalik NPler, bitkideki zarar verici ajanlara karşı direnç sağlayan reaksiyonlara müdahale ederek bitki hücre metabolizmasını değiştirmektedir. Larue ve ark. (2012)'nin çalışmasında NPlerin bazen yapraklara, meyvelere ve tohumlara kadar ilerlediği ve TiO₂ NP içeren topraklarda yetiştirilen mahsullerin köklerinde TiO₂ NP biriktirebildiğini ve bunları sürgünlerine ve yenilebilir kısımlarına aktararak besin zincirine geçebileceği kaydedilmiştir.

Günümüzde 1 ila 100 nm arasında bir boyuta sahip olan NPler ve bunlardan türetilen nanomalzemeler, yeni teknolojilerin geliştirilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu NPlerin, nano boyutta olmayan malzemelerden farklı olarak kendilerine özgü fizikokimyasal özellikleri bulunmaktadır. NPlerin olası toksik etkilerinin incelenmesi için, farklı boyutlarda ve şekillerde ki NPlerin konsantrasyonlarını test eden bitkiler kullanılmıştır. Atmosferde

bulunan bazı NPLer (<100 nm) stomalar ile yaprağa girebildiğinden, gövdeden geçerek diğer bitki hücre bölgelerine ulaşmaktadır. Bununla birlikte, daha sık olarak, NPLer toprakta ve suda biriktiğinden, bitkiler kök sistemleri ile seçici alım gerçekleştirerek farklı NPLeri emer ve ardından biyotransformasyon ve translokasyon mekanizmaları yoluyla NPLeri farklı organlarda depolamaktadırlar (Pokhrel ve ark., 2013). Nano boyutta olmayan malzemelerle kıyaslandığında, NPLerin artan yüzey/hacim oranı gibi fizikokimyasal özellikleri, çevrelerine daha fazla tepki göstermelerine ve spesifik membran taşıma mekanizmaları ile kolayca etkileşime girebildikleri anlamına gelmektedir. NPLerin bitki hücrelerine girmesinde, NP'nin boyutu, şekli, yükü, hidrofobikliği, kimyasal bileşimi ve kararlılığına bağlı olan farklı mekanizmalar rapor edilmektedir. Bitki hücresine girdikten sonra, NPLer apoplastik veya simplastik bir yolla, plazmodezmleri geçerek tüm bitki boyunca ksilem damarları vasıtasıyla taşınmakta olup, NPLerin alımı veya taşınma şekli, bitki türlerinin kendine özgü fizyolojisine bağlı olarak değişmektedir (Remédios ve ark., 2012).

1.3. Fitoremediasyon ve Uygulamaları

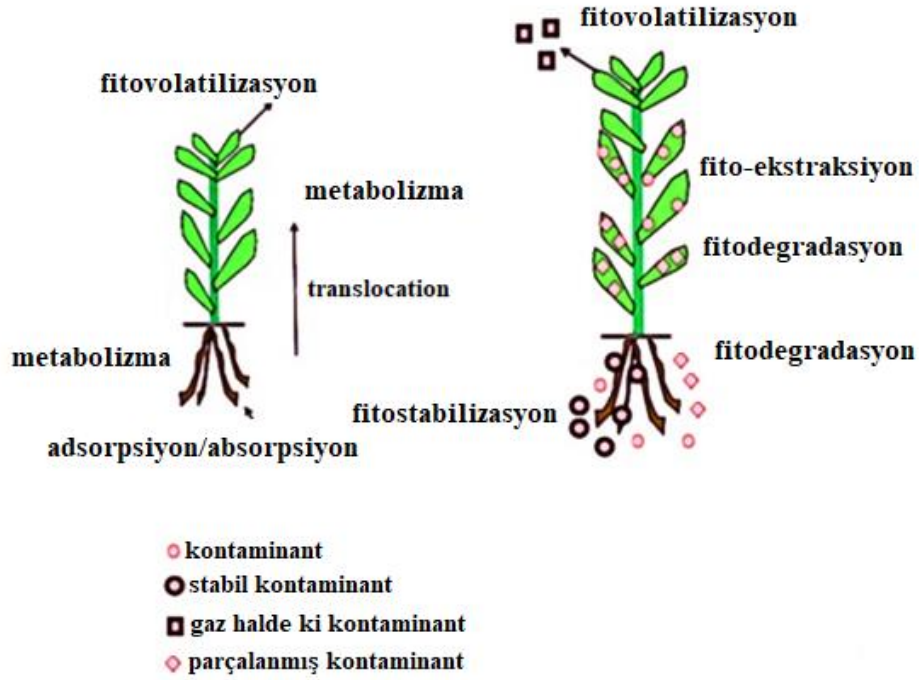
Fitoremediasyon, esasen bitki anlamında Yunanca fito kelimesinden ve Latince 'de denge veya iyileştirme anlamına gelen *remedium* kelimelerinin birleşiminden oluşmaktadır. Bu yaklaşım, bitki kök sistemlerinin eşsiz ve seçici alım yapabilme yeteneklerinden yararlanmaktadır (Gomes ve ark., 2016). Zirai ilaç uygulaması (pestisitler), madencilik ve endüstriyel faaliyetler sonucunda bitkilerin toprakta yoğunlaşan ağır metalleri nasıl tolere ettiklerini anlamak çok önemlidir. Günümüzde ağır metal kirliliğinin üstesinden gelmek için fiziksel, kimyasal ve biyolojik uygulamalar tek başına veya kombinasyon halinde etkili bir şekilde uygulanmaktadır (Aasim ve ark., 2020). Ağır metal kirliliği sorununa karşı kullanılan ve bir remediasyon alt başlığı olan fitoremediasyon, kirlenmiş toprakları ve tortuyu kirliliğinden arındırmak veya atık su ve çöp sızıntılarını arıtmak için bitkilerden faydalanan bir yaklaşımdır. Bu yöntem artan insan nüfusu ve buna bağlı olarak tarımsal arazi ve kalkınma talebinin artması nedeniyle ağır metal ve yarımetal kirliliğine sebep olan endüstriyel alanların temizlenmesini içermektedir (Manceau ve ark., 2008).

Metale tolerans gösteren bitkilerin bir kısmı metalin fotosentetik dokulara girişini engellerken hiper-akümülatör bitkiler topraktan metalleri çıkarır ve fazla miktarları yapraklar gibi hasat edilebilir kısımlarda yoğunlaştırıp diğer bitkiler için kritik olan seviyelerde ağır metal biriktirmektedir. Diğer bir deyişle, genellikle hiper-akümülatör bitkilerinin kullanımını içeren fitoremediasyon işlemleri, kontamine alanların iyileştirilmesi için yaygın, ekonomik ve

herhangi bir kimyasal madde içermeyen bir yöntemdir. Bir hiper-akümülatör bitkinin ağır metal ve yarımetaller (As, Co, Cu, Ni, Pb ve Se) açısından kg başına 1000 mg dan daha fazla ağır metal biriktirmesi gerekmektedir (Eze ve ark., 2018). Genellikle hiper-akümülatör bitkiler, bu ağır metalleri ve yarımetalleri biriktirerek, degradasyona uğramayan inorganik yapıdaki kirletici maddelerin seçici olarak uzaklaştırılmasına, kirlenmiş toprakların ve yeraltı sularının kirleticilerden arınabilmesini sağlamaktadır. Genel bir kural olarak, Fitoremediasyon metodunda en kolay elde edilebilir metaller arasında arsenik (As), Cu, çinko (Zn), Cd, nikel (Ni) ve selenyum (Se) bulunur. Orta düzeyde olan metaller demir (Fe), kobalt (Co) ve manganezdır (Mn). Pb, Cr ve uranyum (U) biyoyararlanım göstermez ya da çok az gösterir (Khalifa ve ark., 2018).

Endüstriyel faaliyetlerde yaygın olarak kullanılan Cd ve Pb, karasal ve sucul ekosistemlerde bulunan en toksik metaller arasındadır. Pb'un insan vücudunda birikerek böbreklerde, kardiyovasküler sistemde, eklemlerde ve üreme sisteminde fonksiyonel bozukluklara neden olabileceği belirtilmektedir (Dogan ve ark., 2018). Toprak günümüzde biyolojik, fiziksel ve kimyasal işlemlerle iyileştirilebilmektedir. Fiziksel ve kimyasal olan işlemler genellikle toprak matrisini tahrip etmelerinin yanısıra pahalıdır, ayrıca uygulama açısından karmaşık araçlar gerektirmektedirler. Bunun aksine, biyolojik yöntemler bitkilere veya mikroorganizmalara dayalı olduklarından çevre dostudur ve ekonomik olarak uygulanabilir. Fitoremediasyon, bazı yerel topluluklar ve düzenleyici kurumlar tarafından da geniş çapta kabul edilmektedir (Romeh, 2018).

Fitoremediasyon teknikleri (Şekil 1.3.), fito-ekstraksiyon (fitoakümülyasyon), fitofiltrasyon, fitostabilizasyon, fitovolatilizasyon ve fitodegradasyonu içermektedir (Ali ve ark., 2013).



Şekil 1.3. Bitki fitoremediasyon stratejileri (Pilon-Smits, 2005).

1.3.1. Fitoekstraksiyon

Fitoekstraksiyon, aynı zamanda fitoakümüülasyon veya fitoabsorpsiyon olarak da bilinir, metal kirliliğine toleranslı, yüksek miktarda kirletici biriktirebilen, kolay yetiştirilen ve 100 kat daha fazla metal biriktirme kabiliyetine sahip hiperakümülatör bitkilere dayanmaktadır. Hiperakümülatör bitkiler, yüksek ağır metal biriktirme ve translokasyon faktörleri ile karakterize olmaktadır. Biyoakümüülasyon faktörü olarak da bilinen biyolojik biriktirme faktörü, bitkilerde ki kirletici madde alım kapasitesini belirlemek için kullanılmaktadır (Ali ve ark., 2013).

Bitkilerin kök dokularında bulunan metal konsantrasyonunun ortamdaki kirletici metal konsantrasyonuna oranı biyoakümüülasyon faktörünü verir ve bir bitkinin hiperakümülatör olarak kabul edilmesi için biyoakümüülasyon faktörünün 1'den fazla olması gerekmektedir. Translokasyon faktörü 1' den fazla olan bitkilerin, metallerin köklerden sürgünlere translokasyonu için yüksek verimliliğe sahip olduğu kabul edilmektedir (Pratyush Kumar, 2018). Bu bitkiler ağır metalleri kirlenmiş topraklardan, tortulardan veya sudan kökleri yardımıyla uzaklaştırarak hasat edilebilir toprak üstü dokularına, yani sürgünlere taşırlar ve biriktirirler. Sürgünlere metal translokasyonu çok önemli bir biyokimyasal işlemdir.

Akümülyasyon köklerde olursa köklerin hasadı genellikle uygulamaya açık olmadığından etkili bir fito-ekstraksiyonda metalin sürgünlere taşınması arzu edilmektedir. Fitoekstraksiyonun verimliliği, topraktaki ağır metallerin biyoyararlanımına ve toprağın özelliklerine bağlıdır. Fitoekstraksiyonun verimliliği, biyokonsantrasyon ve translokasyon faktörü hesaplanarak ölçülebilmektedir. Biyokonsantrasyon faktörü (BCF), bitkinin çevresindeki ortamdaki dokularında metal biriktirme durumunu gösterirken, translokasyon faktörü, bitkinin biriken metali köklerinden sürgünlere taşınmasını ifade etmektedir (Ali ve ark., 2013).

1.3.2 Fitofiltrasyon

Fitofiltrasyon, kirletici maddelerin bitkiler tarafından kirlenmiş yüzey sularından veya atık sulardan uzaklaştırılmasıdır. Fitofiltrasyon, rizofiltrasyon (bitki köklerinin kullanımı), blastofiltrasyon (fidelerin kullanımı) veya caulofiltrasyon (bitki sürgünleriyle kirleticiyi alma) şeklinde üçe ayrılmaktadır. Fitofiltrasyonda kirletici maddeler emilmekte veya adsorbe edilmekte ve böylece ağır metallerin yer altı sularına hareketleri minimuma indirilmektedir (Ali ve ark., 2013).

1.3.3 Fitostabilizasyon

Fitostabilizasyon veya fitoimmobilizasyon, kirlenmiş su, toprak, tortu veya çamurdaki kirletici maddelerin kökler tarafından absorpsiyon, kökün yüzeylerine adsorpsiyon veya toprakta fiziksel stabilizasyon yoluyla kirletici maddelerin hareketsiz hale getirilmesidir. Bu teknik toprakta metal hareketini önlemek için bitki köklerinde veya kök çevresinde meydana gelen biyokimyasal işlemler ile ağır metallerin hareketliliğini ve biyoyararlanımını azaltarak yeraltı sularına sızmalarını veya besin zincirine girmelerini önlemek amacıyla kullanılmaktadır (Ali ve ark., 2013). Fakat fitostabilizasyon kalıcı bir çözüm değildir çünkü ağır metaller toprakta kalır ve sadece hareketleri sınırlandırılmaktadır. Aslında, potansiyel olarak toksik kirleticileri stabilize etmek (inaktive etmek) için bir yönetim stratejisidir. Bazı metaller, kimyasal özelliklerinden dolayı fitostabilizasyona diğerlerine göre daha yatkındır. Örneğin, Gomes ve ark. (2016), köklü makrofitlerden olan *Typha domingensis* Pers. (*T. domingensis*) ve *P. australis*' in metal biyoakümülyasyon performansına ilişkin araştırmalarında, Civa (Hg) ve As' i fitostabilize etmek için kullanılabilirliklerini, ancak diğer metalleri fitostabilize etmede etkili olmadıklarını saptamışlardır. Bir başka araştırma ile Wang ve ark. (2012), *Salix viminalis*

L. ve *Salix schwerinii* E.L.Wolf' un kök sistemlerinde Hg biriktirdiğini, böylece rizosferdeki Hg konsantrasyonunu azalttığı göstermişlerdir.

Fitostabilizasyon, diğer fitoremediasyon tekniklerine göre düşük maliyetli olması, çevreye zarar vermeyen ve kirlenmiş toprağın mevcut yerinde arıtılmasına olanak sağladığı için bir avantaja sahiptir. Fakat, bu yöntem bitki köklerinin derinliği ile sınırlı olup aynı zamanda bitki büyümesini korumak için sürekli izlenmesi gerekmektedir (Gomes ve ark., 2016).

1.3.4 Fitovolatilizasyon

Kirleticilerin bitkiler tarafından topraktan alınması, uçucu forma dönüştürülmesi ve daha sonra gaz değişiminin gerçekleşmekte olduğu stomalar yoluyla atmosfere salınıp kirletici maddenin topraktan uzaklaştırıldığı bir mekanizmadır. Bu teknik, organik kirleticiler, As, Hg ve Se gibi bazı yüksek uçuculuk gösteren ağır metaller için kullanılabilir. Ancak kirleticiler bir çevresel bölmeden (toprak) diğerine (atmosfere) aktarıldığından ve muhtemelen yağışla yeniden ekosisteme döneceği için kirletici maddeyi çevreden uzaklaştırmadığı için bu yöntemin kullanımı sınırlandırılmıştır (Gomes ve ark., 2016).

1.3.5 Fitodegradasyon

Fitodegradasyon, organik ksenobiyotiklerin bitkiler tarafından topraktan veya sudan doğrudan emilmesi ve bitki dokularında bulunan dehalojenaz ve oksijenaz gibi kendine özgü olan enzimler yardımıyla parçalanıp yok edilmesidir (Gomes ve ark., 2016). Bu süreç hem kök hem de sürgün dokularında gerçekleşebilmektedir. Bitkiler, kirliliğe maruz ortamlardan organik ksenobiyotikleri biriktirebilir ve metabolik faaliyetleri aracılığıyla bunları detoksifiye edebilirler. Bu açıdan bakıldığında yeşil bitkiler, biyosfer için "green liver (karaciğer)" olarak değerlendirilebilir. Fitodegradasyon, organik kirleticilerin uzaklaştırılmasıyla sınırlıdır çünkü ağır metaller biyolojik olarak parçalanamazlar (Ali ve ark., 2013).

1.3.5.1 Rizodegradasyon

Bitki kökleri, kirleticileri parçalayabilen rizosferik mikroorganizmaların büyümesini destekleyen proteinler, karbonhidratlar, organik asitler ve enzimler gibi organik bileşikler salgırlar. Salgılanan enzimler de organik ksenobiyotiklerin degradasyonunu

üstlenmektedirler. Bu yöntem kök çevresinden yaklaşık 1 mm ileriye kadar etkilidir ve fitodegradasyondan daha yavaş gerçekleşmektedir (Bulak ve ark., 2014).

1.4. Su bitkilerinde Ağır Metal Kirliliği

Su ortamındaki iz element kirliliği, sucul ekosistemler ve insan sağlığı üzerindeki potansiyel zararlı etkileri nedeniyle küresel bir endişe haline gelmiştir. Ağır metaller, doğal birikintiler, madencilikten atılan atıklar, endüstriyel ve tarımsal faaliyetler yoluyla su kütlelerini kirletebilir. Eser metallerle kirlenen su, insanın ve hayvanların içmesine, sulama, su ekosistemlerinin korunması, rekreasyon ve su ürünleri yetiştiriciliği için uygun olmayabilir. (Kibria, 2016; Gümüş ve ark. 2021).

Göller ve nehirlerde bulunan ağır metaller, toksisiteleri, uzun süre kalıcı olmaları ve biyolojik olarak birikme eğilimleri nedeniyle kapsamlı bir şekilde incelenmektedir. Birçok çalışma, farklı akuatik bitki türlerinin değişken miktarlarda ağır metaller biriktirdiğini göstermektedir (Cosio ve ark., 2014). Örneğin, Rai ve ark. (2018)'nin yapmış oldukları araştırmada, yüzen bitki olan *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (*E. crassipes*), köklü su bitkisi olan, *Typha latifolia* L. (*T. latifolia*), *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle (*H. verticillata*) ayrıca *C. demersum* ve *Potamogeton pectinatus* L. (*P. pectinatus*) gibi batık bitkilerin ağır metalleri biriktirmek için potansiyele sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Bunların arasından ağır metalleri sudan uzaklaştırmak için *H. verticillata* daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Köksüz türlerden biri olan *C. demersum*, element alımını yaprakları vasıtasıyla gerçekleştirir (Rai ve ark., 2018).

Akuatik bitkilerinin akümülyasyon yetenekleri genellikle batık bitkilerden yüzen bitkilere ve daha sonra köklü su bitkilerine doğru azalır, ancak bu durum bitki türlerinden ve su ortamından etkilenir. Su bitkileri, aktif ve pasif absorpsiyon yoluyla su veya tortulardan büyük miktarlarda metal alıp, bunları kök, gövde ve yaprak gibi farklı organlarda depolar. Jamnická ve ark. (2006) yapmış oldukları araştırmada, *Batrachium aquatile* (L.) Dumort. (*B. aquatile*), *Fontinalis antipyretica* Hedw. (*F. antipyretica*) ve *Myriophyllum spicatum* L. (*M. spicatum*) olmak üzere üç akuatik bitki türünde biriken ağır metal konsantrasyonları karşılaştırmışlar ve *B. aquatile*' de en yüksek Zn, Cu ve Cd içeriği bulunurken, en yüksek Pb değerleri ise *F. antipyretica*' da saptanmıştır.

1.5. Kadmiyum

Cd kirliliği madencilik, endüstriyel kullanım ve diğer antropojenik faaliyetler nedeniyle artmaktadır. Böbreklerde, kemiklerde birikir ve osteoporoz, böbrek yetmezliği, kalp hastalığı hatta kansere neden olmaktadır. Bu durum zamanla Cd ağır metalini insan sağlığı için ciddi bir tehdit haline getirir. Cd, insan popülasyonunun yanı sıra bitkilerde de toksik etkiler gösterir (EFSA, 2012).

Cd, bitkilerde büyümenin yavaşlaması, yaprakların normal yeşil renginin kaybolması, kök uçlarının esmerleşmesi ve ölüm gibi ciddi zararlara neden olup, ayrıca klorofil biyosentezini durdurarak fotosentezi de önleyebilmektedir (Benavides ve ark., 2005; Nagajyoti ve ark., 2010). Çevreye salınan Cd, tortularda yoğunlaşma eğiliminde olup besin Emilimi ve fotosentez enzimlerine müdahale ederek bitki büyüme hızının düşmesi ve beslenme dengesizliği gibi birçok yan etkiye neden olmaktadır. Ayrıca gen ekspresyonundaki değişiklikler, DNA onarım mekanizmasının inhibisyonunu, apoptoz ve otofajinin interferansı ve oksidatif strese yol açmaktadır (Bradl, 2005).

Cd, esansiyel olmayıp neredeyse tüm canlı organizmalar için oldukça toksiktir. Bu ağır metal, toksik etkilerini bazı esansiyel metaller ve kalsiyum ile rekabet edip oksidatif stresi indükleyerek göstermektedir. Cd ile kontamine olmuş bir ortam, ürünlerin Cd içermesine neden olmakta ve dolayısıyla bu ürünleri tüketen popülasyona Cd aktarılmasından sorumlu hale getirmektedir. Çevrede bulunan Cd'un çoğu, endüstriyel ve kentsel emisyonların atmosferde birikmesi ve fosfatlı gübreler gibi insan faaliyetlerinden kaynaklanmaktadır (Sterckeman ve ark., 2020).

Bitkilerde Cd birikimine yönelik araştırmalar temelde bitki ve toprakta bulunan Cd seviyeleri arasındaki ilişkiye ve sonrasında ağır metalin kökler ile taşınma sürecine odaklanmaktadır (Sterckeman ve ark., 2020). Bitki organlarında Cd dağılımı önce makroskopik ve eko-fizyolojik bir yaklaşımla, ardından moleküler biyoloji ile hem doku hem de hücre seviyesinde incelenmektedir. Cd' un esasen hiçbir biyolojik işlevi yoktur ve Fe, Mn veya Zn gibi mikro elementlerin taşınma yollarına dâhil olmaktadır. Ancak, Cd'un toprak üstü dokulara, özellikle meyve ve tohumlara taşınmasından sorumlu mekanizmalar henüz netlik kazanmamıştır. Cd esas olarak toprakta iki değerli bir katyon Cd^{2+} olarak bulunur. Bu nedenle, Cd^{2+} bir kez kök tarafından emildiğinde, onun bitkinin hava ile temas eden kısımlarına taşınması sırayla hücrelerde sekestrasyon, hücre sitozolünde taşınma ve ksileme yükleme şeklinde gerçekleşir (Kubier ve ark., 2019).

1.5.1 Su Bitkilerinde Kadmiyum Toksisitesi

Cd çevrede yüksek hareketliliği nedeniyle hayvan ve insan sağlığı için ciddi problemleri beraberinde getirmektedir. Cd toksisitesi karbon fiksasyonunu engelleyip klorofil içeriğini ve fotosentetik aktiviteyi azaltarak bitki büyümesini engeller ve sonuç olarak bitki nekrozuna yol açmaktadır. Akuatik bitkilerin Cd' a maruz kalması, yaprak nispi su içeriğini ve terlemeyi en aza indirerek bitkilerde ozmotik strese neden olur böylece bitkide fizyolojik hasar meydana gelmektedir. Genel olarak Cd, bitkinin Ca, P, Mg, K ve Mn elementlerini almasını engeller. Cd toksisitesi günümüzde aktif olarak araştırılmaktadır (Dogan ve ark., 2018).

Cd toksisitesinin akuatik bitkiler üzerindeki etkisi bitki büyüme ve gelişme şekli, çimlenmesi, besin alımı ve oksidatif hasar açısından incelenmektedir (Haider ve ark., 2021). Çimlenmesi açısından akuatik bitkinin toksik Cd seviyelerine maruz kalması, çimlenmeyi baskılamaktadır. Bitki büyüme ve gelişme açısından, Cd, akuatik bitkiler için gerekli bir element olarak kabul edilmez ve genel büyüme anormalliklerine veya inhibisyonuna neden olmaktadır. Kök, uzun süreli olarak Cd'a maruz kaldıktan sonra nekrotik ve müsilağlı hale gelir, böylece bitkilerin köklerinin ve sürgünlerinin uzamasını azaltıp, yaprak kıvrılmasına ve kloroza yol açmaktadır. Oksidatif hasar açısından, Cd, yaprakların kloroplastlarında gerçekleşen bozulma ile reaktif oksijen türleri (ROS) üretimine dolaylı yoldan yol açmaktadır (Abbas ve ark., 2017). Dogan ve ark. (2015)'nin yapmış olduğu çalışmada doku kültürü tekniği ile çoğaltılan *C. demersum*' un Cd ve Pb ile kirlenmiş akuatik ortamların fitoremediasyonunda etkin bir şekilde kullanılabilereği öne sürülmektedir. Bu çalışma aynı zamanda atık suların bitkiler tarafından arıtılması amacıyla yeni fitoteknolojilerin geliştirilmesine de olumlu yönde katkı sağlamaktadır. Daha önce belirtildiği gibi Cd, insan popülasyonunun yanı sıra bitkilerde de toksik etkiler göstermektedir. Bitkilerde büyümede yavaşlama, kloroz, kök uçlarında esmerleşme ve ölüm gibi ciddi zararlara neden olup, klorofil biyosentezini durdurarak fotosentezi de önlemektedir (Abbas ve ark., 2017).

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Akuatik Bitkilerde Ağır Metal Etkisi ile İlgili Çalışmalar

Wang ve ark. (2014), Akuatik bitkilerin ağır metal birikim potansiyelini belirlemek için, 10 ağır metalin (As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb ve Zn) suda, tortullarda ve batık su bitkilerinde ki konsantrasyonlarını araştırmışlardır. *C. demersum* da biriken maksimum Cr, Fe ve Ni konsantrasyonları sırasıyla 4242, 16.429 ve 2662 mg/kg olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar *C. demersum*' un kirli su ortamlarından ağır metalleri uzaklaştırmak için iyi bir aday tür olduğunu göstermektedir. Su ve tortularda ki ağır metal konsantrasyonlarının, önemli ölçüde farklılık göstermediği saptanmıştır.

Dogan ve ark. (2015)'nin gerçekleştirdiği çalışmada, akuatik makrofitler olan *C. demersum*, *Bacopa monnieri* (L.) Pennell (*B. monnieri*) ve *Rotala rotundifolia* (Buch.-Ham. ex Roxb.) (*R. rotundifolia*)'nın 12 gün süreyle 0, 0.1, 1 ve 10 mg/lt konsantrasyonlarında Cd ile muamele edildikten sonra Cd biriktirme yeteneklerini belirlemişlerdir. Cd konsantrasyonunda ki artış ile doğru orantılı olarak bitkilerde Cd birikimleri de artmıştır. Bulgular, *R. rotundifolia*'nın *C. demersum* ve *B. monnieri*'ye kıyasla daha yüksek Cd biriktirme kabiliyetine sahip olduğunu göstermektedir.

Hassoon (2015), *C. demersum*' un toz haline getirilip Cu, Cd, Pb ve Cr gibi bazı ağır metalleri sulu bir çözeltilen çeşitli deneysel faktörlerle uzaklaştırma kabiliyetini incelemiştir. Araştırma sonucunda, *C. demersum*' un Pb, Cu ve Cd' u uzaklaştırma yeteneğinin Cr' dan daha fazla olduğu saptanmıştır. *C. demersum*' un fitoremediasyon uygulamasına uygun olması, atık suları arıtmak için kullanılabileceğini göstermiştir. Araştırmacı *C. demersum*' un ağır metal kirliliği sorununun çözülmesine katkıda bulunabileceği sonucuna ulaşmıştır.

Ahmad ve ark. (2016)'nin öne sürdüğü çalışmada, iyi adaptasyon, daha yüksek büyüme oranı ve çeşitli abiyotik streslere karşı direnç ile karakterize edilmiş olan *C. demersum* ve *Potamogeton natans* L. (*P. natans*)' in ağır metal biriktirme kabiliyetini araştırmışlardır. *C. demersum*' da metallerin birikimi sırasıyla Alüminyum (Al) > Mn > Zn > Co > Cu > Pb > Cr > Ni > Cd şeklindedir. Al ve Mn, diğer ağır metallerden çok daha yüksek miktarlarda birikmiştir. *C. demersum* Co, Mn ve Cd metalleri için iyi bir akümülatörken, *P. natans* ise Cd için iyi bir akümülatör olarak hizmet etmektedir.

Parnian ve ark. (2016), *Lemna gibba* (L. *gibba*) ve *C. demersum* ' un akuatik ortamdan Cd ve Ni giderimi ile ilgili olan bir araştırma yapmışlardır. Sudaki Cd konsantrasyonu düşük olduğunda Cd' un *L. gibba* tarafından uzaklaştırılması, *C. demersum*' dan daha verimli olduğu

tespit edilmiştir. Sudaki Cd konsantrasyonu çok yüksek olduğunda, *C. demersum* ortamdaki Cd alımını *C. demersum*' da oluşan Cd toksisitesinden kaynaklı olarak azalttığı belirlenmiştir.

Adnan ve ark. (2017), toksik bir ağır metal olan Pb' un farklı konsantrasyonlarının akuatik bitki dokularının toplam klorofil içeriği üzerindeki etkilerini belirlemek için, *C. demersum* biktisinin farklı Pb konsantrasyonları (2, 4 ve 6 mg/l) altında gözle görülür bir şekilde gerçekleşen büyüme değişikliklerini ortaya koyan bir çalışma yapmışlardır. *C. demersum* tarafından Pb' un biyosorpsiyonu, artan Pb konsantrasyonu ile artmaktadır. *C. demersum* artan Pb konsantrasyonu sonucunda klorofil miktarında düşüş gerçekleşmektedir. Araştırmacılar, Pb' un fitotoksitesinin bitkilerin toplam klorofil içeriğini azalttığı ve bitkide yeni bir morfolojik yapı ve büyüme saptamışlardır (Adnan ve ark., 2017).

Doğan ve ark. (2017), *C. demersum*' u değişik konsantrasyonlarda (0-12 mg/l) ve sürelerde (1, 3 ve 5 gün) Cr ağır metaline maruz bırakıp bitkinin protein içeriği analiz etmişlerdir. En yüksek Cr birikimi 5 günün sonunda 12 mg/l olarak saptanmıştır. Genel olarak bitkinin ağır metal ile etkileşimi sürdükçe protein içerikleri de azalış göstermektedir.

Farhood (2017), *C. demersum* ve *P. australis* olmak üzere iki akuatik bitkide Cd, Cu ve Pb gibi bazı ağır metallerin biyoakümülyasyon yeteneğini incelemiştir. *C. demersum*' daki ağır metallerin biyokonsantrasyon aralığı Cd için 25000, Cu için 2857 ve pb için 35417 olarak saptanmıştır. Araştırmacı, incelenen ağır metallerin bitki dokusundaki konsantrasyonlarının sudakinden daha yüksek olduğunu ve *C. demersum*' un tüm metalleri *P. australis*' ten daha fazla biriktirdiği sonucuna varmıştır.

Teymouri ve ark. (2017), sulu çözeltilerden Cr(VI) ve Cd(II) akümülyasyonu için köksüz batık su bitkisi olan *C. demersum*' un akümülyasyon kapasitesini artırmak amacıyla çeşitli yöntemler kullandıkları bir çalışma yapmışlardır. Isıtma yöntemi, ham biyokütleyle kıyasla Cr(VI) birikimini arttırmaktadır. Öte yandan, kaynatma yöntemi de Cd(II)' nin birikimini arttırmış, ancak otoklavlama bunu biraz azaltmaktadır. Kaynatma, biyokütleden yabancı maddeleri uzaklaştırarak biyokütle yüzeyinde daha fazla adsorpsiyon alanı sağlamaktadır. Fosforik asit (H_3PO_4) ile muamele edilmiş bitkinin Cr(VI) için en fazla birikim kapasitesi gösterdiği belirlenmiştir. Sodyum hidroksit (NaOH) ile kaynatılmış olan bitki ise, Cd(II) için daha yüksek bir birikim kapasitesi (63.3 mg/g) göstermektedir. Araştırmacılar, doğal ortamda bitki kullanılarak Cr(VI) ve Cd(II) iyonlarını uzaklaştırmak için kullanışlı olan yolları açığa incelemiştir (Teymouri ve ark., 2017).

Wani ve ark. (2017), *C. demersum*' un Cd' a maruz kaldığı ve *C. demersum*' un ekosistemdeki Cd' u yok etme konusunda güçlü bir yeteneğe sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Cd, Co, Cu, Ni, Pb ve Zn' ye maruz bırakılmak üzere *C. demersum*, *M. spicatum*, *E.*

crassipes, *L. gibba*, *P. australis* ve *T. domingensis* gibi bazı akuatik bitkiler incelenmiştir. Bu türler, fitoremediasyonda kullanım potansiyeline sahip olup yüksek seviyelerde ağır metal birikimi göstermiştir.

Jawad ve ark. (2018), *C. demersum* kullanarak atık suların geri dönüşümünün mümkün olduğunu kanıtlayıp, tarım ve sanayi alanlarına yeniden kazandırılabilirliğini göstermişlerdir. Çalışmada, endüstriyel sularda bulunan Pb ve Cd (50 ppm), *C. demersum* ile uzaklaştırılmıştır. Öğütülmüş *C. demersum* kullanıldığında en verimli Pb birikimi 5, 10 ve 15 ml/dk oranında iken, ezilmiş bitki ise birikimi 5, 10, 15, 20 ve 25 ml/dk oranında gerçekleştirmiştir. Cd elementi ile kirlenmiş akuatik ortam öğütülmüş *C. demersum* ile 5, 10 ve 15 ml/dk oranında uzaklaştırılırken, ezilmiş olan ile Cd uzaklaştırma oranı 5, 10, 15, 20 ve 25 ml/dk olarak hesaplanmıştır (Jawad ve ark., 2018). *C. demersum* bir biyolojik indikatör olarak fazla miktarda Pb ve Cd akümülyasyon yeteneğine sahip olduğu için fitoremediasyon için uygun olup, Araştırmacılar *C. demersum*' un öğütülmesinin, ezilmiş haline göre Pb ve Cd gideriminde daha etkili olduğunu saptamışlardır.

Jiang ve ark. (2018), yapmış oldukları çalışmada, tortularda ve suda ne Cd ne de Pb tespit edilemediğinden, kullanılacak *Acorus calamus* L., *Schoenoplectus tabernaemontani* (C.C.Gmel.) Palla, *P. australis*, *Marsilea quadrifolia* L., *Nymphaea tetragona* Georgi., *Eleocharis plantagineiformis* Tang & F.T.Wang, *H. verticillata*, *C. demersum*, *Myriophyllum verticillatum* L. ve *P. pectinatus* akuatik bitkilerin kök, gövde ve yaprak gibi dokularında sadece vanadyum (V), Ar, Cr veya Hg ağır metallerinin translokasyonunu incelemişlerdir. Ağır metaller bitkiler tarafından topraktan veya sudan alınabilmektedir. Kullanılan akuatik bitkilerin tamamı farklı oranlarda ağır metal biriktirme yeteneğine sahip olup genel olarak, ağır metallerin birikimi $Cr > Hg > V > Ar$ sırasını takip etmiştir ve bunların bitki dokularındaki ortalama miktarları Cr için 0.516 ± 0.441 mg/kg, Hg için 0.284 ± 0.245 mg/kg, V için 0.185 ± 0.184 mg/kg ve Ar için 0.165 ± 0.106 mg/kg. *P. australis*, diğer bitkilere kıyasla köklerde, yapraklarda ve gövdede 0.879 mg/kg daha fazla Cr alırken, *C. demersum* ise dokularında toplam 0.679 mg/kg V biriktirerek daha etkili olduğu araştırmacılar tarafından kanıtlanmıştır (Jiang ve ark., 2018).

Mahmoud ve ark. (2018), *C. demersum* bitkisinin 16 günlük bir süre boyunca farklı konsantrasyonlarda Pb, Al ve Cd' a karşı gösterdiği birikimi ve toleransını incelemeyi amaçlamaktadırlar. Pb, Al ve Cd ağır metalleri, bitki büyümesi üzerindeki toksik etkileri ile bilinir, ancak toksisite seviyeleri değişmektedir. Genel olarak, *C. demersum* büyüme eğrisi, Pb, Al ve Cd konsantrasyonları ve bunlara maruz kalma süreleri ile ters orantılı olarak değiştiği

görülmüştür. En düşük toplam klorofil içeriği kontrole kıyasla, 50 mg/l Pb'de 280.65 mg/g, 9 mg/l Al'da 163.49 mg/g ve 0.5 mg/l Cd' da 154.44 mg/g olarak saptanmıştır.

Polechonska ve ark. (2018), *C. demersum*' un metal alım kapasitesinin oldukça yüksek olduğunu ve bu bitkinin iyi bir biyoindikatörden beklenen geniş bir dağılıma sahip olması, bolluğu ve laboratuvarında numune alıp kolay çoğaltılmak gibi bazı özelliklere sahip olduğunu aktarmışlardır. *C. demersum*, mükemmel bir biyoindikatörün gereksinimleri karşılamaktadır. Araştırmacılar ağır metalle kirlenmiş alanlarda metallere tolerans gösteren *C. demersum* bitkisinin fitoremediasyon için kullanılabilirliğini saptamışlardır.

Zena ve ark. (2018), laboratuvarında yaptıkları araştırmayla *C. demersum* ve *H. verticillata* bitkisinin sudan ağır metalleri uzaklaştırma kapasitesini belirleyebilmeyi amaçlamışlardır. *H. verticillata* bitkisinin *C. demersum* bitkisine göre daha uzun süre canlı kalabilme yeteneğine sahip olduğunu ve *H. verticillata* bitkisinin, *C. demersum*' dan daha fazla ağır metali dokusuna alarak kirli suyun biyolojik arıtımında kullanıma daha uygun olduğu sonucuna varmışlardır. *C. demersum*, fitoremediasyon için *H. verticillata*' dan daha az verimli olmasına rağmen yine de yüksek Pb birikimi göstermiş, üçüncü günde %29.2 Pb ve yedi gün sonra bu oran %51.1', on dört gün sonra %77.8, yirmi bir gün sonra %79.8 ve yirmi sekiz gün sonra % 81.9 birikim oranına yükselmiştir. Araştırmacılar, akuatik ortamda geriye kalan Pb miktarı üçüncü gün %70.5, yedinci gün %48,4, dördüncü gün %29.9, yirmi birinci gün %22.1 ve yirmi sekizinci gün % 18.0 oranına kadar indiği gözlemlenmiştir (Zena ve ark., 2018).

Anand ve ark. (2019), su kalite standartlarını korumak için ağır metallerin atık sulardan uzaklaştırılmasının esas olduğunu belirterek, çalışmalarında Cd ve Cr gibi ağır metaller için bazı makrofitler kullanıp bunların fitoremediasyon potansiyellerinin olup olmadığını incelemişlerdir. *E. crassipes*, 4000–6000 mg/kg Cr ve 2200 mg/kg Cd birikimi gerçekleştirmiştir. *Azolla pinnata* R.Br. 740 µg/g Cd ve 1095 µg/g Cr,; *Azolla filiculoides* Lam. 2608 µg/g Cd ve 12,383 µg/g Cr,; *Salvinia natans* (L.) All. 7.40 mg/g Cr,; *P. australis* ve *P. pectinatus* sırasıyla 33.115 µg/g ve 964.75 µg/g Cd biriktirmiştir.

Akın ve Bingöl (2019), bazı akuatik bitkilerde (*P. australis*, *T. latifolia* L., *Nasturdium officinale* L., *Lemna minor* L. (*L. minor*) ve *C. demersum*) suda bulunan bor (B), Zn, Ar, Ag, Pb, Cu, Cd ve Cr konsantrasyonunu incelemişlerdir. Maksimum Ar birikimi *C. demersum*' da (16 ± 0.76 mg/kg) olup, ayrıca *C. demersum*, *L. minor* ve *N. officinale*' nin dokularında ağır metal biriktirme kapasitesinin yüksek olduğu anlaşılmıştır. Sonuç olarak *C. demersum*' un fitoremediasyon uygulamaları için uygun olduğu saptanmıştır.

Fawzy ve ark. (2019), *C. demersum* bitkisini hidroponik koşullar altında 1-21 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda Pb' ye maruz bırakmışlardır. Bu bitkinin 21 gün sonra

sırayla 0.125, 0.250 ve 0.500 µg/ml'de besin ortamında ilk başta ki metal konsantrasyonunun 7, 12, 21 katını biriktirdiği tespit edilmiştir. Suyun Pb gibi ağır metallere kirlenmesi çevre için kritik bir sorundur. Sonuçta *C. demersum*'un Pb ağır metali için etkili bir biyoakümülatör olduğu kanıtlanmıştır.

Galczyńska ve ark. (2019), kirlenmiş sulardan ağır metallere (Cd, Al, Cu) uzaklaştırılmasında *L. minor*, *Hydrocharis morsus-ranae* L. ve *C. demersum* kullanmış ve bu akuatik bitkilerin ekosistemden toksik metallere fitoremediasyonu için uygulaması önerilmiştir. Ancak bu metallere toksisitesi ve bunlara maruz kalma süresi, bitkilerin kullanımına bazı sınırlamaları da beraberinde getirmektedir.

Golabi ve ark. (2019), Cd ağır metalinin uzaklaştırılmasında *C. demersum* 'un etkisini araştırmayı amaçlamıştır. Cr(VI) adsorpsiyonu için en iyi koşullar pH 2, adsorban dozu 10 g/lt ve temas süresi 60 dakika olduğu koşullarda *C. demersum* 'un maksimum adsorpsiyon kapasitesi 10.20 mg/g olarak hesaplanmıştır.

Cao ve ark. (2020), Cu ve Cd' un *C. demersum* üzerindeki toksik etkileri mikrosistin-LR (MC-LR) varlığında karakterize edilmiştir. Sonuçlar, *C. demersum* 'da Cu ve Cd'un biyolojik birikiminin, MC-LR ve Cu/Cd arasındaki etkileşimle önemli ölçüde arttığını göstermiştir. Cu veya Cd' un *C. demersum* 'a toksisitelerinin, MC-LR eklenmesi ile kirliliğin şiddetinin artacağı ileri sürülmüştür. Araştırmacıların Cu, Cd ve MC-LR veya bunların kombinasyonunun, özellikle yüksek konsantrasyonlarda *C. demersum* 'un taze ağırlığını ve toplam klorofil içeriğini önemli ölçüde azaldığını saptamışlardır.

Çınar ve ark. (2020), *C. demersum* 'un Ni ile karşılaştırıldığında dokularında daha fazla Cr biriktirdiğini ve böylece *C. demersum* 'un metale özgü biriktirme kapasitesine sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Cr konsantrasyonunun artmasıyla *C. demersum* dokularında Cr birikimi artmıştır. 0.1, 1 ve 10 mg/lt' de *C. demersum* bitkisinin Cr içeriği, kontrole göre sırasıyla yaklaşık 14.8, 24.2 ve 33.0 kat daha fazla hesaplanmıştır.

Outa ve ark. (2020), Ag ağır metalinin *C. demersum* 'da diğer elementlerden daha az bulunduğunu ve *C. demersum* 'da tespit ettikleri diğer elementleri şu şekilde sıralamışlardır: Sr > Zn > Cu > Ni > Cr > Pb > As > Cd > Ag. *C. demersum* sapları, Zn, Sr ve Cd konsantrasyonlarına maruz kaldıktan sonra daha küçük kaldıkları tespit edilmiştir. *C. demersum* 'da daha yüksek miktarda biriken Zn, Sr ve Cd elementleri dışında, çoğu elementin konsantrasyonları *C. demersum* 'un gövdesi ve *Vatica cuspidata* (Ridl.) Desch' nin kökleri arasında kıyaslanmaktadır. Araştırma sonucunda *V. cuspidata* 'nın eser elementleri köklerden gövdeye taşıma konusunda *C. demersum* 'dan daha zayıf kaldığı belirlenmiştir.

Al-thahaibawi (2021), *C. demersum*' da biriken metallerin verilen sırayla Fe > Zn > Cd > Cr > Ni > Pb > Cu soldan sağa doğru düşüş gerçekleştiğini gözlemlemiştir. Araştırmacı Fe, Cd, Zn ve Cr miktarlarının izin verilen sınırları aşmış olduğunu, fakat Cu ve Pb'nin izin verilen sınırları aşmadığını saptamıştır.

Hu ve ark. (2021), farklı su canlılarında (akuatik bitkiler, kabuklu canlılar, yumuşakçalar ve balık) ağır metal konsantrasyonlarının (Cd, Cr, Cu, Pb ve Zn), besin ağındaki trofik transferlerini incelemiştir. Sonuçlar, yumuşakçalarda Cd, Cu, Pb ve Zn konsantrasyonlarının oldukça yüksek olduğunu, Cr konsantrasyonunun ise akuatik bitkilerde yumuşakçalar, kabuklular ve balıklardan daha yüksek olduğunu açığa çıkarmıştır.

Yaseen ve ark. (2021), *C. demersum* bitkisinin Pb ve Cd elementi konsantrasyonunu azaltmadaki rolünü kanıtlayıp, azalmanın etkileşim süresi boyunca devamlı olduğunu aktarmaktadırlar. Cd, bitkide besin emilimi ve fotosentezde görev alan enzimlere müdahale ederek büyüme hızının düşmesi ve beslenme dengesizliği gibi birçok etkilere neden olmaktadır. *C. demersum* bitkisinin ağır metale maruz kalmasından sonra, içerdiği element konsantrasyonunda bir artış gözlemlenmiştir. Araştırmacılar *C. demersum*' un, ağır metalle etkileşim süresinin ilerlemesiyle artan şekilde biriktirme yeteneği sergilediğini kaydetmişlerdir.

Khaleel ve ark. (2022), Cd, Ni ve Pb genotoksitesini, 2.5, 5 ve 7.5 mg/l konsantrasyonlarında *C. demersum* üzerinde incelemiştir. Bitkinin Pb ve Cd gibi toksik ağır metallere maruz kalması, ROS üretimini arttırmaktadır. ROS, çeşitli bitkilerde DNA hasarına neden olmaktadır. Bu ağır metallerin genotoksiteye bağlı olarak DNA dizisinde gerçekleşen farklılık, yeni bantların oluşması veya mevcut bantların kaybolmasına yol açmaktadır. Pb ve Cd 5mg/l ve 7.5mg/l konsantrasyonlarda iken 100, 200 ve 500 baz çifti üç yeni bant tespit edilmiştir.

Olawusi-Peters (2021), *Sacciolepis africana* C.E.Hubb. & Snowden, *C. demersum* ve *Pistia stratiotes* L. (*P. stratiotes*)' in ağır metal biriktirme yeteneklerini incelemiştir. *S. africana*, *C. demersum* ve *P. stratiotes*' ten daha fazla ağır metali biyolojik olarak absorbe ettiği saptanmıştır. *S. africana* bitkisinin kökleri Cd'u (0.0042±0.00), *C. demersum* (0.0027±0.00) ve *P. stratiotes* ise (0.0032±0.00) olacak şekilde akümüülasyon gerçekleştirmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Deneme yeri

Bu çalışmanın bitki eksplant ekim aşaması Sivas Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Tarım Bilimleri ve Teknoloji Fakültesi Moleküler, Genetik ve Biyoteknoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Bitki rejenerasyonu tamamlandıktan sonra ağır metale maruz bırakıp analiz etme işlemleri ise Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Hidrobiyoloji Laboratuvarında yapılmıştır.

3.1.2. Bitki materyali

Çalışmada kullanılan akuatik bitki materyali *C. demersum* Sivas Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Tarım Bilimleri ve Teknoloji Fakültesi Moleküler, Genetik ve Biyoteknoloji Laboratuvarından temin edilmiştir. Köksüz, çok yıllık bir akuatik bitki olan *C. demersum* sığ sularda yaşamakta olup besin maddelerini sürgünleri vasıtasıyla alır (Aasim ve ark., 2020). Bitki üzerinde bulunan yapraklar gövde boyunca halkasal dizilir ve bu halkalar bitkiye tilkikuyruğu görünümü verdiğinden dolayı *C. demersum* tilkikuyruğu olarak da bilinmektedir (Şekil 3.1.2.).



Şekil 3.1.2. *C. demersum* bitkisinin genel görünümü

3.1.3. Bitki besi ortamı ve kültür koşulları

Bitki besi ortamının hazırlanmasında 4.4gr MS (Murashige ve Skoog, 1962) mineral ve vitaminleri (Şekil 3.1.3.), karbon kaynağı olarak 30gr sükröz içeriği ve 1mg/lt BAP (6-Benzylaminopurine) içeren solüsyon bir miktar saf su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılıp daha sonra saf su ekleyerek 1 litreye tamamlanmıştır. Bitkinin büyüme ve gelişmesine katkıda bulunan MS içerik olarak makro elementler, mikro elementler ve vitaminlerden oluşmaktadır. Çalışma *C. demersum* akuatik bitkisiyle sıvı kültür ortamında gerçekleştirildiğinden agar ilave edilmemiştir. Besin ortamının pH değeri, 1N HCl veya 1N NaOH kullanılarak 5,6 değerine ayarlandıktan sonra 1,2 atm, 121°C'de 15 dk Otoklavda tutularak sterilizasyon sağlanmıştır. Kültürlerin tamamı 16 saat beyaz LED ışık altında 24±1°C sıcaklıkta bekletilecektir. Sterilizasyondan sonra bitki eksplantları tüm bir bitkiyi rejenere etmeleri için cam kavanozlar içerisinde bulunan besi ortamına aktarıldı.

Çizelge 3.1. MS ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları (Mahendra ve ark., 2015)

Numara	İçerik	mg/L
1	Amonyum nitrat	1.650.000
2	Borik asit	6.200
3	Kobalt (II) klorür.6H ₂ O	0.025
4	Bakır (II) sülfat.5H ₂ O	0.025
5	EDTA disodyum tuzu.2H ₂ O	37.300
6	Demir (II) sülfat.7H ₂ O	27.800
7	Glisin (serbest baz)	2.000
8	Magnezyum sülfat.H ₂ O	180.690
9	Manganez sülfat.H ₂ O	16.900
10	Molibdik asit (sodyum tuzu).2H ₂ O	0.250
11	Miyo inositol	100.000
12	Nikotik asit (serbest asit)	0.500
13	Potasyum iyodür	0.830
14	Potasyum nitrat	1.900.000
15	Mono Potasyum Fosfat	170.000
16	Piridoksin hidroklorür	0.500
17	Sükröz	30.000.000
18	Tiamin hidroklorid	0.100
19	Çinko sülfat.7H ₂ O	8.600

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitki eksplant yüzey sterilizasyonu

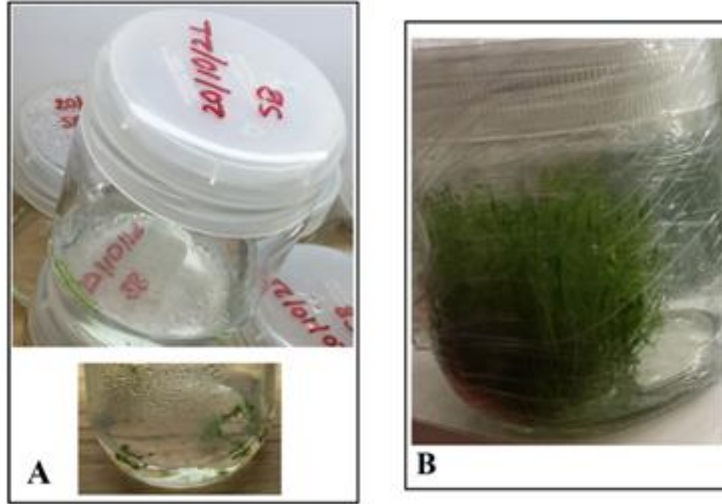
Bitki yüzey sterilizasyonu yapılırken dikkat edilmesi gereken nokta, kullanılan kimyasalın uygulama süresinin aşılması gerektiğidir. Çalışmada kullanılacak pens, bistüri gibi araçlar etil alkol içerisinde daldırılıp alevden geçirildikten sonra bir destek üzerine sıcak uç kısımları herhangi bir yere dokunmayacak şekilde soğumaya bırakılmıştır. Yüzey sterilizasyonundan önce bitki çeşme suyunun altında 15 dakika tutularak üzerindeki kalıntılar uzaklaştırılmıştır. *C. demersum* bitkisinin yüzey sterilizasyonu %0,05 mg/ml HgCl₂ ile birlikte 7 – 10 dk arası bir beher içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla sağlanır. Sterilizasyon işlemi için HgCl₂ kullanılacağı gibi NaOH veya NaClO (çamaşır suyu) kullanılarak bitki üzerindeki kontamine edici ajanların uzaklaştırılması mümkündür. Bu işlemin ardından otoklavlanmış saf su yardımı ile 5 dk süreyle 3 kez yıkama yapılarak bitki üzerindeki kalıntılar uzaklaştırılır (Şekil 3.2.1.). Eksplant ekiminden yaklaşık 1 ay sonra 10 cam kavanoza yerleştirilmiş kültürlerin 1 tanesinde bakteriyel/fungal kaynaklı kontaminasyon gözlemlenmiştir.



Şekil 3.2.1. *C. demersum* laminar flow kabin içerisinde otoklavlanmış saf su ile muamele edilmesi

3.2.2. In vitro koşullarda *C. demersum*' un çoğaltımı ve deneye hazırlanışı

Yüzey sterilizasyonundan sonra in vitro koşullarda mikropropagasyon işlemi için en son olarak *C. demersum* sürgünlerinden steril bistüri ve pens yardımıyla kesilip alınarak eksplantlar rejenerasyon için 4.4gr MS, 1 mg/lt BAP ve karbon kaynağı olarak 30gr şeker (sükroz) içeren besi ortamına aktarılmıştır. Bu aşamada gerçekleştirilen bitki doku kültürü Laminar flow kabin içerisinde yürütülmüştür. Kesim işleminin ardından eksplantlardan her cam kavanoz içerisinde 5er olacak şekilde ekim işlemi gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan kültürler cam kavanozlar içerisinde büyütme dolabında beyaz LED ışığı altında beklemeye alınmıştır (Şekil 3.2.2.). Daha sonra in vitro gelişimini tamamlamış olan bitkilerin üzerinde bulunan besi ortamı uzaklaştırılıp, ağır metal bulunan solüsyonlara 2 gram olacak şekilde eklenmiştir.



Şekil 3.2.2. *C. demersum* bitkisi eksplant sürgün rejenerasyonu bitkinin durumu 20.10.21 (A); bitkinin durumu 11.01.22 (B)

3.3. Fitoremediasyon Çalışmaları

3.3.1. RSM deneme tasarlama

Tez kapsamında in vitro koşullarda çoğaltılmış *C. demersum* bitkilerin fitoremediasyon çalışması Minitab 19 İstatistiksel program yardımıyla tasarlanmıştır. Denemede üç farklı faktör olarak NPler (25-120 mg/L TiO₂), Cd (0,1-2 g/L), ve deneme süresi ise 12-60 saat arasında ayarlanarak sisteme girilmiştir. Minitab programı ile Çizelge 3.2.'de gösterildiği gibi 20 farklı kombinasyon ile deneme yapılmıştır. RSM ile yapılan denemede tekerrür gerekli olmamasına rağmen bu çalışma iki tekerrür ile gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.2. RSM ile tasarlanan deneme planlaması

Yürütme sırası	PfTür	Bloklar	NP (mg/L)	Cd (mg/L)	Süre (saat)
1	1	1	25	1	12
2	1	1	100	1	12
3	1	1	25	2	12
4	1	1	100	2	12
5	1	1	25	1	48
6	1	1	100	1	48
7	1	1	25	2	48
8	1	1	100	2	48
9	0	1	62,5	1,5	30
10	0	1	62,5	1,5	30
11	0	1	62,5	1,5	30
12	0	1	62,5	1,5	30
13	-1	2	1,2625	1,5	30
14	-1	2	123,7375	1,5	30
15	-1	2	62,5	0,6835	30
16	-1	2	62,5	2,3165	30
17	-1	2	62,5	1,5	0,606
18	-1	2	62,5	1,5	59,394
19	0	2	62,5	1,5	30
20	0	2	62,5	1,5	30

3.3.2. Stok Çözeltilerin Hazırlanması

Bitkiler farklı konsantrasyonlarda Cd' a maruz bırakılmıştır. Cd için $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ (Sigma) kimyasalı kullanılmıştır. Cd kimyasalının uygulaması için 10mg/lt' lik stok solüsyonlar hazırlanmış ve diğer derişimler bu stok çözeltinden seyreltilerek hazırlanmıştır. Cd için 1, 2, 1.5, 0.6835 ve 2.3165 mg/lt solüsyonlar hazırlanmıştır. Bu solüsyonlara bırakılan bitkiler 12, 24, 30 ve 60 saat maruz kalmıştır.

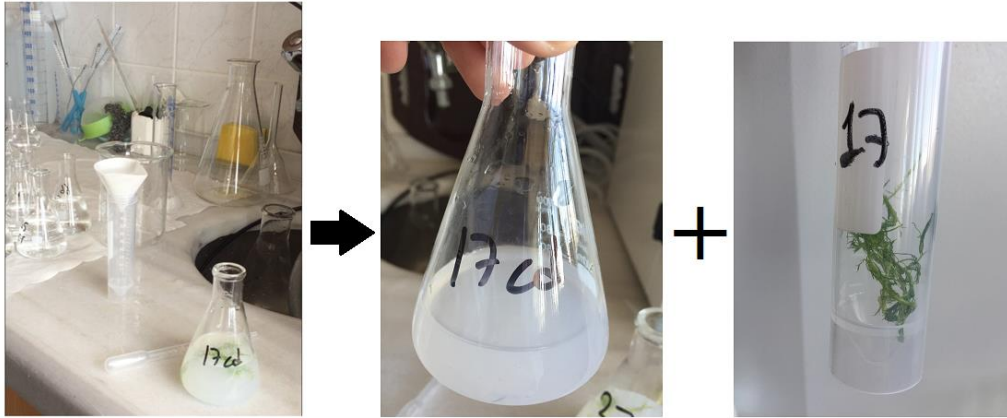
3.3.3. Invitro Çoğaltılmış bitkinin ağır metallere maruziyeti

1 litre solüsyon için nanopartikülden 25 μ , Cd 1mg konulduktan sonra saf su ile 1 litreye tamamlanıp konulan ağır metallerin solüsyon içerisinde manyetik karıştırıcıyla çözünmesi sağlanmıştır. Çözünme işleminin ardından solüsyon 40 adet Cd, 100ml erlenlere dağıtılmıştır. Son olarak 40 adet 2gr *C. demersum* tartılarak erlenlere aktarımı gerçekleştirilip 12, 24, 30 ve 60 saatlik bekleme süreleri başlatılmıştır (Şekil 3.3.). Bekleme süreleri dolan bitkiler sularından

süzülüp kuruması için Etüve yerleştirilmiştir (Şekil 3.3.1.). Kurutma işleminin ardından bitkiler mikrodalgada çözüldürülmüştür.



Şekil 3.3. Cd içeren solüsyona konulmuş *C. demersum* (A)



Şekil 3.3.1. Filtre kağıdıyla suyun süzülmesi

3.3.4. Doku örneklerinin alımı ve analizi

Farklı süreler boyunca Cd' a maruz bırakılan bitkiler daha sonra ortamdan alınıp önce çeşme suyu sonra saf su ile yıkanıp bir filtre kâğıdı kullanılarak suyundan arındırılmıştır. Suları alındıktan sonra taze ağırlığı tartılıp kurutulması için etüve (70 °C) yerleştirilmiştir. Bir sonraki mikro dalga ile çözüldürme işlemi için Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Toprak Gübre Ve Bitki Besleme Araştırma Laboratuvarı kullanılmıştır. Kurutulmuş bitkilere daha iyi bir çözünürlük için 5 ml %65'lik HNO₃, 2 ml saf su eklenerek MARS Xpress mikrodalgada (Şekil 3.4.2.) fırında çözülmüştür. Çözüldürme koşulları 1600 W, 180°C ve bekleme süresi 25 dk olarak ayarlanmış ve çözme işlemi tamamlandıktan sonra örnekler Whatman filtre kağıdı ile

süzülüp tüplere konulmuştur. Tüpler daha sonra saf su ile 20 ml'ye tamamlanmıştır. (Dogan ve ark., 2018, Aasim ve ark., 2020).

BCF, bitkinin topraktan ve su ortamından metal alma kapasitesini belirleyen bir faktördür. Aşağıdaki gibi hesaplanır (Zayed ve diğerleri, 1998):

$$BCF = \frac{\text{Bitki dokusundaki eser element konsantrasyonu (mg/kg)}}{\text{Elementin suda bulunan ilk konsantrasyonu (mg/L)}}$$



Şekil 3.4.2. MARS Xpress mikrodalga örnek çözünmesi

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. *C. demersum* bitkisinin in vitro çoğaltımı

Sürekli takviye ve kontaminasyon içermeyen bitkiler, özellikle su bitkileri fitoremediasyon çalışmaları için oldukça önemlidir. Genel olarak, fitoremediasyon çalışmaları için kullanılan bitki örnekleri doğal ortamdan (kanallar, göller, nehirler vb.) veya yerel akvaryumlardan satın alınmaktadır. Son yıllarda, fitoremediasyon çalışmaları için kontrol koşullarında yetiştirilen in vitro rejenere bitkilerin kullanımı yaygınlaşmaktadır. *C. demersum* bitkileri, sıvı kültür ortamı kullanılarak Doğan ve ark. (2018), tarafından geliştirilen protokol kullanılarak in vitro koşullar altında nodal segmentlerden çoğaltılmıştır.

4.2. *C. demersum* ile fitoremediasyon çalışmaları

2 aylık *C. demersum* bitkileri, fitoremediasyon potansiyeli için RSM yardımıyla *C. demersum*' un Cd' ye karşı optimizasyonu için kullanılmıştır. Minitab programı kullanılarak, 20 farklı kombinasyona deney tasarlamak için NP, Cd ve maruz kalma süresi gibi faktörler kullanılmıştır. Deney yapıldıktan sonra alınan veriler RSM programı ile analiz edilmiştir. Bu çalışmada üç farklı değişken (bitkiler tarafından Cd alımı, fitoremediasyon örneklerinde kalan Cd konsantrasyonu ve absorpsiyon yüzdesi) analiz edilmiş ve elde edilen asıl sonuçlar ve tahmin (Fit) sonuçları Şekil 4.1.'de verilmiştir.

Sıra	Pt tür	bloklar	NP	Cd	süre	Std sıra	Cd alımı	kalan Cd	absorptior	FITS1	FITS2	FITS3
1	1	1	25	1	12	1	200,81	0,01	99,01	-1198,02	0,026356	98,09846
2	1	1	100	1	12	2	31,52	0,00	100,00	3888,341	0,008458	99,34108
3	1	1	25	2	12	3	256,84	0,11	94,36	1375,502	0,124701	93,50174
4	1	1	100	2	12	4	134,67	0,09	95,39	-176,699	0,108188	94,00602
5	1	1	25	1	48	5	2187,10	0,02	97,67	2347,046	0,011228	98,77843
6	1	1	100	1	48	6	2592,85	0,00	100,00	1262,232	-0,00558	100,4646
7	1	1	25	2	48	7	14449,24	0,01	100,00	10448,65	0,003157	100,186
8	1	1	100	2	48	8	1518,40	0,00	100,00	2725,278	-0,01227	101,1339
9	0	1	62,5	1,5	30	9	5175,30	0,00	100,00	3979,271	-0,0039	100,2727
10	0	1	62,5	1,5	30	10	1307,36	0,00	100,00	3979,271	-0,0039	100,2727
11	0	1	62,5	1,5	30	11	3310,19	0,00	100,00	3979,271	-0,0039	100,2727
12	0	1	62,5	1,5	30	12	5672,13	0,00	100,00	3979,271	-0,0039	100,2727
13	-1	2	1,2625	1,5	30	13	3165,98	0,03	98,10	5506,552	0,025015	98,35481
14	-1	2	123,7375	1,5	30	14	5479,64	0,00	100,00	3353,429	-0,0022	100,1433
15	-1	2	62,5	0,6835	30	15	1036,98	0,00	100,00	122,5438	-0,00239	100,1698
16	-1	2	62,5	2,3165	30	16	2240,26	0,08	96,71	3418,401	0,072445	96,96297
17	-1	2	62,5	1,5	0,606	17	2,67	0,16	89,20	-2087,51	0,1337	91,599
18	-1	2	62,5	1,5	59,394	18	797,21	0,00	100,00	3176,5	0,022993	97,97407
19	0	2	62,5	1,5	30	19	2753,01	0,00	100,00	3488,533	0,00877	99,38639
20	0	2	62,5	1,5	30	20	5093,85	0,00	100,00	3488,533	0,00877	99,38639
21	1	1	25	1	12	21	204,22	0,01	100,00	-1198,02	0,026356	98,09846
22	1	1	100	1	12	22	23,02	0,00	100,00	3888,341	0,008458	99,34108
23	1	1	25	2	12	23	259,96	0,12	94,12	1375,502	0,124701	93,50174
24	1	1	100	2	12	24	139,25	0,09	95,40	-176,699	0,108188	94,00602
25	1	1	25	1	48	25	2264,80	0,02	97,66	2347,046	0,011228	98,77843
26	1	1	100	1	48	26	2550,94	0,00	100,00	1262,232	-0,00558	100,4646
27	1	1	25	2	48	27	14555,33	0,01	99,60	10448,65	0,003157	100,186
28	1	1	100	2	48	28	1516,20	0,00	100,00	2725,278	-0,01227	101,1339
29	0	1	62,5	1,5	30	29	4785,81	0,00	100,00	3979,271	-0,0039	100,2727
30	0	1	62,5	1,5	30	30	990,43	0,00	100,00	3979,271	-0,0039	100,2727
31	0	1	62,5	1,5	30	31	3174,33	0,00	100,00	3979,271	-0,0039	100,2727
32	0	1	62,5	1,5	30	32	5878,13	0,00	100,00	3979,271	-0,0039	100,2727
33	-1	2	1,2625	1,5	30	33	2866,50	0,03	98,08	5506,552	0,025015	98,35481
34	-1	2	123,7375	1,5	30	34	5630,16	0,00	100,00	3353,429	-0,0022	100,1433
35	-1	2	62,5	0,6835	30	35	948,78	0,00	100,00	122,5438	-0,00239	100,1698
36	-1	2	62,5	2,3165	30	36	2278,19	0,08	96,73	3418,401	0,072445	96,96297
37	-1	2	62,5	1,5	0,606	37	2,67	0,16	89,13	-2087,51	0,1337	91,599
38	-1	2	62,5	1,5	59,394	38	797,76	0,00	100,00	3176,5	0,022993	97,97407
39	0	2	62,5	1,5	30	39	2750,34	0,00	100,00	3488,533	0,00877	99,38639
40	0	2	62,5	1,5	30	40	5089,97	0,00	100,00	3488,533	0,00877	99,38639

Şekil 4.1. RSM ile elde edilen fitoremediasyon çalışma sonuçları

4.2.1. Bitkideki Cd miktarı

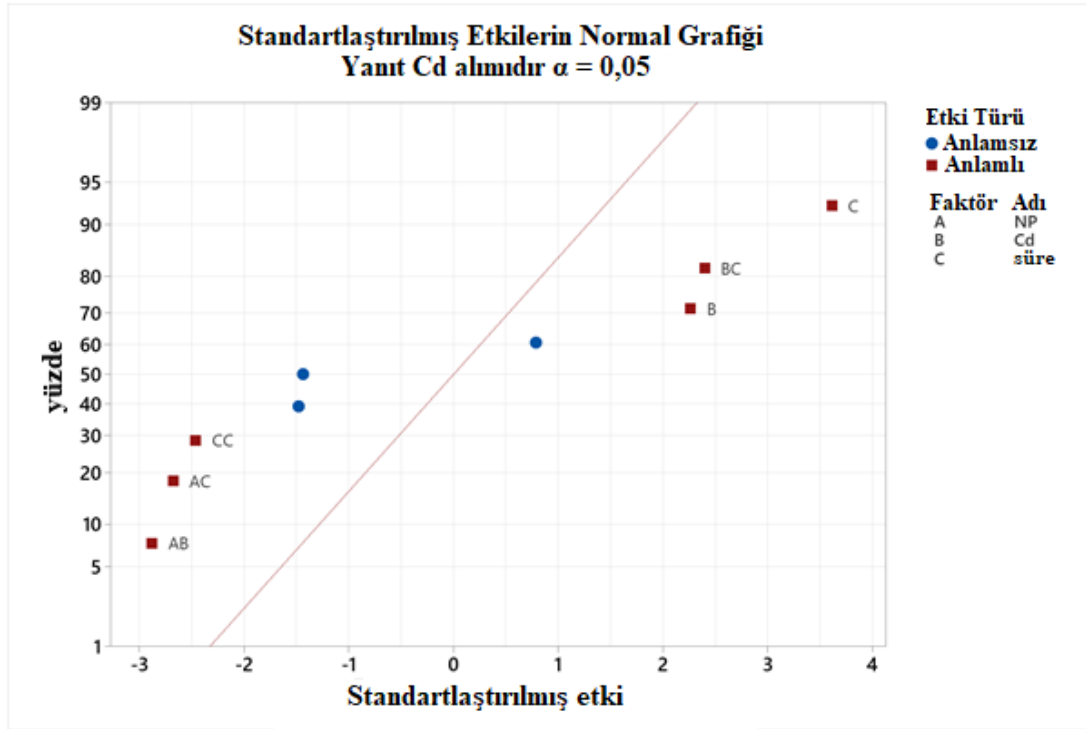
Bitkinin ağır metal alımı fitoremediasyon çalışması için önemli bir faktördür. Hiperakümülatör bitkiler ağır metallerin alınmasını takiben sürgünlerinde biriktirmesiyle bilinmektedirler. *C. demersum*, son yıllarda farklı ağır metallerin ve diğer kirleticilerin fitoremediasyonu için kullanılan önemli bir hiperakümülatör bitkidir. Varyans analizi (ANOVA) ardından deneyden elde edilen sonuçlar, Çizelge 4.1.'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1. *C. demersum* tarafından Cd alımının ANOVA analizi

Kaynak	S.D	Seq SS	Katkı	Adj SS	Adj MS	F-Değer	P-Değer
Model	1	269606882	63,64%	269606882	269606888	5,08	0,000
Bloklar	1	2311979	0,55%	2311905	2311905	0,44	0,515
Lineer	3	108020491	25,50%	108020491	36006830	6,78	0,001
NP	1	11589786	2,74%	11589786	11589786	2,18	0,150
Cd	1	27156549	6,41%	27156549	27156549	5,11	0,031
Süre	1	69274156	16,35%	69274156	69274156	13,04	0,001
Square	3	46560793	10,99%	46560793	15520264	2,92	0,051
NP*NP	1	5880754	1,39%	3292111	3292111	0,62	0,438
Cd*Cd	1	8487111	2,00%	10963535	10963535	2,06	0,162
Süre*süre	1	32192929	7,60%	32192929	32192929	6,06	0,020
2-yol etkileşim	3	112713619	26,61%	112713619	37571206	7,07	0,001
NP*Cd	1	44070498	10,40%	44070498	44070498	8,30	0,007
NP*süre	1	38083384	8,99%	38083384	38083384	7,17	0,012
Cd*süre	1	30559737	7,21%	30559737	30559737	5,75	0,023
Hata	29	154047378	36,36%	154047378	5311979		
Uyum eksikliği	5	123076649	29,05%	123076649	24615330	19,08	0,000
Hata	24	30970729	7,31%	30970729	1290447		
Toplam	39	423654260	100,00%				

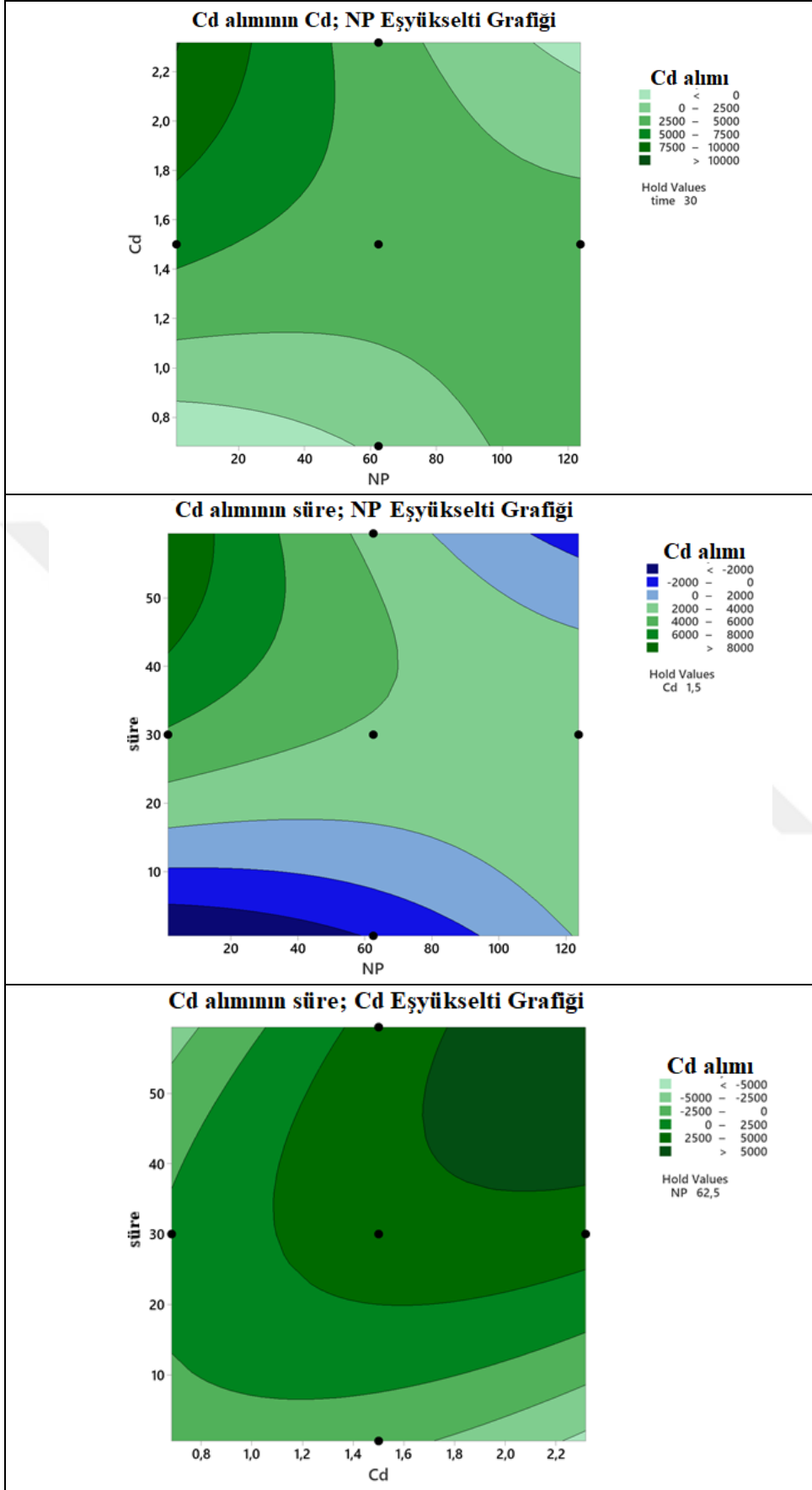
Çizelge 4.1.' in sonuçları, Cd miktarı (p0.05) ve süre (p0.05) gibi önemli etkiye sahip faktörler ile fazla etkisi olmayan NP konsantrasyonu gibi faktörlerin etkisini açıkça ortaya koymaktadır. Sadece iki faktörün etkileşimi incelendiğinde, NP × süre (p0.05), Cd × süre (p0.05) ve NP × Cd (p0.01)' un kadmiyum alımı üzerindeki anlamlı etkisi ortaya çıkmaktadır. Modelin R² değeri, %63,64 olarak kaydedilmiş ve bu değer girdi ve çıktı değişkenleri arasındaki iyi performansı ve etkileşimi yansıtmaktadır. Sonuçları anlamak için normal grafikler ve eşyükseleli eğrisi grafikleri kullanılmıştır.

Normal grafik (Şekil 4.2.), girdi değişkenlerinin çıktı değişkeni üzerindeki pozitif, negatif veya hiç olmayan etkisini göstermektedir. Çizginin sol tarafında bulunan girdi değişkenleri istatistiksel olarak anlamlıdır (kırmızı) ve olumlu etki göstermektedir. Çizginin sağ tarafında bulunan girdi değişkenleri (kırmızı kare) ise çıktı değişkeni üzerindeki olumsuz etkiyi gösterir. Öte yandan, çizgiye yakın veya üzerinde ki (mavi daireler) girdi değişkenlerinin hedef çıktı değişkenleri üzerinde hiçbir etkisi olmadığını göstermektedir. Sonuçlar, Cd, süre ve Cd × süre faktörlerinin Cd alımı üzerinde olumlu bir etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Bitkiler tarafından Cd alımı üzerine NP × süre ile NP × Cd' un olumsuz etkileri gözlemlenmiştir. NPLerin etkisiz oluşu, normal grafikte görünmektedir.



Şekil 4.2. NP konsantrasyonu, Cd konsantrasyonu ve maruz kalma süresinin *C. demersum*' un Cd alımı üzerindeki standartlaştırılmış etkisi

Eşyükselti grafikleri, sonuçları farklı alt sınıflara ayırarak iki girdi değişkeninin etkisini optimize etmek için güçlü bir araçtır. Şekil 4.3. girdi değişkenlerinin farklı etkileşimlerinin bitkiler tarafından Cd alımı üzerindeki etkisini ifade etmektedir. Sonuçlar, elde edilen sonuçların alt sınıflara dağılımını ortaya çıkarmıştır. Cd \times NP etkileşimi, bitkide 0 ila 10000 mg/kg Cd arasında değişen toplam 6 farklı alt sınıf göstermiştir. Sonuçlar, yüksek TiO₂-NP konsantrasyonunun Cd alımı üzerinde olumsuz bir etki yaptığını ortaya koymuştur. Ortamda yaklaşık 1.8 mg/L Cd ile düşük miktarda TiO₂-NPlerin (20 mg/L'den az) takviyesinin maksimum Cd alımına yol açacağı grafikten çıkarılabilir. NPler \times maruz kalma süresi etkileşimi, bitkiler tarafından maksimum Cd alımı (6000 mg/kg Cd'den fazla) için düşük NP konsantrasyonu (20 mg/L'den az) \times daha uzun maruz kalma (50 saat veya üzeri) faktörlerinin önemini ortaya çıkarmıştır. Öte yandan, 1.8 mg/L' dan daha fazla Cd ve uzun maruz kalma süresi (35 saatten fazla), 5000 mg/kg Cd' a kadar Cd alımına neden olmaktadır.



Şekil 4.3. NP konsantrasyonu, Cd konsantrasyonu ve *C. demersum*' un Cd alımında geriye kalan Cd konsantrasyonuna maruz kalma süresinin eşyükselti grafikleri

4.2.2. Ortamda Cd Konsantrasyonu

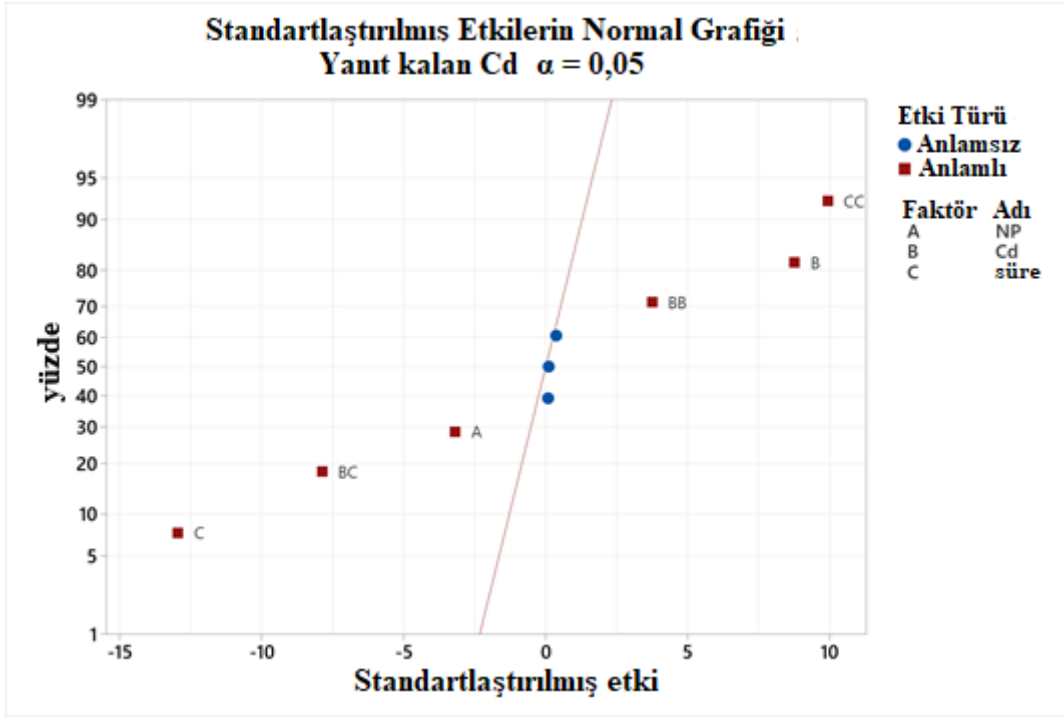
C. demersum tarafından Cd alımı sonuçlardan açıkça görülmekte olduğundan, kültür ortamında kalan Cd konsantrasyonunu bulmak için ortam kontrolü yapılmıştır. Ortamda kalan Cd konsantrasyonunun ANOVA analizi Çizelge 4.2.' de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Fitoremediasyon ortamında kalan Cd' un ANOVA analizi

Kaynak	DF	Seq SS	Katkı	Adj SS	Adj MS	F-Değer	P-Değer
Model	10	0,079086	93,73%	0,079086	0,007909	43,34	0,000
Bloklar	1	0,001540	1,83%	0,001540	0,001540	8,44	0,007
Lineer	3	0,046493	55,10%	0,046493	0,015498	84,94	0,000
NP	1	0,001851	2,19%	0,001851	0,001851	10,15	0,003
Cd	1	0,014002	16,59%	0,014002	0,014002	76,74	0,000
süre	1	0,030640	36,31%	0,030640	0,030640	167,92	0,000
Square	3	0,019725	23,38%	0,019725	0,006575	36,03	0,000
NP*NP	1	0,000053	0,06%	0,000026	0,000026	0,14	0,709
Cd*Cd	1	0,001691	2,00%	0,002560	0,002560	14,03	0,001
süre*süre	1	0,017981	21,31%	0,017981	0,017981	98,54	0,000
2-Way Interaction	3	0,011328	13,42%	0,011328	0,003776	20,69	0,000
NP*Cd	1	0,000002	0,00%	0,000002	0,000002	0,01	0,919
NP*süre	1	0,000001	0,00%	0,000001	0,000001	0,01	0,936
Cd*süre	1	0,011325	13,42%	0,011325	0,011325	62,06	0,000
Hata	29	0,005291	6,27%	0,005291	0,000182		
Uyum eksikliği	5	0,005278	6,26%	0,005278	0,001056	1931,13	0,000
Hata	24	0,000013	0,02%	0,000013	0,000001		
Toplam	39	0,084378	100,00%				

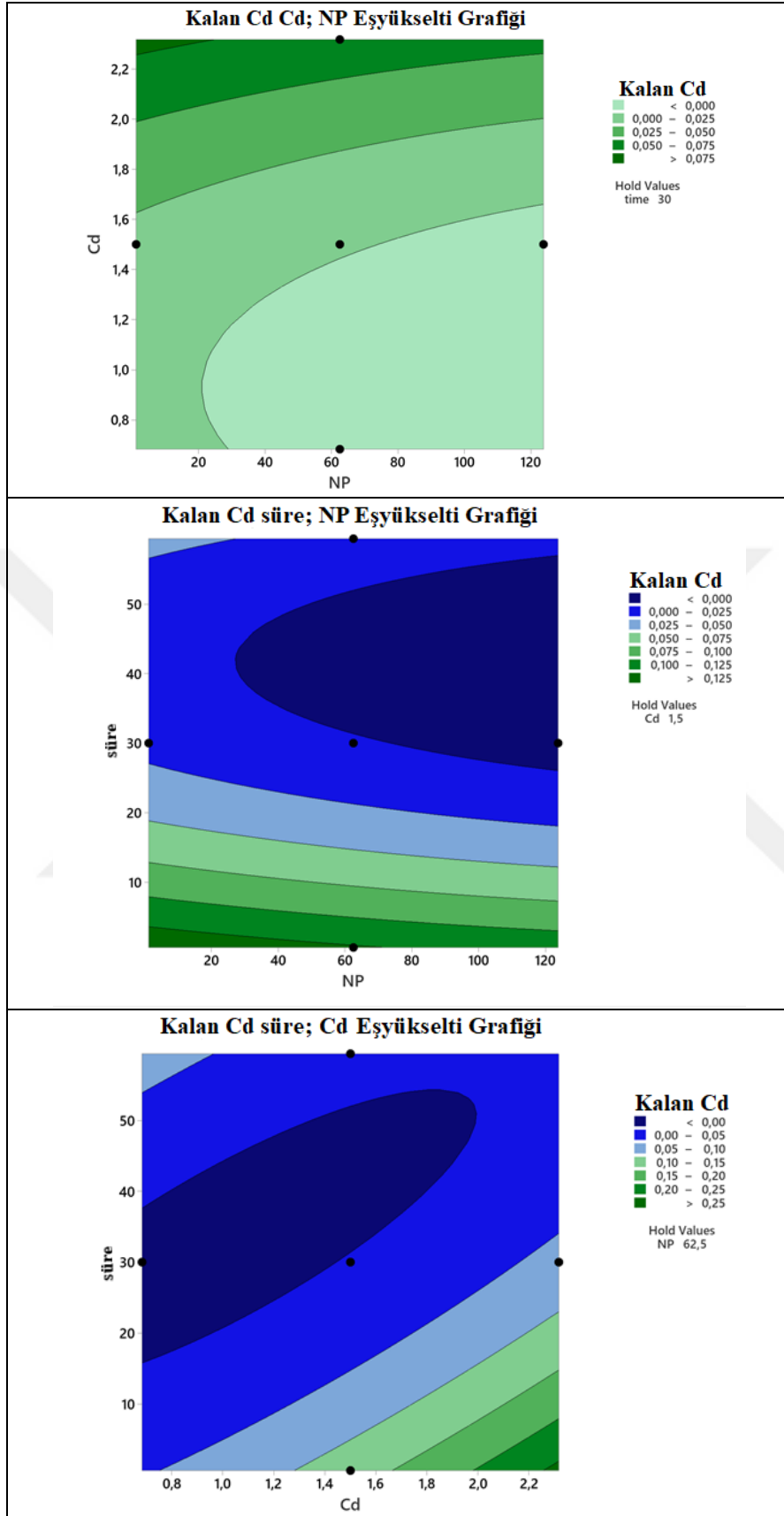
ANOVA sonuçları, tüm girdi değişkenlerinin istatistiksel olarak anlamlı etkisini ortaya koymuş ve NP (p0.003), Cd (p0.000) ve maruz kalma süresi (p0.000) olarak kaydedilmiştir. Öte yandan, Cd × maruz kalma süresi (p0.000) etkileşimi, kalan Cd konsantrasyonu üzerinde önemli bir etki sergiledi. NP × Cd (p0,919) ve NP × zaman (p0,936) etkileşimi ise kalan Cd konsantrasyonu üzerinde istatistiksel olarak anlamsız bulundu. Model özeti incelendiğinde, yüksek R² değeri (%93.73) ortaya çıkmış olup, modelin mükemmel performansını ayrıca girdi ve çıktı değişkenleri arasındaki yüksek etkileşimi göstermiştir.

Tüm girdi değişkenleri anlamlı bulunsa da, etkileri birbirinden farklıydı. Yalnızca Cd konsantrasyonu olumlu bir etki gösterirken, kalan TiO₂ NPler ve maruz kalma süresi, ortamdaki kalan Cd konsantrasyonu üzerinde olumsuz bir etki yaptı. Benzer şekilde, Cd × zaman' ın etkisi de olumsuz bulunmuştur. Fakat, NPler × zaman ve NPler × Cd' un Cd konsantrasyonuna etkisi kaydedilmedi.



Şekil 4.4. NP konsantrasyonu, Cd konsantrasyonu ve maruz kalma süresinin ortamda kalan Cd konsantrasyonu üzerindeki standartlaştırılmış etkisi

Fitoremediasyon çalışmalarının nihai amacı, kirleticilerin maksimum düzeyde iyileştirilmesini sağlamaktır. NP \times Cd etkileşimi sonuçları, 5 mg/L'ye kadar Cd ile birlikte yaklaşık 30-120 mg/L TiO₂ NPler kullanılarak ortamda sıfır Cd kalabileceğini gözler önüne sermiştir. Cd \times zaman kombinasyonu, kültür ortamında sıfır Cd için 2.0 mg/L' ye kadar Cd ve yaklaşık 18-28 saatlik maruz kalma süresini ortaya koymuştur.



Şekil 4.5. NP konsantrasyonu, Cd konsantrasyonu ve fitoremediasyon ortamında kalan Cd konsantrasyonuna maruz kalma süresinin eşyükselti grafikleri

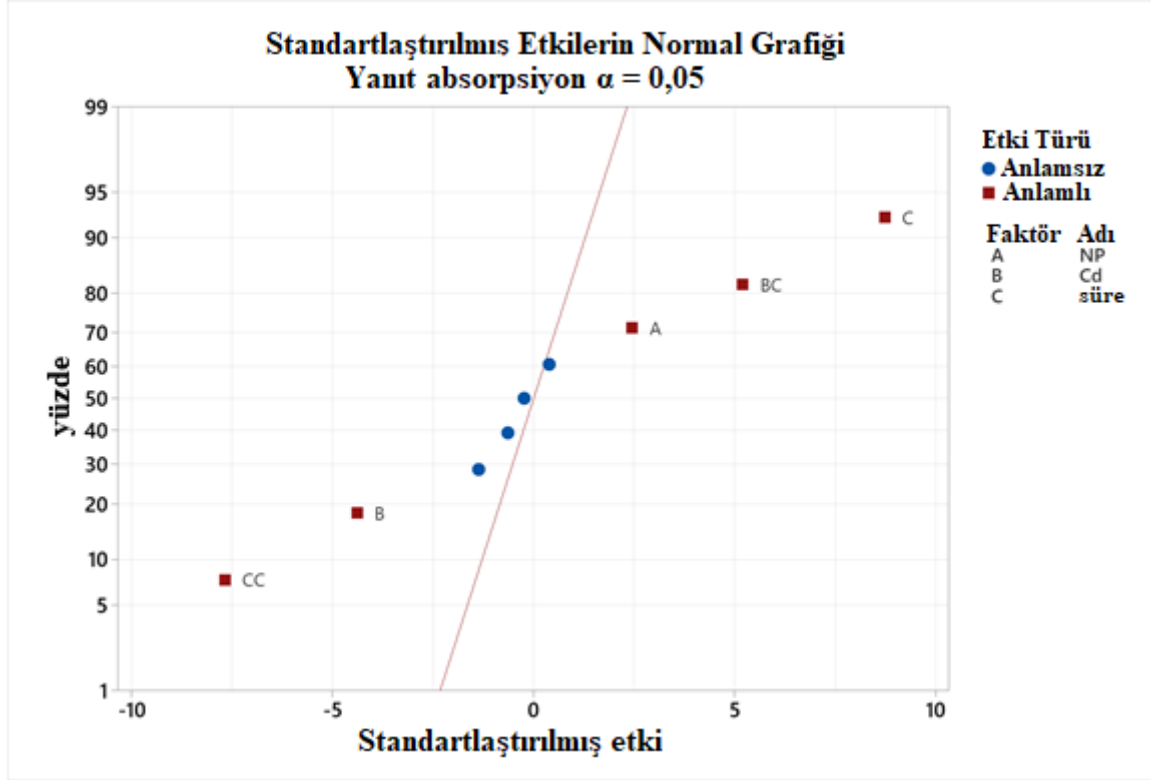
4.2.3. *C. demersum* bitkisinin absorpsiyon kapasitesi

Ceratophyllum demersum L. tarafından Cd alımı sonuçlardan açıkça görülmekte olduğundan, kültür ortamında kalan Cd konsantrasyonunu bulmak için ortam kontrolü yapılmıştır. Ortamda kalan Cd konsantrasyonunun ANOVA analizi Çizelge 4.3.' de verilmiştir. Diğer parametreler üzerindeki sonuçlar, farklı girdi değişkenlerinde *C. demersum*' un mükemmel performansını ortaya çıkardı. Sonuçların etkisini görmek için in vitro rejenere bitkilerin absorpsiyon kapasitesi kullanılıp, ANOVA analizi Çizelge 4.3.' te verilmiştir.

Çizelge 4.3. İn vitro rejenere *C. demersum*' un absorpsiyon kapasitesi ANOVA

Kaynak	DF	Seq SS	Katkı	Adj SS	Adj MS	F-Değer	P-Değer
Model	10	259,323	87,03%	259,323	25,932	19,46	0,000
Bloklar	1	7,542	2,53%	7,541	7,541	5,66	0,024
Lineer	3	135,309	45,41%	135,309	45,103	33,84	0,000
NP	1	7,997	2,68%	7,997	7,997	6,00	0,021
Cd	1	25,708	8,63%	25,708	25,708	19,29	0,000
Süre	1	101,603	34,10%	101,603	101,603	76,24	0,000
Square	3	79,679	26,74%	79,679	26,560	19,93	0,000
NP*NP	1	0,188	0,06%	0,070	0,070	0,05	0,820
Cd*Cd	1	0,902	0,30%	2,498	2,498	1,87	0,182
zaman*zaman	1	78,589	26,37%	78,589	78,589	58,97	0,000
2-Way Interaction	3	36,794	12,35%	36,794	12,265	9,20	0,000
NP*Cd	1	0,545	0,18%	0,545	0,545	0,41	0,527
NP*süre	1	0,197	0,07%	0,197	0,197	0,15	0,704
Cd*süre	1	36,052	12,10%	36,052	36,052	27,05	0,000
Hata	29	38,650	12,97%	38,650	1,333		
Uyum eksikliği	5	38,047	12,77%	38,047	7,609	302,86	0,000
Hata	24	0,603	0,20%	0,603	0,025		
Toplam	39	297,973	100,00%				

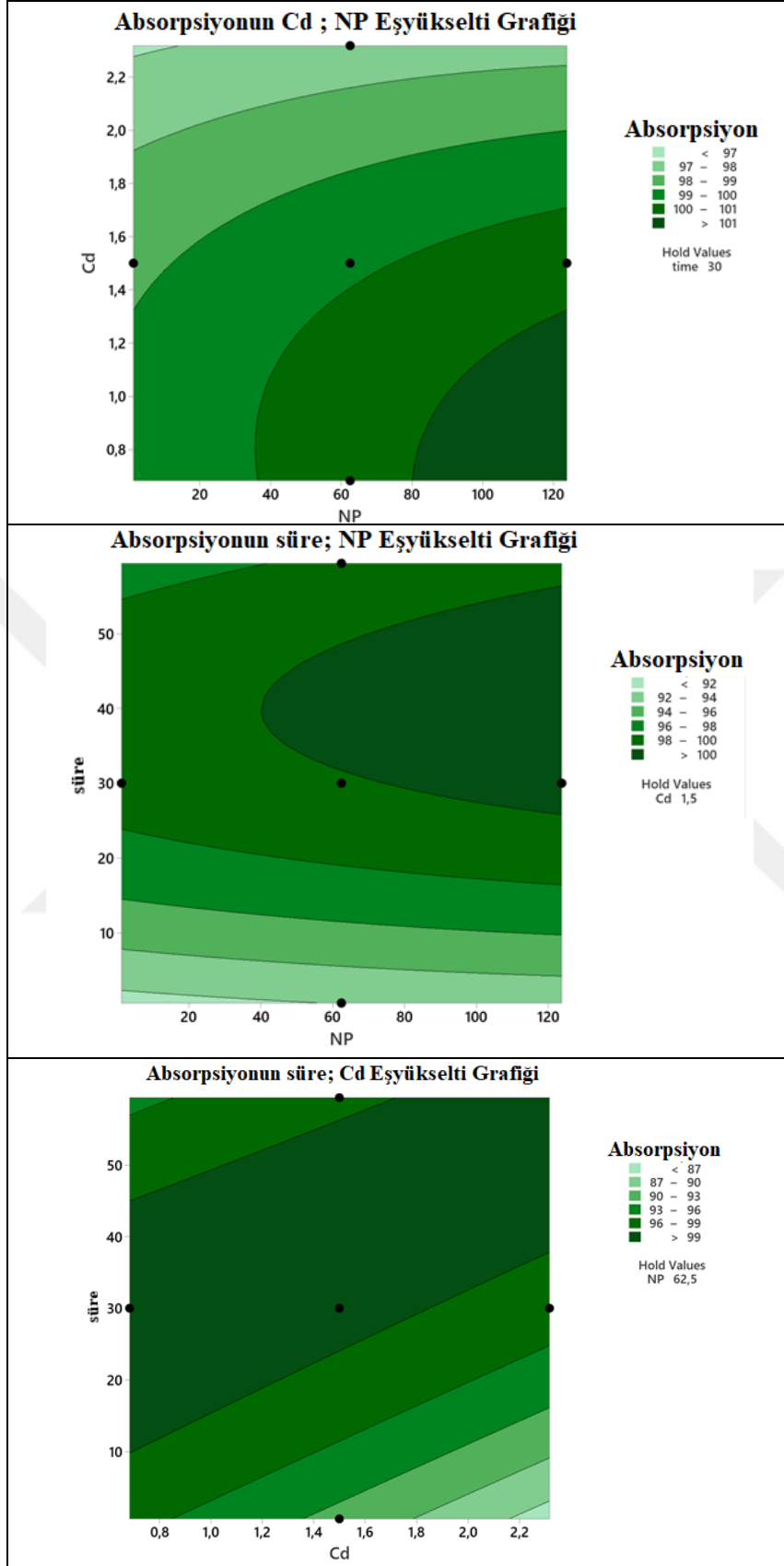
ANOVA analizinin absorpsiyon kapasitesi üzerindeki sonuçları, test edilen tüm girdi değişkenlerinin istatistiksel olarak anlamlı etkisini ortaya çıkarıp, NP için p0.021 ve hem Cd hem de maruz kalma süresi için p0.000 olarak kaydedildi. Öte yandan, yalnızca Cd × maruz kalma süresinin (p0.000) etkileşimi, Cd konsantrasyonunun absorpsiyonu üzerinde önemli bir etki göstermiştir. Ayrıca, NP × Cd (p0,527) ve NP × zaman (p0,704) etkileşimi için istatistiksel olarak önemsenmeyecek bir etki kaydedildi. Model özeti incelendiğinde, girdi ve çıktı değişkenleri arasında yüksek etkileşim ile modelin mükemmel performansını ortaya çıkaran yüksek R² değerini (%87.03) ortaya çıkardı.



Şekil 4.6. NP konsantrasyonu, Cd konsantrasyonu ve maruz kalma süresinin *C. demersum* tarafından kalan Cd absorpsiyonu (%) üzerindeki standartlaştırılmış etkisi

Standartlaştırılmış etkiye genel bir bakış, NP'nin ve maruz kalma süresinin, NPlerin *C. demersum* bitkilerinin absorpsiyon kapasitesi üzerinde olumlu bir etkisi olduğunu ortaya çıkardı (Şekil 4.6.). Cd konsantrasyonu ise absorpsiyon kapasitesi üzerinde olumsuz bir etki göstermiştir. NP \times zaman ve NP \times Cd etkileşimi anlamsız kalırken, Cd \times zaman etkileşimi *C. demersum* bitkilerinin absorpsiyon kapasitesi üzerinde olumlu bir etki göstermiştir.

Eşyükselti grafikleri göz önüne alındığında (Şekil 4.7.), NP \times Cd etkileşimi nispeten yüksek absorpsiyon kapasitesini ortaya çıkarmış ve bu iki girdi değişkeninin herhangi bir kombinasyonu ise *C. demersum*' un % 97.0'dan fazla absorpsiyon kapasitesine yol açabilir. Benzer şekilde, NP \times zamanın herhangi bir kombinasyonu, %92.0'den daha fazla absorpsiyon kapasitesi sergilerken, Cd \times zaman etkileşimi, %92.0'lik nispeten düşük absorpsiyon kapasitesi göstermiştir.



Şekil 4.7. *C. demersum* tarafından Cd absorpsiyonunda NP konsantrasyonu, Cd konsantrasyonu ve maruz kalma süresinin eşyükselti grafikleri

4.3. Çoklu Yanıt tahmini

Eşyükselti grafiklerinin sonuçları, farklı girdi değişkenlerinin herhangi bir kombinasyonunun *C. demersum* bitkisinin mükemmel fitoremediasyon potansiyeline sahip olabileceğini göstermiştir. RSM modeli, tüm girdi değişkenlerini dikkate alarak çıktı değişkeninin optimizasyonu için kullanılır. Bu nedenle, bitkiler tarafından maksimum Cd alımı, absorpsiyon kapasitesi ve fitoremediasyon ortamında "sıfır" Cd konsantrasyonu yanıt optimizasyonu olarak belirlendi. Sistem hedef değerleri Çizelge 4.4.'te verildiği gibi ayarlanmıştır.

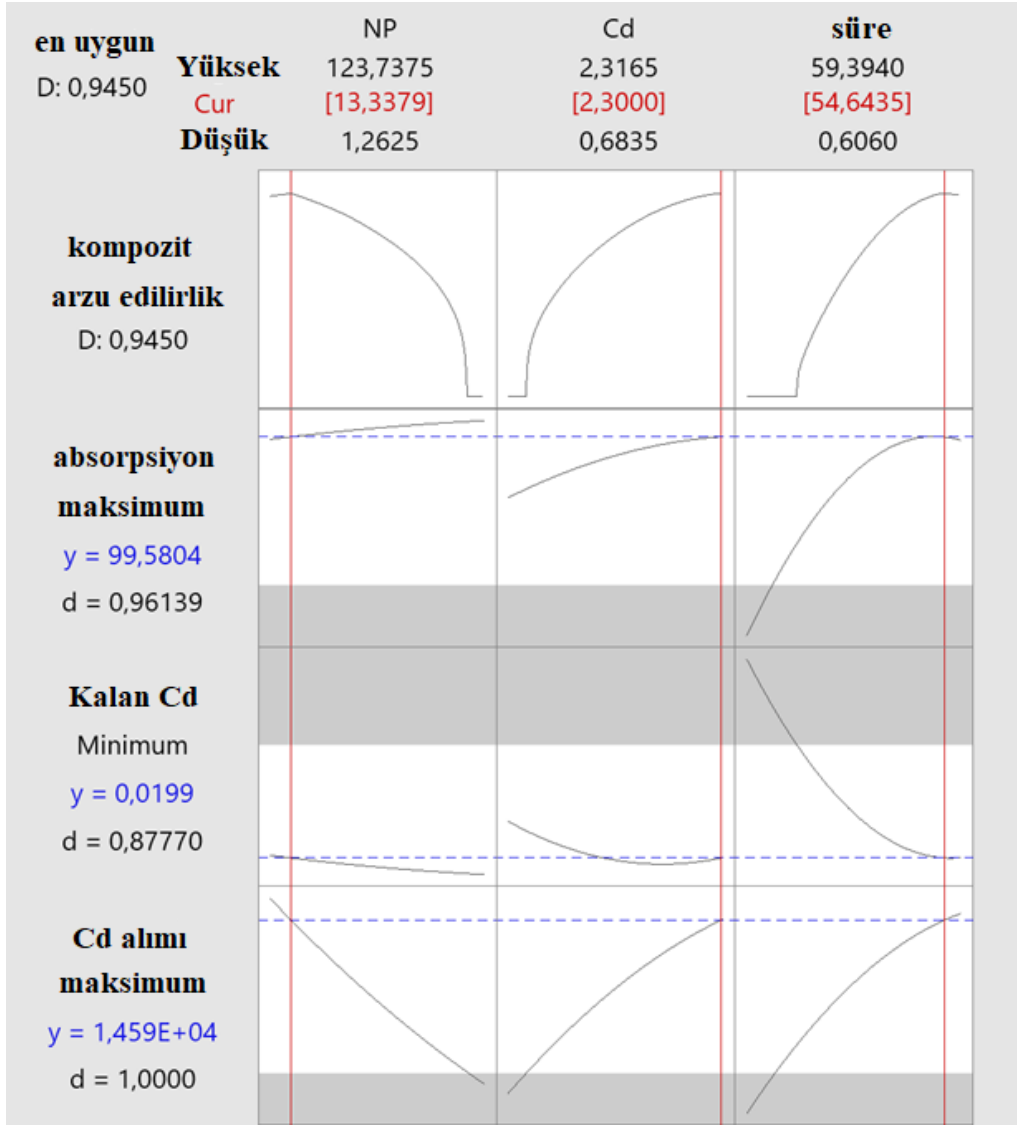
Çizelge 4.4. Yanıt optimizasyonu için hedef çıktı değişkenleri seti

Cevap	Hedef	Alt	Hedef	Üst	Ağırlık	Önem
absorpsiyon	maksimum	89,1329	100,0		1	1
Kalan Cd	minimum		0,0	0,163007	1	1
Cd alımı	maksimum	2,6667	14555,3		1	1

Çoklu yanıt tahmin sonuçları Çizelge 4.5. ile ifade edilmektedir. Model, girdi değişkenlerini 13.3379 mg/L NP, 2.30 mg/L Cd konsantrasyonu ve 54.6535 saat maruz kalma süresi olarak ayarlanmıştır. Çıktı değişkenleri için modelin tahmin değerleri %99,58 absorpsiyon kapasitesi, ortamda kalan 0,0199 mg/L Cd ve bitkiler tarafından yüksek 14585 mg/Kg Cd alımıdır. Modelin yanıtı da Şekil 4.4.'te sunulmakta ve sonuçları doğrulamaktadır. Ayrıca girdi ve çıktı değişkenleri arasındaki ilişkiyi de yansıtmaktadır.

Çizelge 4.5. Modelin çoklu yanıt tahmini

Değişken	Ayarlar			
NP	13,3379			
Cd	2,30001			
süre	54,6435			
Cevap	Fit	SE Fit	95% CI	95% PI
absorpsiyon	99,58	1,31	(96,89; 102,27)	(96,00; 103,16)
Kalan Cd	0,0199	0,0154	(-0,0115; 0,0514)	(-0,0219; 0,0618)
Cd alımı	14585	2624	(9219; 19951)	(7443; 21728)



Şekil 4.8. Girdi değişkenlerinin çıktı değişkenleri ile ilişkisi

5. TARTIŞMALAR, SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Tartışma ve sonuçlar

Çevresel kirlilik hızlı sanayileşme ve çeşitli insan faaliyetleri nedeniyle günümüzde belirgin bir şekilde artmakta olup, canlılar için endişe verici bir hale gelmektedir. Canlıların yaşamakta olduğu ortam onların sağlığı ve yaşamın sürdürülebilirliği açısından büyük önem arz etmektedir, dolayısıyla eski zamanlardan beri çevrenin temiz tutulması gerektiği vurgulanmaktadır. Çevresel kirliliğin bir kısmına kolay müdahale edilebiliyorken, kalan diğer kısım genellikle ağır metal kaynaklı olup, daha farklı çözüm yöntemleri gerektirmektedir. Tez içerisinde çevre kirliliğine karşı düşük maliyetli, kolay uygulanabilme özelliğine sahip, çevre dostu ve birçok araştırmacı tarafından kabul görmüş olan, metallerle kirlenmiş su veya toprak içeriğini biyolojik bir şekilde iyileştirmeyi amaçlayan fitoremediasyon yöntemi kullanılacaktır. Akuatik bitkilerin son zamanlarda kullanım alanının artması ile birlikte, akuatik bir bitki olan *C. demersum*' un fitoremediasyon için uygulanılabilirliği incelenmiştir.

Su bitkileri genelde akuatik ortamında bulunduğu için temin etmek zordur ve doğal akuatik ortamında kontaminasyon da yüksek olabileceği için fitoremediasyon çalışmaları için bitkileri temin etmek uygun değildir. İkinci sorun ise yeterli miktarda ve zamanda bitki bulmaktır. Bu tip sorunları ortadan kaldırması için doku kültür çalışmaları ile elde edilen bitkiler kullanılmaya tercih edilebilir ve son zamanlarda birçok bitkilerde kullanılmıştır (Dogan ve ark., 2015).

Ceratophyllum demersum L. bitkisi su ortamındaki farklı kaynaklardan oluşan ve biriken kirli maddelerin temizlenmesi veya azaltılması için kullanılan en önemli bitkilerden birisidir. Şimdiye kadar, birçok ağır metaller, organik, inorganik ve radyoaktif elementler veya kimyasal maddelerin temizlenmesi için kullanılmıştır (Vacula ve ark., 2020). Ağır metaller üzerinde yapılan çalışmalar incelendiğinde en fazla Cd (Dogan ve ark., 2018; Jiang ve ark., 2018; Maleva ve ark., 2018; Polechonska ve ark., 2018), Cr (Fagbote ve ark., 2013; Ahmad ve ark., 2016; Dogan ve ark., 2018; Jiang ve ark., 2018; Maleva ve ark., 2018; Polechonska ve ark., 2018), Zn (Fawzy ve ark., 2012; Kastratovic ve ark., 2014; Chen ve ark., 2015; Ahmad ve ark., 2016; Polechonska ve ark., 2018; Johnson ve ark., 2019), Pb (Ahmad ve ark., 2016; Adnan ve ark., 2017; Dogan ve ark., 2018; Jiang ve ark., 2018; Polechonska ve ark., 2018; Johnson ve ark., 2019) ve Cu (Kastratovic ve ark., 2014; Ahmed ve ark., 2018; Maleva ve ark., 2018; Polechonska ve ark., 2018) gibi ağır metallere karşı fitoremediasyon çalışmaları yapılmıştır.

Bu tez kapsamında fitoremediasyon için ağır metal olarak Cd kullanılmıştır. Cd insan, hayvan, bitki ve çevre için çok zararlıdır (Benavides ve ark., 2005; Nagajyoti ve ark., 2010; EFSA, 2012). Bu çalışmada Cd Tuzu olarak $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ kullanılmıştır. Cd üzerinde yapılan fitoremediasyon çalışmalarda farklı Cd tuzu olarak Cd ($CdCl_2 \cdot H_2O$), Cd ($CdCl_2$), ve ($Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$) kullanılmıştır (Mechora ve ark., 2011; Dogan ve ark., 2018). Bu çalışmalar incelendiğinde farklı oranda Cd tuzu kullanılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde Cd tuzu tipi ve oranının fitoremediasyonda önemli olduğu tespit edilmiştir (Khare ve ark., 2009; Dogan ve ark., 2018). Sonuçlara bakıldığında Cd oranının tek olarak incelendiğinde tüm faktörlerine istatistiksel olarak önemli etkileşim gözlemlenmiştir. Ancak, NP ile Cd oranı her hangi bir etkileşim göstermezken, Cd ile süre arasında etkileşim istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. *C. demersum* bitkisinde fitoremediasyon için Cd \times süre etkileşiminin önemli olduğunu tespit edilmiştir (Doğan ve ark. 2018; Aasim ve ark. 2020).

Tez kapsamında fitoremediasyon için üç farklı faktör (NP, Cd oranı ve süre) incelenmiştir. Nanopartiküller, son zamanlarda birçok alanda yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır. Fitoremediasyon için yapılan çalışmalar incelendiğinde birçok bitkide farklı ağır metallere karşı başarı ile kullanılmıştır (Feizi ve ark., 2013; Gill, 2014). Sonuçlar incelendiğinde NP'lerin tipi, oranı, boyutu vb. özelliklerinin fitoremediasyonu etkilediği gözlemlenmiştir. Bu tez kapsamında NPler ile fitoremediasyon arasında önemli bir etkileşim olduğu tespit edilmiştir. Tek TiO_2 NPler incelendiğinde bitki tarafından alınan Cd miktarı etkilenmezken, suda kalan Cd miktarı ve absorpsiyon yüzdesinin etkilendiği tespit edilmiştir. Buna karşı, NP'lerin Cd oranı ile süre etkileşim incelendiğinde ters sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin, NP \times Cd kombinasyonu bitki tarafından alınan Cd miktarını etkilerken, suda kalan Cd miktarı ve absorpsiyon yüzdesinin etkilenmediği tespit edilmiştir.

Son olarak, tez kapsamında RSM programı ile contour plot, surface plot ile çoklu yanıt tahmini yapılmıştır. RSM modeli deneme yapmadan bilgisayar programı ile verilen input faktörler dikkate alınarak deneme tasarlar. Böylece deneme yaptıktan sonra, bu veriler önceden hazırlanan RSM programını girdiğinde sonuçlar hesaplanır. RSM programı optimizasyon için kullanılan bir program olup, mühendislik alanında yaygın olarak kullanılan bir programdır. Ancak, Biyoteknoloji veya çevre alanında da yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır. Özellikle, son zamanlarda fitoremediasyon çalışmalarının optimizasyonu için kullanılmıştır (Jaskulak ve ark., 2019; Mohammadi ve ark., 2019). RSM programı kullanımının diğer avantajı eşyükselti ve 3-D yüzey grafiği oluşturmasıdır. Her iki grafikte denemenin performansının değerlendirilmesi ve girdi ile çıktı arasındaki etkileşimin incelenmesi için kullanılmaktadır. Bu grafikler ile NP \times Cd, NP \times süre ile Cd \times süre arasında ki etkileşim gözlemlenmiştir (Jaskulak

ve ark., 2019). RSM programının bir diğerk avantajı ise çoklu girdilerin tahmin etmesidir. Bu sistem ile hedef, maksimum, veya minimum verileri girerek çıktı faktörleri için tek veya birden fazla kombinasyon ile optimizasyon yapılmaktadır. Bu tez kapsamında, maksimum hedefler seçilerek RSM programı ile NP, Cd, ve süre oranları elde edilmiştir.

5.2 Öneriler

Yaptığımız çalışma kapsamında doku kültürü tekniğiyle çoğaltmak için kullandığımız akuatik *C. demersum* bitkisinin in vitro koşullarda hızlı ve çok sayıda rejenerasyonunun sağlanabileceği ve mevsime bağılı olmaksızın sürekli bitki materyali oluşturulabildiği görülmüştür.

Araştırmamız kapsamında *C. demersum* bulunduğu ortamdan sürgünleri vasıtasıyla yüksek miktarda ağır metal biriktirme özelliği gösterdiği için, ağır metal içeriği fazla olan dış ortamda sayıca fazla yetiştirildiği durumda kendiliğinden bozunması mümkün olmayan ağır metallerde azalma olacaktır. Fakat ağır metallerin bitki tarafından akümülasyonu sağlandıktan sonra bertaraf edilmez ise uygulanan yöntem boşa gitmiş olup ağır metaller doğaya tekrar dönecektir. Bertaraf işlemleri düzgünce yapıldığı takdirde endüstriyel atık suların arıtılmasında verimli bir sistem haline getirilebilir. *C. demersum* bitkisi süs bitkisi olarakta kullanıldığından akvaryumlarda değerlendirilmesi akvaryum bitkileri üreticilerine kolaylık sağlayacaktır.

Tez kapsamında *C. demersum* farklı konsantrasyonlarda Cd ağırmetaline maruz bırakılmış ve fitoremediasyon çalışılmıştır fakat farklı konsantrasyonlarda NPler kullanıldığında fitoremediasyon çalışmalarının ne yönde değişiklik göstereceğini veya farklı türde bitkiler kullanıldığında fitoremediasyon üzerine ne gibi veriler elde edileceğini literatüre kazandırmak önemlidir.

6. KAYNAKLAR

- Aasim, M., Aydın, S., Karataş M., Aydın, ME., Soğukpınar, C. and Sevinc, C., 2020, Bioaccumulation potential of In vitro regenerated plants of *Ceratophyllum demersum* L. against Chromium - A lab study, *Asian, J. Agric. Biol.* 8 (3), 233-239.
- Abbas, T., Rizwan, M., Ali, S., Adrees, M., Zia-ur-Rehman, M., Qayyum, M.F., Ok, Y.S., Murtaza, G., 2017, Effect of biochar on alleviation of cadmium toxicity in wheat (*Triticum aestivum* L.) grown on Cd-contaminated saline soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 25668–25680.
- Abdel-Wahab, D. A., Othman, N. A. R. M. and Hamada, A. M., 2019, Effects of copper oxide nanoparticles to *Solanum nigrum* and its potential for phytoremediation, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 137, 525-539.
- Abu, T. A. 2015, “A review: Aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* L. (Ceratophyllaceae): Plant profile, phytochemistry and medicinal properties,” *International Journal of Science and Research* 6(7), 394-399.
- Adnan H., Afaj, Abd J. Jassim, Muhand M. Noori & Christoph Schüth 2017, Effects of lead toxicity on the total chlorophyll content and growth changes of the aquatic plant *Ceratophyllum demersum* L., *International Journal of Environmental Studies*, 74(1), 119-128.
- Ahmad S. S., Reshi Z. A., Shah M. A., Rashid I., Ara R., Andrabi S. M. A. 2016, Heavy metal accumulation in the leaves of *Potamogeton natans* and *Ceratophyllum demersum* in a Himalayan RAMSAR site: management implications. *Wetlands Ecology and Management*, 24(4), 469–475.
- Ahmed, Z. F.; Ameer, Q. A. A.; Abbas, R. F. Knowing of Accumulation Capacity of [Ceratophyllum Demersum L. and Hydrilla Verticillata Plant] When One Plant Is Used to Remove the Copper Element in a Laboratory-Contaminated Water-Polluting Ecosystem. *Current Research in Microbiology and Biotechnology* 2018, 6 (1), 1501–1505.
- Akın B, Bingöl NA. 2019, Heavy Metal Accumulation in Wetland Plants and Water-Sediment Relationship in Köprüören-Kütahya. *LimnoFish.* 5(2), 76-82.
- Ali, H., et al., 2013, Phytoremediation of heavy metals, concepts and applications, *Chemosphere*, 91, 869-881.
- Al-thahaibawi B.m.h., 2021, Preliminary Assessment of Several Heavy Metal Ions (Fe, Cu, Ni, Zn, Cr, Pb, and Cd) in Water, Sediment, *Ceratophyllum demersum* L., and *Potamogeton pectinatus* L. Plants from Marsh Al-Hawizeh. *Journal of Water and Environment Technology*, 19(4), 185-197.
- Anand S., Bharti S.K., Kumar S., Barman S.C., Kumar N. 2019, Phytoremediation of heavy metals and pesticides present in water using aquatic macrophytes, in: N. Arora, N. Kumar (Eds.), *Phyto Rhizo Remediat. Microorg. Sustain.*, Springer, Singapore, 2019, pp. 89–119.

- Andreotti, F., et al., 2015, Interactions between salt marsh plants and Cu nanoparticles: effects on metal uptake and phytoremediation processes, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 120, 303-309.
- Asztemborska, M., Steborowski, R., Kowalska, J. and Bystrzejewska-Piotrowska, G., 2015, Accumulation of Platinum Nanoparticles by *Sinapis alba* and *Lepidium sativum* Plants. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226 (4).
- Benavides, M.P., Gallego, S.M., Tomaro, M.L., 2005, Cadmium toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 17 (1), 21–34.
- Bradl, H.B. 2005, *Heavy metals in environment*. 1st ed., Elsevier, UK.
- Bulak, P., et al., 2014, Plant growth regulators: assisted phytoextraction, *Biol. Plant.*, 150, 58.
- Bundschuh, M., Filser, J., Lüderwald, S., McKee, M. S., Metreveli, G., Schaumann, G. E., Wagner, S., 2018, Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to?, *Environmental Sciences Europe*, 30 (1).
- Hu, C., Shui, B., Yang, X., Wang, L., Dong, J., Zhang, X., 2021. Trophic transfer of heavy metals through aquatic food web in a seagrass ecosystem of Swan Lagoon, China. *Sci. Total Environ.* 762, 143139.
- Cao, Q., Liu, W., Gu, Y., Xie, L., Jiang, W., Gao, Y., Yang, L., 2020, Synergetic enhancement toxicity of copper, cadmium and microcystin-LR to the *Ceratophyllum demersum* L. *Toxicon* 186, 151–159.
- Chen, M.; Zhang, L. L.; Li, J.; He, X. J.; Cai, J. C. 2015, Bioaccumulation and Tolerance Characteristics of a Submerged Plant (*Ceratophyllum demersum* L.) Exposed to Toxic Metal Lead. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 122, 313–321
- Cosio, C., et al., 2014, Effects of macrophytes on the fate of mercury in aquatic systems, *Environ. Toxicol. Chem.*, 33, 1225-1237.
- Çınar G., Doğan M., Sevindik M. 2020, Bioaccumulation of Chromium and Nickel Applied to Single and Binary for a Short Time in *Ceratophyllum demersum* L., a Rootless Aquatic Macrophyte. *AgroLife Scientific Journal*, 9(2), 77-81.
- Dogan M., Akgul H., Inan O.G., Zeren H. 2015, Determination of cadmium accumulation capabilities of aquatic macrophytes *Ceratophyllum demersum* L., *Bacopa monnieri* (L.) Pennell. and *Rotala rotundifolia* (Buch.-Ham. ex Roxb.). *Iranian Journal Fisheries Sciences* 14(4), 1010-1017.
- Dogan, M., Karataş, M. and Aasim, M., 2018, Cadmium and lead bioaccumulation potentials of an aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* L.: A laboratory study, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148, 431-440.
- Doğan M, Karataş M, Aasim M 2018, In vitro Koşullarda *Ceratophyllum demersum* L.'un Krom (III) Akümülyasyonunun Araştırılması. *KSÜ Tarım ve Doğa Derg* 21(3): 277-285.

- Domingo, G., Bracale, M. and Vannini, C., 2019, Phytotoxicity of Silver Nanoparticles to Aquatic Plants, Algae, and Microorganisms, *Nanomaterials in Plants, Algae and Microorganisms*, 143-168.
- EFSA. 2012, Cadmium dietary exposure in the European population. *Efsa J.* 10:2551.
- Eze, V. C. and Harvey, A. P., 2018, Extractive recovery and valorisation of arsenic from contaminated soil through phytoremediation using *Pteris cretica* L., *Chemosphere*, 208, 484-492.
- Fagbote, O. E. and Olanipekun, E. O. 2013. Evaluation of the status of heavy metal pollution of water (Surface and Ground) and aquatic Macrophyte (*Ceratophyllum demersum* L.) of Agbabu Bitumen Deposit Area, Nigeria. *British Journal of Applied Science & Technology* 3(2): 289-306.
- Farhood, Afaq T. 2017. Bioaccumulation of some heavy metals in two type of aquatic plant in Euphrates River in Thi-Qar province, southern of Iraq, *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 4(09):131-134.
- Fawzy, M.; El-Khatib, A.; Badr, N.; Abo-El-Kasem, A.; Rocher-Morant, J.; Basterrechea-Chertudi, DA. 2019, *Ceratophyllum demersum* L. as Phytoindicator and Potential Phytoremediator of Lead Under Hydroponic Conditions. *IARIA XPS Press*. 20-26.
- Fawzy, M.A., Badr, N.E.S., El-Khatib, A., Abo-El-Kassem, A., 2012, Heavy metal biomonitoring and phytoremediation potentialities of aquatic macrophytes in River Nile. *Environ. Monit. Assess.* 184, 1753–1771.
- Feizi, H., Amirmoradi, S., Abdollahi, F., Pour, S. J., 2013, Comparative Effects of Nanosized and Bulk Titanium Dioxide Concentrations on Medicinal Plant *Salvia officinalis* L., *Annu. Review & Res. in Biol.*, 3 (4), 814-824.
- Gałczyńska, M.; Mańkowska, N.; Milke, J.; Buśko, M. 2019, Possibilities and limitations of using *Lemna minor* L., *Hydrocharis morsus-ranae* L. and *Ceratophyllum demersum* L. in removing metals with contaminated water. *J. Water Land Dev.* 40, 161–173.
- Gill, M., 2014, Phytoremediation: green technology to clean the environment. *Int. J.* 2, 879–886.
- Golabi M, Shokripour H, Moazed H, Haghghi N. J. 2019, Investigation of biosorption on *Ceratophyllum demersum* L. biomass: removal of cadmium(II) from aqueous solution. *Desalination and Water Treatment* 157, 118–128.
- Gomes, M. A. Da., C., Hauser-Davis, R. A., de Souza, A. N. and Vitória, A. P., 2016, Metal phytoremediation: General strategies, genetically modified plants and applications in metal nanoparticle contamination, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 134, 133-147.
- Gümüş, N. E. , Aşikkutlu, B. , Keskinaya, H. B. & Akköz, C. 2021. Comparison Of Heavy Metal Absorption Of Some Algae Isolated From Altınapa Dam Lake (Konya) . *Journal*

of Anatolian Environmental and Animal Sciences, 6(1), 50-56. DOI: 10.35229/jaes.809876

- Graneli, W. and Solander, D. 1986, Influence of aquatic macrophytes on phosphorus cycling in lake. *Hydrobiol.*, 170, 245-366.
- Haider, F.U.; Liqun, C.; Coulter, J.A.; Cheema, S.A.; Wu, J.; Zhang, R.; Wenjun, M.; Farooq, M. 2021, Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 211, 111887.
- Hassoon, H. A. 2015, The Adsorption of Some Trace Heavy Metals from Aqueous Solution Using Non Living Biomass of Sub Merged Aquatic Plant *Ceratophyllum demersum* L.. *Iraqi. J. Sci.* 56 (4A), 2822-2828.
- Jamnická, G, Hrivnák, R, Otahelová, H, Skoršepa, M & Valachovic, M 2006, Heavy metals content in aquatic plant species from some aquatic biotopes in Slovakia, In: *Proceedings 36th International*
- Jaskulak, M., Grobelak, A., Grosser, A., Vandenbulcke, F., 2019. Gene expression, DNA damage, and other stress markers in *Sinapis alba* L. exposed to Potentially toxic elements with special reference to sewage sludge application on contaminated sites. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 181, 508–517.
- Jawad MM, Abed EH, Oudah HK. 2018, Using of *Ceratophyllum demersum* L. for lead and cadmium pollution removal by columns technology. *J Bacteriol Mycol Open Access.* 6(1), 19-21.
- Jiang, B., Xing, Y., Zhang, B., Cai, R., Zhang, D., & Sun, G. 2018, Effective Phytoremediation of Low-Level Heavy Metals by Native Macrophytes in a Vanadium Mining Area, China. *Environmental Science and Pollution Research.* 25(31): 31272–31282.
- Johnson, M. E., Ostroumov, S. A., Tyson, J. F. and Xing, B., 2011, Study of the interactions between *Elodea canadensis* Michx. and CuO nanoparticles, *Russian Journal of General Chemistry*, 81 (13), 2688-2693.
- Johnson, U. E.; Adeogun, B. K.; Ugya, A. Y. 2019, Efficacy of Aquatic Plants in Industrial Effluent Treatment Using Vertical Subsurface Flow Constructed Wetland: Studies on *Ceratophyllum demersum* L., *Ludwigia Abyssinica* and *Hydrolea Glabra*. *Annals of the Faculty of Engineering Hunedoara* 17 (1), 213–217.
- Juhel, G., Batisse, E., Hugues, Q., Daly, D., van Pelt F.N.A.M., O'Halloran J., Jansen M.A.K., 2011, Alumina nanoparticles enhance growth of *Lemna minor* L., *Aquat. Toxicol.*, 105, 328-336.
- Kastratovic, V.; Krivokapic, S.; Bigovic, M.; Djurovic, D.; Blagojevic, N. 2014, Bioaccumulation and Translocation of Heavy Metals by *Ceratophyllum demersum* L. from Skadar Lake, Montenegro. *J. Serb. Chem. Soc.* 79 (11), 1445–1460.

- Keskinkan O., Goksu M.Z.L., Basibuyuka M., Forster C.F. 2004, Heavy Metal Adsorption Properties of a Submerged Aquatic Plant (*Ceratophyllum demersum* L.), Bioresource Technology, Elsevier Ltd, (92): 197-200.
- Khaleel, H.A., Jawad, H.J. & A. Alrufaye, Z.T. 2022, Genotoxic effect of heavy metals on *Ceratophyllum demersum* L. using RAPD markers. Iranian Journal of Ichthyology 9(ICAB Special issue 2022): 46-53.
- Khare, A. 2009, Thiol Metabolism Play Significant Role during Cadmium Detoxification by *Ceratophyllum demersum* L. Bioresour. Technol. 100 (7), 2155–2161.
- Khalifa, F. K. and Alkhalif, M. I., 2018, Phytoremediation as a Cleansing Tool for Nanoparticles and Pharmaceutical Wastes Toxicity, Phytoremediation, 453-464.
- Kibria, G. (2016). Trace metals/heavy metals and its impact on environment, biodiversity and human health-A short review. 5p. DOI: 10.13140/RG.2.1.3102.2568.
- Kubier, A.; Wilkin, R.T.; Pichler, T. 2019, Cadmium in soils and groundwater: A review. Appl. Geochem. 108, 104388.
- Larue, C., Laurette, J., Herlin-Boime, N., Khodja H., Fayard B., Flank A.M., Brisset F., Carriere M., 2012, Accumulation, translocation and impact of TiO₂ nanoparticles in wheat *Triticum aestivum* spp.: influence of diameter and crystal phase, Sci. Total Environ., 431, 197-208.
- Mahendra K Trivedi, Alice B, Dahryn T, Gopal N, Khemraj B, Jana S, 2015, Physical, Thermal, and Spectroscopic Characterization of Biofield Energy Treated Murashige and Skoog Plant Cell Culture Media. Cell Biology, Science Publishing Group, 3 (4), 50-57.
- Mahmoud, K.M.A.; Mahmoud, H.A.; Sayed, S.S.M. 2018, Potential role of *Ceratophyllum demersum* L. in bioaccumulation and tolerance of some heavy metals. EJABF, 22, 1–12.
- Maleva, M.; Borisova, G.; Chukina, N.; Kumar, A. 2018, Urea Increased Nickel and Copper Accumulation in the Leaves of *Egeria Densa* (Planch.) Casp. and *Ceratophyllum demersum* L. during Short-Term Exposure. *Ecotoxicology and environmental safety* 148, 152–159.
- Manceau, A., Nagy, K. L., Marcus, M. A., Lanson, M., Geoffroy, N., Jacquet, T. and Kirpichtchikova, T., 2008, Formation of Metallic Copper Nanoparticles at the Soil-Root Interface, Environmental Science & Technology, 42 (5), 1766-1772.
- Marusenko, Y., Shipp, J., Hamilton, G. A., Morgan, J. L. L., Keebaugh, M., Hill, H., Dutta, A., Zhuo, X., Upadhyay, N., Hutchings, J., Herckes, P., Anbar, A. D., Shock, E., Hartnett, H. E., 2013, Bioavailability of nanoparticulate hematite to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., Environ. Pollut., 174, 150-156.
- Mechora, S.; Cuderman, P.; Stibilj, V.; Germ, M. 2011, Distribution of Se and Its Species in *Myriophyllum spicatum* L. and *Ceratophyllum demersum* L. Growing in Water Containing Se (VI). Chemosphere 84 (11), 1636–1641.

- Mohammadi, F., Samaei, M. R., Azhdarpoor, A., Teiri, H., Badeenezhad, A., Rostami, S., 2019. Modeling and Optimizing Pyrene Removal from the Soil by Phytoremediation using Response Surface Methodology, Artificial Neural Networks, and Genetic Algorithm. *Chemosphere*. 237, 124486.
- Nagajyoti, P.C., Lee, K.D., Sreekanth, T.V.M., 2010, Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ. Chem. Lett.* 8, 199–216.
- Olawusi-Peters, O.O. 2021, Evaluation of Water Quality and Heavy Metal Pollution in the Shoots and Roots of Aquatic Plants. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 21, 443-450.
- Outa JO, Kowenje CO, Plessl C 2020, Distribution of arsenic, silver, cadmium, lead and other trace elements in water, sediment and macrophytes in the Kenyan part of Lake Victoria: spatial, temporal and bioindicative aspects. *Environ Sci Pollut Res* 27, 1485–1498
- P. Teymouri P, N. Jaafarzadeh, A. Mostoufi, H. Amiri, N. Alavi, M. Dinarvand, M. Ahmadi, 2017, Effect of pretreatment on *Ceratophyllum demersum* L. for enhanced biosorption of Cr (VI) and Cd (II). *Environ. Eng. Manag. J.* 16(2), 459-469.
- Parnian, A., Chorom, M., Jaafarzadeh, N., & Dinarvand, M. 2016, Use of two aquatic macrophytes for the removal of heavy metals from synthetic medium. *Ecology and Hydrobiology*, 16, 194–200.
- Pilon-Smits, E., 2005, Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, 56 (1), 15-39.
- Pokhrel, L. R., Dubey, B., 2013, Evaluation of developmental responses of two crop plants exposed to silver and zinc oxide nanoparticles, *Sci. Tot. Environ.*, 452-453 321-332.
- Polechonska L, Klink A, Dambiec M and Rudecki A, 2018, Evaluation of *Ceratophyllum demersum* L. as the accumulative bioindicator for trace metals. *Ecol. Indic.* 93, 274-281.
- Pratyush Kumar Das, 2018, Phytoremediation and Nanoremediation: Emerging Techniques for Treatment of Acid Mine Drainage Water, *Defence Life Science Journal* pp. Vol. 3, No. 2, 190-196.
- Rai, M., Yadav, A. and Gade, A., 2008, Current Trends in Phytosynthesis of Metal Nanoparticles, *CRC 675, Critical Reviews in Biotechnology*, 28 (4), 277-284.
- Rai, P. K., Kumar, V., Lee, S., Raza, N., Kim, K. H., Ok, Y. S., et al. 2018, Nanoparticle-plant interaction: implications in energy, environment, and agriculture. *Environ. Int.* 119, 1–19.
- Remédios, C., Rosário, F. and Bastos, V., 2012, Environmental Nanoparticles Interactions with Plants: Morphological, Physiological, and Genotoxic Aspects. *Journal of Botany*, 1-8.
- Romeh, A. A. A., 2018, Green Silver Nanoparticles for Enhancing the Phytoremediation of Soil and Water Contaminated by Fipronil and Degradation Products, *Water, Air, & Soil Pollution*, 229 (5).

- Sterckeman, T., and Thomine, S. 2020, Mechanisms of Cadmium accumulation in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 39, 322–359.
- Syed, I., Fatima, H., Mohammed, A., and Siddiqui, M. A. 2018, "*Ceratophyllum demersum* L. a free-floating aquatic plant: A review," *Indian journal of Pharmaceutical and Biological Research* 6(2), 10-17.
- Vacula, J.; Komínková, D.; Pecharová, E.; Doksanská, T.; Pechar, L. 2020, Uptake of ¹³³Cs and ¹³⁴Cs by *Ceratophyllum demersum* L. under field and greenhouse conditions. *Sci. Total. Environ.* 720, 137292.
- Wang ZX, Yao L, Liu GH, Liu WZ 2014, Heavy metals in water, sediments and submerged macrophytes in ponds around the Dianchi Lake, China. *Ecotoxicol Environ Saf* 107:200–206.
- Wang, J., et al., 2012, Remediation of mercury contaminated sites: a review. *J. Hazard. Mater.* 221, 1-18.
- Wani, R.A., Ganai, B.A., Shah, M.A., Uqab, B., 2017, Heavy Metal Uptake Potential of Aquatic Plants through Phytoremediation Technique - A Review. *Journal of Bioremediation & Biodegradation* 8 (4), 100404.
- Yaseen, F. H., AL-Azawey, A. S. N. 2021, Treatment of some contaminants of waste water by using *Ceratophyllum demersum* L.. *Plant Archives* 21(1), 1658-1664.
- Zayed, A., Gowthaman, S., & Terry, N. (1998). Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: I. Duckweed (Vol. 27, No. 3, pp. 715-721). American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America.
- Zena, F.A.; Qusay, A.A.A.; Rana, F.A.; Saad, H.K. 2018, Knowing of accumulation capacity of [*Ceratophyllum demersum* L. and *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle plant] when one plant is used to remove the copper element in a laboratory-contaminated water-polluting ecosystem. *Curr. Res. Microbiol. Biotechnol.* 6(1), 1501–1505.