

**T.C.
NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TATLI SU EĞRELTİSİ *Azolla filiculoides* Lam.
KULLANILARAK AĞIR METALLERİN
FİTOREMEDİASYONU**

**Tezi Hazırlayan
Yahya LEBLEBİCİ**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK**

**Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**OCAK 2018
NEVŞEHİR**

**T.C.
NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TATLI SU EĞRELTİSİ *Azolla filiculoides* Lam.
KULLANILARAK AĞIR METALLERİN
FİTOREMEDİASYONU**

**Tezi Hazırlayan
Yahya LEBLEBİCİ**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK**

**Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**OCAK 2018
NEVŞEHİR**

Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK danışmanlığında **Yahya LEBLEBİCİ** tarafından hazırlanan “**Tatlı Su Eğreltisi *Azolla filiculoides* Lam. Kullanılarak Ağır Metallerin Fitoremediasyonu**” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

2601/2018

JÜRİ

Başkan :Prof. Dr. Serkan YILMAZ



Üye :Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK



Üye : Ydr. Doç. Dr. Musa KAR



ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun **02/02/2018**..tarih ve..**05-44**.... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

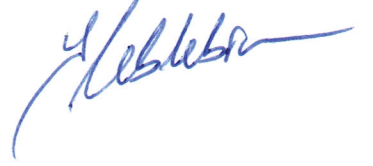
9/2/2018
Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK
Enstitü Müdürü



TEZ BİLDİRİM SAYFASI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada yer alan bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu ve bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Yahya LEBLEBİCİ



TEŞEKKÜR

Daniőmanlıęımı yürüten, tez çalıőmasının seçiminde, bu çalışmada nasıl bir yol izlemem gerektiği konusunda yardımcı olan, lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve önerileri ile beni yönlendiren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK'e teőekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalıőmalarım sırasında bilgi ve tecrübeleriyle her daim destek olan, bana her konuda yardım eden Sayın Arő. Gör. Ezgi KESKİN'e ve Uzman Enver ANDEDEN'e teőekkürlerimi sunarım.

Her zaman manevi desteğiyle yardımcı olan, değerli bilgilerini benimle paylaőan ve tecrübelerinden yararlandığım eőim Doç. Dr. Zeliha LEBLEBİCİ' ye teőekkürlerimi sunarım.

Tez çalıőmam sırasında duyarlılıkları, hoőgörü ve sabırlarıyla yanımda olan oğlum Ahmet Buğrahan ve kızım Ülkü Miray'a teőekkürü borç bilirim.

**TATLI SU EĞRELTİSİ *Azolla filiculoides* Lam. KULLANILARAK
AĞIRMETALLERİN FİTOREMEDİASYONU**

(Yüksek Lisans Tez)

Yahya LEBLEBİCİ

**NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Ocak 2018

ÖZET

Sucul ortamlarda oluşan ağır metal kirliliği neticesinde, bu alanda yaşayan canlılarda ağır metaller birikimi ve toksik etki meydana gelebilir. Çalışmamızda farklı konsantrasyonlardaki Arsenik (As), Kurşun (Pb), Nikel (Ni) ve Kadmiyum (Cd) ağır metallerinin 8 günlük periyotta *Azolla filiculoides* bitkisinde meydana getirdikleri bazı fizyolojik ve morfolojik değişiklikler araştırılmıştır.

Çalışmamızda ağır metal uygulanan bitki örneklerinde büyüme oranları (RGR), ve lipid peroksidasyonu markeri malondialdehit (MDA) tayin edilmiştir. Ağır metal içeriklerini tespit etmek için mikrodalga numune hazırlama cihazında örnekler çözülerek, element miktarları ICP-MS cihazında belirlenmiştir.

Aynı zamanda *Azolla filiculoides* bitkisinin antioksidan aktiviteleri DPPH radikali indirgemesi, metal iyonları şelatlama ve total fenol miktarı metotları ile belirlenmiştir.

Sonuçlar değerlendirildiğinde ağır metal konsantrasyonu arttıkça bitkinin akümülyasyon miktarının arttığı, en yüksek akümülyasyonun As 50 mg l⁻¹'lik konsantrasyonda (103763 µgg⁻¹) olduğu tespit edilmiştir. Bitkiye uygulanan ağır metal konsantrasyonu arttıkça tüm örneklerde büyüme oranının azaldığı, belirlenmiştir. MDA ağır metal konsantrasyonu arttıkça strese bağlı olarak artış göstermiştir. As kontrol örneğinde MDA miktarı 3,143 nmol/g iken 50 mg l⁻¹'lik konsantrasyonda 8,015 nmol/g bulunmuştur.

Bitkinin DPPH radikali indirgemesi incelendiğinde; 1 mg ml⁻¹ konsantrasyonda *A. filiculoides* ortamdaki serbest radikali %100 oranında temizlerken, aynı konsantrasyonda BHA %80, α-tocopherol %74 ve BHT %68 oranında temizlemiştir.

1 mg ml⁻¹ konsantrasyonda *A. filiculoides* %91,35 metal şelatlama kapasitesine sahipken, aynı konsantrasyonda EDTA %94 metal şelatlama kapasitesine sahiptir.

Ayrıca *Azolla filiculoides* türünün β -karoten içeriği 0,478 $\mu\text{g mg}^{-1}$, likopen miktarı 0,074 $\mu\text{g mg}^{-1}$ ve toplam fenolik miktarına ise ortalama 367,95 $\mu\text{g mg}^{-1}$ tespit edilmiştir.

Sonuçta; ağır metallerle kirlenmiş alanlarda bitkinin, bitkisel giderim amacıyla etkili şekilde kullanılabilceği ve çalışmanın bitkisel arıtım (fiteromediasyon) çalışmalarına bu bağlamda katkı sağlayacağına inanılmaktadır.

Anahtar kelime: Ağır metal, *Azolla filiculoides*, akümülyasyon, bitkisel arıtım
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK
SayfaAdedi: 75

**PHYTOREMEDIATION OF HEAVY METALS, USING THE FRESH WATER
FERNS *Azolla filiculoides* Lam.**

(M. Sc. Thesis)

Yahya LEBLEBİCİ

**NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE**

January 2018

ABSTRACT

Because of heavy metal pollution in the aquatic environment, accumulation of heavy metals and toxic effects may occur in living organisms in this area. In Our Study, some physiological and morphological changes were investigated on different concentrations of Arsenic (As), Lead (Pb), Nickel (Ni) and Cadmium (Cd) heavy metals of *Azolla filiculoides* plant for 8 days period.

In our study, growth rates (RGR) and lipid peroxidation marker malondialdehyde (MDA) were determined in plant samples treated with heavy metals. In order to detect the heavy metal contents, the samples were dissolved in the microwave sample preparation device and the element quantities were determined in the ICP-MS device.

At the same time, antioxidant activities of *Azolla filiculoides* plant were determined by DPPH radical reduction, chelating metal ions and total phenol amount.

When the results were evaluated, it was determined that as the heavy metal concentration increased, the accumulation amount of the plant increased and the highest accumulation was at a concentration of As 50 mg l⁻¹ (103763 µgg⁻¹). It has been determined that as the heavy metal concentration applied to the plant increases, the growth rate decreases in all samples. MDA increased as the heavy metal concentration increased. As for the As control, the amount of MDA was found to be 3,143 nmol/g while it was found to be 8,015 nmol/g at the concentration of 50 mg l⁻¹.

When the plant DPPH radical reduction reviewed; *A. filiculoides* cleared the free radical in the medium by 100% at a concentration of 1 mg ml⁻¹, while at the same concentration BHA 80%, α-tocopherol 74% and BHT 68% cleared. At a concentration

of 1 mg ml⁻¹, *A. filiculoides* had a metal chelating capacity of 91.35%, while EDTA at the same concentration had a metal chelating capacity of 94%.

In addition, β -carotene content of *Azolla filiculoides* was found to be 0,478 $\mu\text{g mg}^{-1}$, lycopene amount 0.074 $\mu\text{g mg}^{-1}$, and average total phenol content was found to be 367,95 $\mu\text{g mg}^{-1}$.

Consequently; it is believed that the plant can be used effectively for the purpose of plant removal in heavy metal contaminated areas and that the study will contribute to the phytoremediation studies in this context.

Keyword: *Heavy metal, Azolla filiculoides, accumulation, phytoremediation*

Thesis Advisor: Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK

Page Number: 75

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY SAYFASI.....	i
TEZ BİLDİRİM SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	xv
BÖLÜM	1
GİRİŞ	1
2. BÖLÜM	3
GENEL BİLGİLER	3
2.1.2. Ağır Metaller Hakkında Genel Bilgi.....	3
2.1.3. Arsenik (As)	4
2.1.4. Kurşun (Pb)	6
2.1.5. Nikel (Ni)	7
2.1.6. Kadmiyum (Cd).....	7
2.2. Ağır Metallerin Bitkiler Tarafından Alınması	8
2.2.1. Pasif Alınım	8
2.2.2. Aktif Alınım.....	8
2.2.3. Kolaylaştırılmış Alınım.....	8
2.3. Akuatik Makrofitlerde Ağır Metal Translokasyonu ve Akümülasyonu	9
2.4. Bitkilerin Ağır Metallere Karşı Korunma Mekanizmaları.....	10

2.5.	Fitoremediasyon (Bitkisel Arıtım) ve Yöntemleri).....	10
2.5.1.	Fitoremediasyon Tipleri	11
2.5.1.1.	Fitoekstraksiyon (Bitkisel Özümleme)	13
2.5.1.2.	Rizofiltrasyon (Köklerle Süzme)	13
2.5.1.3.	Fitostabilizasyon (Köklerde Sabitleme).....	14
2.5.1.4.	Fitodegradasyon (Bitkisel Bozunum)	14
2.5.1.5.	Rizodegradasyon (Köklerle Bozunum).....	14
2.5.1.6.	Fitovolatilizasyon (Bitkisel Buharlaşma).....	15
2.5.2.	Fitoremediasyon Tekniğinin Avantaj ve Dezavantajları.....	16
2.6.	Antioksidan	16
2.6.1.	Antioksidanların Sınıflandırılması	17
2.6.2.	Doğal Antioksidanlar	18
2.6.2.1.	Tekoferoller.....	18
2.6.2.2.	Karotenoidler.....	19
2.6.3.	Sentetik Antioksidanlar	19
2.6.4.	Antioksidan Özelliklerin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	20
2.6.4.1.	DPPH Serbest Radikal Yakalama Aktivitesi	20
2.6.4.2.	Metal İyonlarını Şelatlama Etkisi.....	21
2.6.4.3.	Toplam Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi Yöntemi	22
2.7.	Literatür Özeti	22
3.	BÖLÜM	24
	MATERYAL VE YÖNTEM	24
3.1.	Araştırma Materyallerinin Temini	24
3.1.1.	<i>Azolla filiculoides</i> 'in Sistematigi	24
3.1.2.	<i>Azolla filiculoides</i>	25

3.2.	Yöntem.....	26
3.2.1.	Bitki Yetiştirme ve Ağır Metal Uygulaması.....	26
3.2.2.	Lipit Peroksidasyonu Analizi (MDA).....	29
3.2.3.	Ağır Metal Seviyesinin Tespiti.....	29
3.2.4.	<i>Azolla filiculoides</i> Ekstrelerinin Eldesi.....	31
3.2.5.	DPPH Radikalini Temizleme Kapasitesinin Belirlenmesi.....	31
3.2.6.	Metal İyonlarını Şeşletme Kapasitesi.....	31
3.2.7.	Toplam Fenolik İçerik Düzeylerinin Belirlenmesi.....	32
3.2.8.	β -Karoten ve Likopen İçeriğinin Belirlenmesi.....	33
3.2.9.	İstatistiksel Analizler.....	33
4.	BÖLÜM.....	34
	BULGULAR.....	34
4.1.	As Akümülıasyonu.....	34
4.1.1.	As Uygulanmış <i>Azolla filiculoides</i> Örneklerindeki Büyüme Oranı.....	35
4.1.2.	As Uygulanmış <i>Azolla filiculoides</i> Örneklerindeki Lipit Peroksidasyonu.....	35
4.2.	Pb Akümülıasyonu.....	36
4.2.1.	Pb Uygulanmış <i>Azolla filiculoides</i> Örneklerindeki Büyüme Oranı.....	36
4.2.2.	Pb Uygulanmış <i>Azolla filiculoides</i> Örneklerindeki Lipid Peroksidasyonu.....	37
4.3.	Ni Akümülıasyonu.....	38
4.3.1.	Ni Uygulanmış <i>Azolla filiculoides</i> Örneklerindeki Büyüme Oranı.....	39
4.3.2.	Ni Uygulanmış <i>Azolla filiculoides</i> Örneklerindeki Lipid Peroksidasyonu.....	40
4.4.	Cd Akümülıasyonu.....	40
4.4.1.	Cd Uygulanmış <i>Azolla filiculoides</i> Örneklerindeki Büyüme Oranı.....	41
4.4.2.	Cd Uygulanmış <i>Azolla filiculoides</i> Örneklerindeki Lipid Peroksidasyonu.....	41
4.5.	DPPH Radikali Temizlenme Kapasitesi.....	42

4.6.	Metal İyonlarını (Demir) Şelatlama Kapasitesi	43
4.7.	Biyoaktif İçerik Miktarları	44
5.	BÖLÜM	45
	SONUÇLAR VE ÖNERİLER	45
	KAYNAKLAR	52
	ÖZGEÇMİŞ	61



TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Ağır metal kaynakları.....	4
Tablo 2.2. Fitoremediasyon yönteminin genel özellikleri.....	12
Tablo 2.3. Metallerin Fitoremediasyonunda Kullanılan Bazı Bitki Türleri	15
Tablo 4.1. <i>Azolla filiculoides</i> örneklerindeki As miktarı ve standart hata değerleri	34
Tablo 4.2. <i>Azolla filiculoides</i> örneklerindeki Pb miktarı ve standart hata değerleri	37
Tablo 4.3. <i>Azolla filiculoides</i> örneklerindeki Ni miktarı ve standart hata değerleri.....	39
Tablo 4.4. <i>Azolla filiculoides</i> örneklerindeki Cd miktarı ve standart hata değerleri	41
Tablo 4.5. <i>Azolla filiculoides</i> türünden elde edilen β - karoten, likopen ve total fenolik içerik miktarı	44

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Doğada Arsenik döngüsü	6
Şekil 2.2. Tekoferollerin genel kimyasal görünümü	19
Şekil 2.3. β - karoten kimyasal formülü	19
Şekil 2.4. Bütillenmiş hidroksitoluen, Bütillenmiş hidroksianisol, Propilgallat, Tersiyerbütül hidrokinon.....	20
Şekil 2.5. DPPH radikalinin kimyasal yapısı	21
Şekil 3.1. <i>Azolla filiculoides</i>	24
Şekil 3.2. <i>Azolla filiculoides</i> 'in kültüre alındığı ortam	27
Şekil 3.3. Büyüme çemberindeki <i>Azolla filiculoides</i> örnekleri Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	28
Şekil 3.4. Mikrowave digestion system.....	30
Şekil 3.5. ICP-MS cihazı	30
Şekil 4.1. Sekiz gün sonunda As (1-50 mg L ⁻¹) uygulamasının <i>Azolla filiculoides</i> 'in büyüme oranına etkisi ve standart hata değerleri	35
Şekil 4.2. As (1-50 mg L ⁻¹) uygulanmış <i>Azolla filiculoides</i> bitkisindeki lipid peroksidasyonu miktarı ve standart hata değerleri.....	36
Şekil 4.3. Sekiz gün sonunda Pb (5-50 mg L ⁻¹) uygulamasının <i>Azolla filiculoides</i> 'in büyüme oranına etkisi ve standart hata değerleri	37
Şekil 4.4. Pb (5-50 mg L ⁻¹) uygulanmış <i>Azolla filiculoides</i> bitkisindeki lipid peroksidasyonu miktarı ve standart hata değerleri.....	38
Şekil 4.5. Sekiz gün sonunda Ni (1-20 mg L ⁻¹) uygulamasının <i>Azolla filiculoides</i> 'in büyüme oranına etkisi ve standart hata değerleri	39
Şekil 4.6. Ni (1-20 mg L ⁻¹) uygulanmış <i>Azolla filiculoides</i> bitkisindeki lipid peroksidasyonu miktarı ve standart hata değerleri.....	40

- Şekil 4.7. Sekiz gün sonunda Cd ($1-8 \text{ mg L}^{-1}$) uygulamasının *Azolla filiculoides*'in büyüme oranına etkisi ve standart hata değerleri41
- Şekil 4.8. Cd ($1-8 \text{ mg L}^{-1}$) uygulanmış *Azolla filiculoides* bitkisindeki lipid peroksidasyonu miktarı ve standart hata değerleri.....42
- Şekil 4.9. *Azolla filiculoides* türünün ve kontrollerin DPPH radikali temizleme kapasiteleri43
- Şekil 4.10. *Azolla filiculoides* türünün ve kontrollerinin metal şelatlama kapasiteleri..44



SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ

As	Arsenik
Pb	Kurşun
Cd	Kadmiyum
Ni	Nikel
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
m	Metre
ppm	Milyonda bir birim
rpm	Dakikada devir sayısı
g	Gram
kg	Kilogram
L	Litre
mg	Miligram
µg	Mikrogram
n	Tekrar sayısı
Maks	Maksimum
Min	Minimum
Ort	Ortalama
Std hata	Standart hata
ANOVA	Tekrarlı ölçümlerde Varyans Analizi
HNO ₃	Nitrik Asit
RGR	Göreceli Büyüme Oranı
ICP-MS	Endüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektroskopisi
MDA	Lipid Peroksidasyonu
TCA	Triklor Asetik Asit
TBA	Tio Barbitürik Asit
POD	Peroksidaz
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidraz
FRAP	Demir iyonlarını İndirgeme Antioksidan Kapasitesi Tayin Yöntemi

1.BÖLÜM

1.1.Giriş

İnsanlar birlikte yaşamaya başladıklarından ve toplumsal ihtiyaçlar artmaya başladığından itibaren doğayı kirleterek doğal dengeleri değiştirmeye başlamışlardır [1]. Dengelerin bozulmasında, endüstrileşme, fabrika atıkları, enerji santralleri, otomobil eksozları, tıbbi ve evsel atıklardan başlayarak tarımda kullanılan gübre ve pestisitlerde dâhil olmak üzere birçok etken sayılabilir. Tüm canlıları tehdit eden çevre kirliliğine neden olan bu bileşikler doğal döngü içerisinde havaya, toprağa, yeraltı sularına, nehirlere karışarak tüm canlıları tehdit etmektedir [2].

Kısacası insanların ihtiyaçları doğrultusunda, ekolojik dengeye etki etmesi neticesinde ekosistem de kirlilik olgusu sürekli artmaktadır. Kirlilik, ekosistem üzerinde zararlara neden olarak, canlı yaşamını olumsuz etkileyebilecek olan kirlетici faktörlerin doğal döngüye girişı ve doğal çevre de yüksek miktarlarda birikmesi şeklinde açıklanabilir [3].

İnsan faaliyetleri sonucunda da çevreye bırakılan organik ve inorganik bileşiklerin çoğu önemli çevresel sorunları meydana getirmektedir. Kalıcı özellikteki toksik kirlетiciler, insan sağlığına, tarımsal verimliliğe ve çevreye ciddi zararlar vermektedir. Endüstriyel aktiviteler nedeni ile doğadaki ağır metal birikmesi önemli bir sorun haline gelmiştir. Gübre kullanımı, sanayi atıkları, madencilik atıkları, lağım ve kentsel atıklar sonucunda çevrede Zn, Cd, Pb ve Cu gibi ağır metaller birikmektedir [4].

Bitkiler tarafından sucul ortamlarda ve toprakta biriken ağır metaller alınarak bitkilerin vejetatif ve generatif organlarının gelişimine ve bitkinin büyümesine negatif etki etmektedir. Ayrıca bitkilerde su taşınımı, terleme, fotosentez, enzim metabolizması, protein sentezi, membran stabilitesi ve çimlenme gibi çoğu fizyolojik olayın da olumsuz olarak etkilenmesine sebep oluşturmaktadır [5, 6].

Çevresel kirlenmenin ekosistemde artması sonucunda bunların doğadan uzaklaştırılabilmesi için çalışmalar yapılarak teknikler geliştirilmesini bir zorunluluk haline getirmiştir [7].

Çevresel kirliliğin ortadan kaldırılması için geliştirilen tekniklerden biri olan biyoremediasyon; bitki, bakteri, alg gibi canlı organizmalar kullanılarak kirliliğin temizlenmesini amaçlamaktadır. Biyoremediasyon türü olan fitoremediasyon; kirletilmiş su, toprak ve havanın temizlenmesi için bitkilerin kullanıldığı bir yöntemdir [8, 9].

Fitoremediasyon tekniği, düşük maliyetli ve biyolojik alt yapılı olması sebebiyle kirlenmiş su ve topraklardan kirletici maddelerin bertaraf edilmesinde kullanılan bir tekniktir. Toprağın ve suyun temizlenmesinde kullanılan bazı güncel teknikler, ortamdaki canlı aktivitesini bitirebilmekte ve bitki gelişimini negatif etkileyecek bir ortam oluşmasına neden olmaktadır. Fitoremediasyon ise su ve topraktaki canlı aktivitesini ve fiziksel yapısını koruyan bir tekniktir [10].

Çalışmamızda, *Azolla filiculoides* bitkisine değişik yoğunluklarda uygulanan As, Ni, Pb ve Cd gibi ağır metallerin lipit peroksidasyonu ve göreceli büyüme oranına ve etkisi incelenmiş ve bitkinin ağır metal depolama miktarı tartışılmıştır. Ayrıca bitkinin antioksidan aktivitesi DPPH radikali indirgenmesi, metal iyonları şelatlama ve total fenol miktarı metotları ile belirlenmiştir. *Azolla filiculoides* bitkisinin biyoakümülyasyon yeteneği ve antioksidan aktivitesi belirlenerek bu bitkiden fitoremediasyon tekniğinde nasıl daha verimli sonuçlar elde edilebileceğinin tespiti yapılmaya çalışılmıştır.

2.BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

2.1. Ağır Metaller Hakkında Genel Bilgi

Ağır metal; fiziksel özellik bakımından konsantrasyonu 5g/cm^3 ten daha fazla olan metallere denir. Bu metallere bazıları bitkilerin beslenmesi için gerekli olmalarına rağmen belirli konsantrasyonun üzerine çıktığında toksik etkilidirler. Ağır metaller grubunu; kurşun, demir, krom, bakır, civa, çinko, kadmiyum, kobalt gibi metaller oluşturmaktadır. Bu elementler doğaları gereği yeryüzünde silikatlar içinde bağlı olarak ya da silikat, karbonat ve sülfür halinde dengeli bir şekilde dağılım göstermişlerdir [9].

Doğada mevcut olan bazı ağır metaller belli bir yoğunluğa ulaşana dek organizmaların yaşamı için gereklidirler. Endüstriyel atıklar, evsel atıklar, tarımsal faaliyetler, maden arama gibi insan faaliyetleri bu elementlerin konsantrasyonlarını artırmaktadır [10-11].

Bunun sonucunda ağır metallerin ekolojik sistemde yayılmasına doğal çevrimlerden çok insanın neden olduğu görülmektedir (Tablo 2.1.). Ortalama yıl bazında doğal döngülere bağlı olarak 18800 ton arsenik, 3600 ton civa, 332000 ton kurşun ve 7600 ton Cd atmosfere atılmakta iken insansal faaliyetler neticesinde Civa, Kurşun, Kalay 6 kat, Kadmiyum 8 kat, Krom ise 3 kat daha artmaktadır [11].

Termik santraller, çöpler, demir çelik sanayi, çimento üretimi, lağımalar ağır metallerin çevreye yayılmasında rol oynayan insansal faaliyetlerin başında gelirler. Havaya atılan ağır metaller karaya, karadan da bitkiler ve besin zinciri yolu ile de hayvanlara ve insanlara ulaşarak toksik etki göstererek insan ve hayvan sağlığı üzerinde tehdit unsuru oluştururlar [12].

Tablo 2.1. Ağır metal kaynakları [11].

Atıklar	<ul style="list-style-type: none"> • Kazma-delmeler (As, Pb, Cd) • Lağım (Mo, Ni, Pb, V, Zn, Cu, Hg, Cd, Cr, Mn) • Küller (Pb, Cu)
Endüstri	<ul style="list-style-type: none"> • Ağaç işletmeciliği (Cu, As, Cr) • Plastikler (Cr, Cd, Co, Hg) • Rafineri (Ni, Pb, Cr) • Ev aletleri üretimi (Cd, Zn, Ni, Cu, Sb) • Tekstil (Sn, Tl, Al, Zn)
Metal ve maden sanayi	<ul style="list-style-type: none"> • Demir-çelik endüstrisi (Cu, Cr, Hg, As, Ni, Pb, Cd, Zn) • Metallerin eritilmesi (As, Cd, Hg, Pb, Sb, Se) • Metal işletmeciliği (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn)
Partikül ve dumanlar	<ul style="list-style-type: none"> • Fosil yakıtlardan (Cu, Mn, Cr, Ni, As, Pb, Sr, Tl, U, Cd, V, Zn) • Taşıtlardan (Mo, Cd, Pb) • Şehir, fabrika (Hg, Pb, Cd, Sn, Cu, V)
Tarım	<ul style="list-style-type: none"> • Gübreler (Mn, As, U, Cd, V, Cu, Zn) • Metal aşınması (Zn, Pb) • Kireçler (Pb, As) • Sulama (Pb, Cd, Zn)

2.1.1 Arsenik (As)

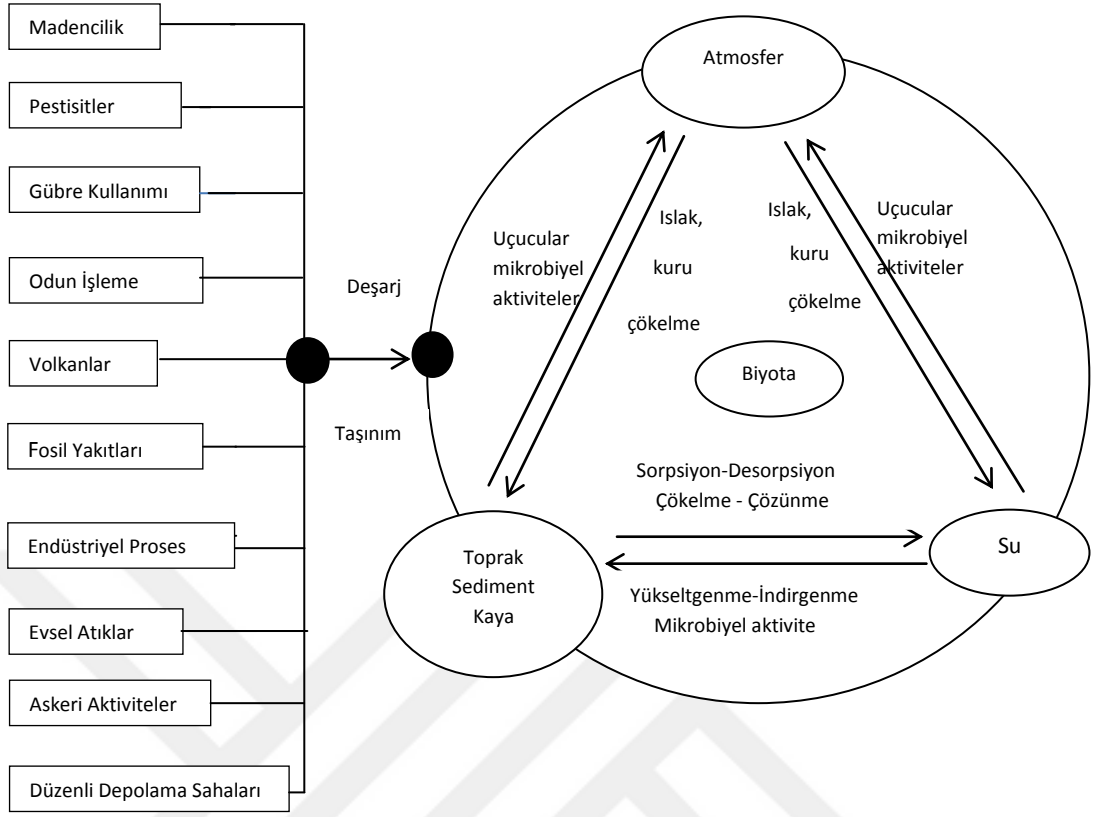
Arsenik; metal ile ametal arasında özellik gösteren azot ailesinden olan bir elementtir. Arsenik, kurşun ve bakır içeren mineral ve cevherlerde, toprakta ve bazı kaya türlerinde doğal olarak bulunur [13].

Arsenik; kanatlı hyavan yemlerinde, tekstil sanayinde, tarımsal ilaçların içeriklerinde, sigarada, böcek öldürücü ilaçların içeriklerinde, dişçilikte katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Bu kadar geniş bir kullanım alanı olan arsenik doğaya çok kolay karışabilmektedir.

Arsenikli endüstriyel atıklar suya, havaya, torağa kolaylıkla karışır. Bu topraklarda yetişen besinlerin kullanımı, havanın solunması veya suların kullanılması ile arsenik ekosisteme dahil olur (Şekil 2.1.).

Kuru ağırlık hesabına göre bitkilerde 0.1–1.0 mg/kg arsenik bulunabilir; ancak bu değer bitkinin bulunduğu coğrafı konum, çevresel etkenler ve topraktaki arsenik miktarına göre değişiklik gösterebilir. Deniz bitkilerinde arsenik konsantrasyonu daha yoğundur.

Arsenik bileşikleri doğada bulunan çok dayanıklı bileşiklerdir. Örneğin Arsenik trioksit (As_2O_3) su ile arsenit asidini oluşturur. Arsenit asidi alkaliler de çözündüğünde arsenit tuzlarını oluşturur ki şiddetli zehirdir. Arseniğin bileşikleri tatsız ve zehirlidir. Arsenik trioksit genellikle dişçilikte kullanılır [13].



Şekil 2.1 Doğada Arsenik döngüsü [13].

2.1.2 Kurşun (Pb)

Kurşun; insan faaliyetleri sonucunda ekosisteme yayılan toksik özelliğinden dolayı çevre kirliliğine neden olan en önemli ağır metaldir [14-2]. Kurşunun kullanımı antik çağlar da heykel yapımında kullanılmasına dayanmaktadır. Romalılarda su borularında kullanılmıştır, bunun sonucunda kurşun suya karışarak sağlık sorunlarına neden olmuştur [2].

Kurşun; akü imalatında, yeraltı kablolarının izolasyonunda, paslanmayı önleyen kurşun oksit boyalar olarak, kurşun tetraetil ve tetrametil formlarından benzin içerisinde oktan ayarlayıcı bileşikler olarak, radyasyonu en az geçiren madde olarak X- ışınlarının izolasyonu gibi birçok insan kaynaklı faaliyette kullanılmaktadır.

Kullanım alanlarına bağlı olarak baca ve eksoz dumanlarından; akü, boya ve petrolatıklarından toprağa ve atmosfere karışmaktadır. Çevre kirliliğine neden olan kurşunun % 98 i eksoz gazları kaynaklıdır [15-16].

Toprakta 15-40 ppm konsantrasyonunda bulunan kurşunun dozu 150 ppm' in üzerine çıkmadıkça sağlık açısından tehlike oluşturmaz [17]. Kurşun kökler tarafından tutularak kök gelişimini köyü yönde etkiler; buna bağlı olarakta besin alınmasını azaltır [18].

2.1.3 Nikel (Ni)

Gümüšümsü beyaz renkli suda çözünmeyen sert bir metaldir. Püskürük vebazik özellikteki kayalardan oluşan topraklarda Ni konsantrasyonu 100-5000 mg Ni/kg arasında bir değer gösterirken tarımsal topraklarda konsantrasyonu azdır. Sudaki doğal nikel miktarı çok düşüktür [19].

Kömür, fuel-oil ve kentsel atıkların yakılması atmosferdeki nikel oluşum kaynaklarının başında gelmektedir. Nikelin yüksek konsantrasyonları bitkiler de çimlenmeden başlayarak büyüme ve gelişmesinde toksik etki yapar [20]. Aynı zamanda nikel bileşikleri kanser araştırma merkezi (IARC) tarafından Grup 1 insan karsinojenik ajanı olarak değerlendirilmiştir [21].

2.1.4 Kadmiyum (Cd)

Kadmiyum elementi canlı organizmalar için toksik etkisi olan ekosistemdeki en tehlikeli ağır metallere biridir. Doğa da kadmiyum sülfat ve sülfid, kadmiyum klorür, kadmiyum oksit şeklinde bulunur [22].

Kadmiyumun tarım topraklarına karışması ve yoğunluğunun artması lağım atıklarına, fosforlu gübrelere, endüstriyel faaliyetlere bağlıdır [22]. Kadmiyum yoğunluğu bitki kuru maddesinde 1 mg/kg, toprakta 3 mg/kg'dan fazla ise toksiktir [23].

Kadmiyum otomotiv ve metal endüstrisinde, demir çelik ve alüminyum kaplamasında kullanılmaktadır. Kadmiyumun en önemli kullanım alanı günlük hayatta elektronik cihazlarda kullanılan Ni-Cd pilleridir. Kadmiyum bitkilerin nitrat asimilasyonunu azaltmakta kök büyüme ve gelişmesini engellemektedir. İnsanda karsinojen etki yaptığından kanser araştırma merkezi tarafından Tip 1 karsinojen olarak sınıflandırılmıştır [24].

2.2 Ağır Metallerin Bitkiler Tarafından Alınması

Bitkilerde ağır metal alınımı genellikle kökler ile atmosferdeki ağır metaller ise az miktarda yapraklar ile alınmaktadır. Ağır metaller bitkiler tarafından üç şekilde alınır;

- Pasif Alınım
- Aktif Alınım
- Kolaylaştırılmış Alınım

2.2.1 Pasif Alınım

Genel difüzyon yasalarına göre konsantrasyon farklılıkları esasına dayanan alınım şeklidir. Kökler ile alınan iyonlar küme halinde membran yüzeyinden sitoplazmaya doğru hareket ederek, iyon geçirgen membranlar ile komşu hücreler arasında pasif alınım sağlanmaktadır.

2.2.2 Aktif Alınım

Taşıyıcı moleküller aracılığı ile enerji kullanılarak yapılan alınım şeklidir. Bu alınım şekli sıcaklık değişimlerinden etkilenir.

2.2.3 Kolaylaştırılmış Alınım

Çevresel faktörler kurşunun bitkilere alınımını etkilemektedir. Bitkilerdeki kurşunun esas kaynağı hava ve topraktır. Yapraklardaki biriken kurşun, yaprakları yiyen böcek ve hayvanlar ile doğal döngüye karışmaktadır. Topraktaki kurşunun alınımının büyük kısmı kökler vasıtası ile yapılmaktadır [25].

Kadmiyumun bitkilere alınımı; topraktaki kadmiyum konsantrasyonu kentsel lağım atıkları ile ilişkilidir. Bitkilerin kadmiyum alınımını, topraktaki kadmiyum konsantrasyonu ve toprağın pH sı etkiler. Toprağın pH sı arttıkça bitkilerin kadmiyum alınımı düşer [26].

Nikelin bitkilerde alınımı; nitrojen mekanizması için gerekli olan nikel, topraktan bitkiler tarafından kolayca alınabilmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda, çimlenme ve büyümede toksik etki yapar [27].

2.3. Sucul Bitkilerde Ağır Metal Taşınımı ve Birikimi

Bitkiler metalleri dokuları içerisinde taşıyabilme özelliğine sahiptirler. Submers bitkilerde yapılan çalışmalarda akropetal taşınımın basipetal taşınımına göre daha fazla olduğu görülmüştür [28].

Metallerin translokasyonun da Pb gibi bazı metaller alındığı bölgede sabit kalırken Cd gibi metaller ise hareketlidirler [29].

Hücre duvarındaki fraksiyonlar da metal birikimi hücre içi yoğunluğundan çok dış ortamın metal yoğunluğuna bağlıdır. Metallerin bitkide depolandığı ana organel vakuoldür. İyon pompaları, plazma membranı, taşıyıcılar metallerin hücreye alınımında gereklidirler [30, 31].

Sanayileşme, şehirleşme, tarımsal ilaçların kullanılması gibi insansal faaliyetlerin artması doğadaki ağır metal konsantrasyonunu çoğaltmaktadır. Sucul makrafitler, kirleticilerle kirlenmiş sulardan metalleri bünyelerine katarak akümüle etmektedirler [32].

Krom, kurşun, demir, kadmiyum, kobalt, bakır, civa, nikel, çinko gibi metaller ağır metaller grubunu oluştururlar. Bu elementler doğaları gereği yeryüzünde silikatlar içinde bağlı olarak ya da silikat, karbonat ve sülfür halinde dengeli olarak bulunurlar [33].

Krom, kurşun, kadmiyum gibi metaller belirli yoğunluklarda canlı faaliyetleri için lüzumludur. Bu metallerin deniz suyundaki miktarları 1 ppm'den düşük seviyededir. Fakat insansal faaliyetlerden olan endüstriyel atıklar, tarım faaliyetleri, evsel atıklar, maden arama işleme ve doğal faktörlerden olan jeolojik ve volkanik faaliyetler, yangınlar ve erozyon sonucunda yoğunlukları artmaktadır [34]. Toksik etki gösteren ağır metaller, özellikle Kurşun (Pb), Bakır (Cu), Nikel (Ni) ve Çinko (Zn), toprak yüzeyine yüksek seviyelerde lağım suyu içeren sulu çamurla aktarılırlar [35], ve gıda zinciri içerisine taşınarak, yüksek toksik madde içermelerinden dolayı, ürünler içerisinde insan ve hayvan sağlığı üzerinde bir tehdit unsuru oluşturabilirler [36].

2.4. Bitkilerin Ağır Metallere Karşı Korunma Mekanizmaları

“Metal dışlama” ve “metal akümüle” denilen iki şekilde bitkiler metallere karşı dayanıklılık gösterirler.

Metal dışlama genel olarak metal alınımından kaçma ve gövdeye metal taşınımını engellemek şeklinde tanımlanabilir.

Bulunduğu ortamdan daha yüksek konsantrasyonda element içeren bitkilerdeki korunma mekanizması da metal akümüle olarak tanımlanır.

Bunların dışında; alınan ağır metallerin antioksidan enzim aktivitelerinin artırılması; fitokelatin ve amino asit gibi moleküllerle kompleks yaparak metabolik yollardan uzak bölgelerde biriktirilmesi gibi ağır metal direncini artıran savunma mekanizmaları da mevcuttur [37].

Metallerin bitkilerden atılması ve zararlarının minimuma indirilme yöntemleri;

- Ağır metalin bitkinin kutikula tabakasında biriktirilmesi
- Ağaçlarda kabuk atımı ve yaprak dökümü ile ağır metallerin bir bölümünün atılması
- Bazı metal ve metaloidlerin yapısının bitki tarafından değiştirilmesi
- Konifer ağaçları tarafından bazı metaller

2.5. Fitoremediasyon (Bitkisel Arıtım) ve Yöntemleri

Fitoremediasyon yönteminde ağır metalleri yüksek seviyelere kadar bünyesinde biriktirebilen daha sonra onları etkisiz hale getirebilen *hiperakümülatör* bitkiler kullanılır.

Bitki anlamına gelen “phyto” ile ıslah anlamına gelen “remediotion” kelimelerinden türetilmiştir.

Düşük masraflı, uygulama kolaylığı ve zamandan tasarruflu olması gibi avantajlı özelliklerinden dolayı kullanım alanı geniştir.

Fitoremediasyon yönteminde kullanılacak bitkilerin kirleticilerden zarar görmemesi ve kirli alanlarda kök ve yeşil kısımlarını oluşturabilme özelliğinde olmaları gereklidir (Tablo 2.2.) [38].

2.5.1. Fitoremediasyon Tipleri

Organik Kirleticilerde Kullanılan Yöntemler

- Rizodegradasyon
- Fitodegradasyon
- Fitovolatilizasyon

Metal Kirleticilerde Kullanılan Yöntemler

- Rizofiltrasyon
- Fitoekstraksiyon
- Fitostabilizasyon

Tablo 2.2. Fitoremediasyon tekniğinin genel özellikleri

Mekanizma	Proses Hedefi	Ortam	Kirleticiler	Bitkiler
Rizofiltrasyon (Metallerin kök tarafından alınması ya da tutulmasıdır.)	Kirletici Alma ve Uzaklaştırma	Yüzey ve Yeraltı Suyu	Metaller, Radyonükleidler	Ayçiçeği, Hindistan Hardalı, Su Sümbülü
Fitoextraksiyon (Kirliliklerin bitki kökleri tarafından alınması ve bitki içerisinde taşınmasıdır.)	Kirletici Alma ve Uzaklaştırma	Toprak, Sediment ve Çamur	Metaller, Metalloidler, Radionükleidler	Hindistan Hardalı, Pennycress, Alyssum, Ayçiçeği, Hibrit Kavaklar
Fitostabilizasyon (Kirleticilerin, kökler tarafından alınarak, Kökler yüzeyine yapışarak veya bitkinin kök bölgesinde hareketsizleştirilmesi ve rüzgâr ile su erozyonunun bitkiler tarafından engellenmesidir.)	Kirletici Etkisizleştirme	Toprak, Sediment ve Çamur	As, Cd, Cr, Cu, Hs, Pb, Zn	Hindistan Hardalı, Hibrit Kavaklar, Çimler
Fitodegradasyon (Bitki dokuları içerisinde kirleticilerin metabolizmaya uğramasıdır.)	Kirletici Giderme	Toprak, Sediment ve Çamur, Yeraltı suyu, Yüzey Suyu	Organik Bileşikler, Klorinat Çözücüler, Fenoller, Herbisitler	Alg, Stonewort, Hibrit Kavaklar, Siyah söğüt, Servi
Rizodegradasyon (Organik Kirleticilerin kök bölgesinde mikroorganizmalar tarafından biyolojik parçalanmasıdır.)	Kirletici Giderme	Toprak, Sediment ve Çamur, Yeraltı suyu	Organik Bileşikler	Kırmızı Dut, Çimler, Hibrit kavaklar, Sukamışı, Çeltik
Fitovolatilizasyon (Kirleticilerin kökler tarafından alındıktan sonra yapraklar aracılığıyla buharlaşmasıdır.)	Kirleticiyi buharlaştırma	Toprak, Sediment ve Çamur, Yeraltı suyu	Klorinat Çözücüler, Bazı İnorganikler (Se, Hg, As)	Kavaklar, Yonca, Siyah Locust, Hindistan Hardalı

2.5.1.1.Fitoekstraksiyon (Fitoakümülyasyon- Bitkisel Özümlene)

Fitoekstraksiyon yönteminde temel esas toprakta kirliliğe sebep olan metal kirleticilerin bitki kökleri ile alınmasıdır. Bu yöntemde metal kirleticilerin yüksek seviyelerine dayanıklı, bol miktarda köke sahip olan, hızlı büyüme yeteneğindeki bitkiler tercih edilmelidir. Bitkiler ağır metalleri kökleri ile topraktan alıp, toprak üstü yeşil akasamına taşıyarak depo ederler. Bitkinin hasat edilmesi veya budama ile bitkiden uzaklaştırılırlar.

Bazı durumlarda fitomining denilen yöntemle de metaller tekrar işlenerek geri kazanılabilmektedir [39].

Bitkisel özümlene için kullanılan Euphorbiacea, Asteraceae, Laminaceae, Brassicacea familyalarından ağır metal biriktirebilen 400 kadar tür vardır [40,41-45].

2.5.1.2. Rizofiltrasyon

Rizofiltrasyon, iyi gelişmiş bitki kökleri ile sıvı büyüme ortamlarından metal kirleticilerin alınması ve alıkonulması esasına dayanan yöntemdir [46].

Rizofiltrasyon da kullanılacak bitkilerin kökleri istenilen seviyede yetişene kadar temiz suda bekletilir, daha sonra kök sistemi gelişmiş bitkiler kirlenmiş su kaynağına alınır [47].

Bu yöntem için kullanılacak bitkiler;

- Bol miktarda kök veya yüzey alanı üretebilmeli
- Yüksek konsantrasyonlarda kirlilik faktörlerini etkisiz hale getirebilmeli
- Maliyeti düşük olmalı
- Oluşan ikincil atıklar minimum düzeyde olmalı

2.5.1.3. Fitostabilizasyon (Köklerde Sabitleme)

Fitostabilizasyon da amaç, topraktaki erozyonun önlenmesi, yeraltı sularına kirleticilerin karışmasının minimum düzeye indirilmesidir. Bunun içinde toprak yüzeyi tamamen bitkiler ile kaplanmalıdır [48].

Bu yöntemde; kirlenmiş topraklarda büyüeyebilen, yüksek konsantrasyonlardaki kirleticileri tolere edebilen, geniş kök sistemine sahip olan bitkiler kullanılmaktadır.

Fitostabilizasyon genellikle toprak, sediment ve çamurların ıslahında kullanılan bir yöntemdir. As, Cd, Cr, Hg, Cu, Zn, Pb gibi kirleticilerin topraktan Hindistan hardalı, hibrit kavaklar ve çimler kullanılarak başarılı bir şekilde uzaklaştırıldığı çalışmalarla görülmüştür [49]

2.5.1.4. Fitodegradasyon (Fitotransformasyon)

Topraktaki petrol, yeraltı sularındaki kirleticiler, havadaki uçucu bileşikler fitodegradasyon yöntemi ile uzaklaştırılabilmektedir [50].

Fitodegradasyon da bitkilerdeki enzimatik reaksiyonlar ve toprak mikroorganizmaları arasındaki rizosferik birliktelik ile kirleticiler parçalanmaktadır. Bitkide depo edilen organik kirleticiler metabolik mekanizmalar ile parçalanır. Parçalanmış moleküller bitkiler tarafından metabolik olarak kullanılabilir duruma getirilirler [51].

2.5.1.5. Rizodegradasyon (Kökle Bozunum)

Kökle bozunum; bitkilerdeki organik kirleticilerin toprak mikroorganizmaları ile etkisiz hale getirmesi esasına dayanan bir yöntemdir. Enerji ihtiyacının karşılanabilmesi için kök sistemi ile kirletici materyallerin kimyasal yapısını değiştirirler ve toksik kirleticilerin sürekli parçalanmasını gerçekleştirirler.

Rizodegradasyon ile petrollü hidrokarbonlar, benzen, etil benzen, toluen, ksilen ve çok karbonlu aromatik hidrokarbonlar ortamdan uzaklaştırılabilen kirleticilerdir [52].

2.5.1.6. Fitovolatilizasyon (Bitkisel Buharlaşma)

Bitkisel buharlaşma da ağır metal içeren suyu kokler ile absorbe eden ve daha az toksik uçucu hale getirip transpirasyon ile ağaçlar rol oynamaktadır [53].

Fitoremediasyon çalışmalarında kullanılacak bitkilerin seçimi yapılırken bazı özelliklere dikkat edilmesi gereklidir. Bu zellikler arasında; kirletici etkenlere rağmen yeni kok ve yeşil kısımlarını oluşturabilmeleri, ortamdaki kirleticilerden en az zararlı hayatlarına devam edebilmeleri, yüksek akümüle etme özelliğine sahip olmaları sayılabilir (Tablo 2.3.) [54].

Tablo 2.3. Metallerin Fitoremediasyonunda Kullanılan Bazı Bitki Türleri [54].

METAL	ORTAM	METOT	BİTKİ
As	Toprak	Fitoekstraksiyon	<i>Pteris vittata</i>
Cd	Toprak	Fitoekstraksiyon	<i>Oryza sativa</i>
Cd	Toprak	Fitostabilizasyon	<i>Vetiveria zizanioides</i>
Cd	Su	Rizofiltrasyon	<i>Lemna minor</i>
Cr	Toprak	Fitoekstraksiyon	<i>Brassica juncea</i>
Cr	Su	Rizofiltrasyon	<i>Brassica juncea</i>
Co	Toprak	Fitoekstraksiyon	<i>Berkheya coddii</i>
Nİ	Toprak	Fitoekstraksiyon	<i>Alyssum lesbiacum</i>
Ni	Su	Rizofiltrasyon	<i>Lemna minor</i>
Pb	Su	Rizofiltrasyon	<i>Hemidesmus indicus</i>
Pb	Toprak	Fitoekstraksiyon	<i>Chenopodium album</i>

2.5.2. Fitoremediasyon Tekniğinin Avantaj ve Dezavantajları

Fitoremediasyonun Avantajları;

1. Atık dökümü için farklı bir saha gerektirmez.
2. Fitoremediasyon yerinde ıslah özelliği sayesinde kirleticilerin yayılmasını engeller.
3. Birçok ıslah yönteminden daha ekonomiktir.
4. Birden çok kirleticinin ıslahı aynı anda yapılabilir.

Fitoremediasyonun Dezavantajları;

1. Yakacak odun olarak kullanılan bitkilerin dokularındaki kirleticilerin tekrar atmosfere karışma riski vardır.
2. Yapraklarında kirletici biriktiren bitkilerin yaprak dökmesi ile kirleticiler tekrar toprağa karışabilir.
3. Islah zamanı bakımından uzun olabilir [55].

Fitoremediasyon genel hatları ile özetlenirse;

1. Bitki ve ilişkili oldukları mikroorganizmalar kirleticileri, hasat edilebilir dokularda biriktirip veya buharlaştırarak ortamdaki uzaklaştırırlar.
2. Ekonomik, çevre dostu ve diğer kirleticileri temizleyici yöntemlerin tamamlayıcısı olarak kullanılan bir tekniktir.
3. Araştırmalara göre fitoremediasyon kirleticilerin çevreden uzaklaştırılmasında kullanılan en kolay ve gelecek açısından etkili sonuçlar veren, kullanımı gün geçtikçe yaygınlaşan bir tekniktir [55].

2.6 Antioksidan

Canlı hücreler içerisinde karbonhidrat, lipid, protein gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu inhibe edebilen moleküllere antioksidanlar denir.

Antioksidanlar aşağıdaki gibi sınıflandırılabilirler; [56]

1. Gerçek antioksidanların aktivitesini artıran sinerjistler (askorbik asit, sitrik asit)

2. Ağır metalleri bağlayarak inaktif hale getiren metal şelat yapıcılar Serbest yağ radikallerini inaktive eden gerçek antioksidanlar (Fenolik bileşikler)
3. Hidroperoksitlerin serbest radikallere parçalanmasını önleyen hidroperoksit kararlılığını artırıcılar
4. Karotenler
5. Hidroperoksitleri indirgeyen hidroperoksit indirgeyici maddeler

Antioksidanlar dört yolla oksidanları etkisiz hale getirirler;

1. Zincir Reaksiyonları Kırma Etkisi (Chain Breaking): Ağır minerallerin oksidanları kendine bağlayarak inaktive etmesidir.
2. Onarma Etkisi (Repair): Oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onarma etkisidir
3. Süpürme Etkisi (Scavenging): Oksidanları daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürmedir.
4. Söndürme Etkisi (Quenching): Oksidanlara bir hidrojen aktararak inaktive etmektir [57].

2.6.1 Antioksidanların Sınıflandırılması

1. Kaynağına göre
 - Doğal (Tekoferoller, Karotenoidler)
 - Sentetik
2. Lokalizasyona göre
 - Suda Çözünenler
 - Yağda Çözünenler
3. Katalitik aktiviteye göre
 - Enzimatik
 - Enzimatik olmayan
4. Savunma seviyelerine göre
 - Birincil
 - İkincil

2.6.2. Doğal antioksidanlar

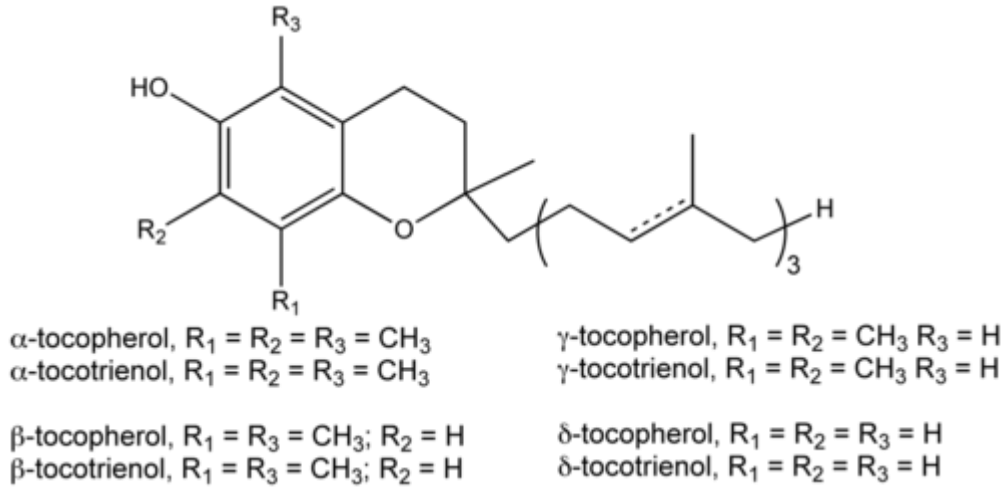
Doğal antioksidanlar genellikle polifenolik yapıda olan neredeyse tüm bitkilerde, mikroorganizmalarda, mantarlarda, meyvelerde, sebzelerde ve hatta hayvansal dokularda bile bulunan maddelerdir. Çok sayıda bitkisel infüzyonlar fenolik bileşiklerden özellikle flavonoidler ve fenolik asitlerden dolayı antioksidan ve farmakolojik özelliklere sahiptir ve sıklıkla halk hekimliğinde kullanılmaktadır.

Oksidatif denge; organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızının içinde bulunduğu dengeye denir. Organizmanın serbest radikallerden etkilenmemesi için oksidatif dengenin sağlanması gereklidir. Serbest radikallerin oluşum hızında artış veya ortadan kaldırılma hızında bir azalma oksidatif dengenin bozulmasına neden olur; buna “Oksidatif stres” denir. Oksidatif stres durumu doku hasarına yol açarak serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki dzensizliği göstermektedir. Bununla birlikte aerobik organizmalarda bu oksidatif strese karşı korunma mekanizması vardır [57].

2.6.2.1. Tekoferoller

1922 yılında Evans ve Bishop; ratların diyetlerine ekşimiş yağ katılarak beslenmeleri sonucu ortaya çıkan fetal reabsorpsiyonu, sebzelerdeki bir maddenin engellediğini fark etmişler ve bu maddeye tekoferol demişlerdir [58].

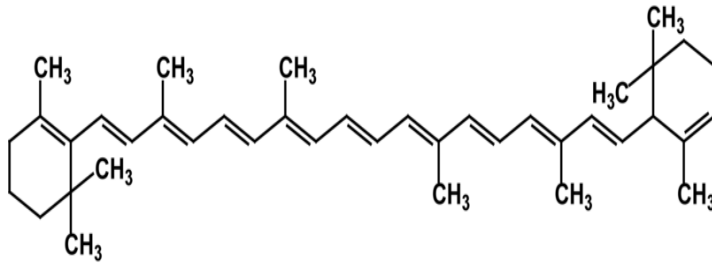
Bitkilerde α -, β -, γ -, δ - olmak üzere dört izomeri vardır. Üç metil grubu içeren α -tekoferoller en yüksek antioksidan aktivitesi olan izomerdir. α -tekoferoller içerisindeki en önemli antioksidan ise E vitamini (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Tekoferollerin genel kimyasal görünümü [58].

2.6.2.2. Karotenoidler

Sebze ve meyvelerde renk veren naddeler olarak bitkilerde sentezlenip; besin zinciri aracılığı ile hayvanlara geçerler. Likopen, krosetin, α -karoten, β -karoten en önemli ve spesifik görevleri olan karotenoidlerdir (Şekil 2.3.). β -karoten iki molekül vitamin A'nın birleşmesinden oluşan ve oksidasyon sonucunda meydana gelen hastalıkların kontrol edilmesinde görev yapan önemli bir antioksidandır [59].

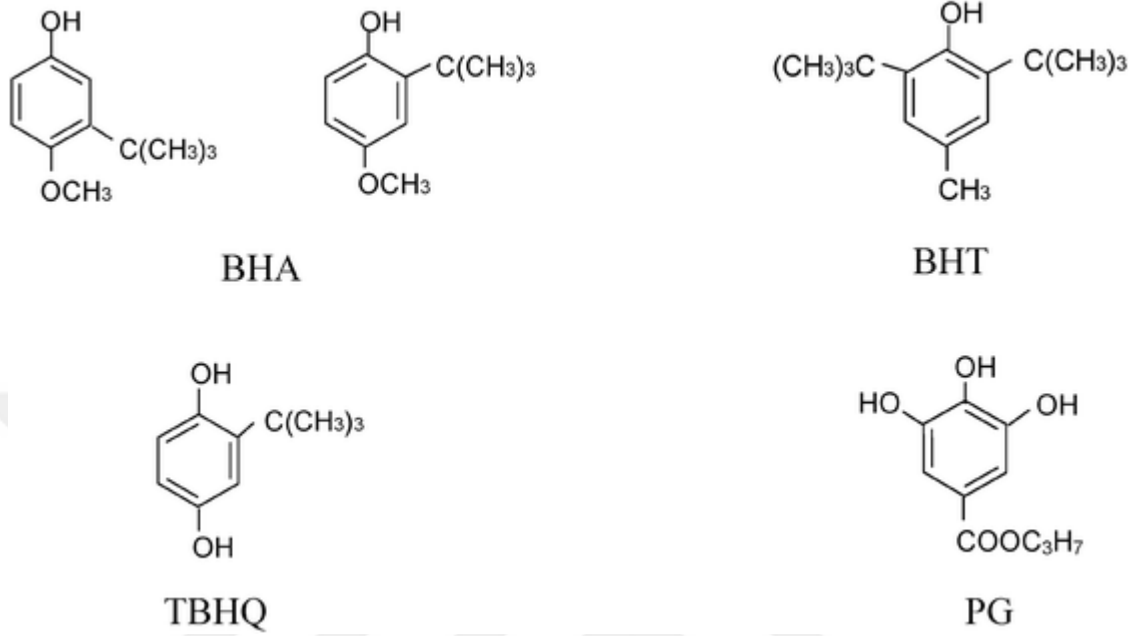


Şekil 2.3. β -karoten kimyasal formülü[59]

2.6.3. Sentetik Antioksidanlar

Ticari olarak üretilen, oksijen ile reaksiyona girerek olumsuz etkileri engelleyen maddelere genel olarak sentetik antioksidanlar denir. TBHQ (Tersiyer bütül hidrokinon), Bütillenmiş hidroksianisol (BHA), Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve PG (

Propilgallat) başlıca sentetik antioksidanlar olmalarına rağmen kanser yapıcı ve mutajenik özelliklerinden dolayı kullanımları yasaktır (Şekil 2.4.) [60].



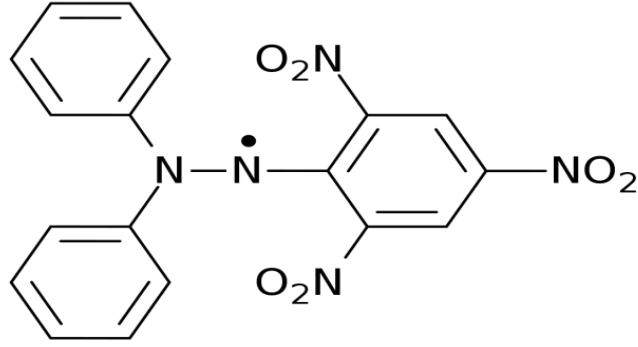
Şekil 2.4 Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), Bütillenmiş hidroksianisol (BHA), Propilgallat (PG), Tersiyer bütül hidrokinon (TBHQ) [60].

2.6.4. Antioksidan Özelliklerin Belirlenmesinde Kullanılan Teknikler

2.6.4.1. 2,2- Difenil-1-Pikrilhidrazil (DPPH) Serbest Radikal Yakalama Aktivitesi

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil ticari olarak elde edilebilen kararlı, sentetik ve stabil organik nitrogen radikalleridir (Şekil 2.5.) [61].

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil etkinliği EC₅₀ değerleri ile gösterilip, DPPH'nin renk yoğunluğunun antioksidanların varlığında azalması ile belirlenir. Bileşiklerdeki veya bitkiler ve gıdalardan elde edilen ekstraktlerdeki serbest radikal söndürücü aktiviteyi belirlemek için kullanılan bir yöntemdir [62].



Şekil 2.5. DPPH radikalın kimyasal yapısı

Bazı bitki türlerinde türlerinde yüksek derecede DPPH yakalama aktivitesi olduğu çalışmalarla ortaya konmuştur [63].

2.6.4.2 Metal iyonlarını şelatlama etkisi

Protein, lipid ve diğer bileşenlerle istenmeyen oksidatif reaksiyonlara neden olabilen demir, canlı yaşamı için gerekli olan temel elementlerden biridir. Fenton reaksiyonlarındaki Fe^{+2} konsantrasyonunun azalması ile oksidatif hasara karşı koruyucu etki görülmektedir; bu demirin fenton reaksiyonları sonucunda serbest radikal oluşturabilme özelliğinden kaynaklanmaktadır [65].

Geçiş metalleri içerisinde Fe^{+2} iyonlarının yüksek reaktivitesinden dolayı lipid oksidasyonuna yol açan en önemli pro-oksidan olduğu bilinmektedir [66] Fenton reaksiyonu: $Fe^{+2} + H^2 O^2 \rightarrow Fe^{+3} + HO \cdot + HO$ şeklindedir.

Fenton reaksiyonları sonucunda oluşan hidroksil ve peroksit gibi radikal oluşumunu inhibe edebilen metal şelatlama özelliğindeki antioksidan maddeler serbest demiri bağlayarak onu etkisiz hale getirirler. Metal şelatlama özelliği antioksidan aktiviteyi belirlemede etkili bir yöntemdir [67]. Ortamda bulunan Fe^{+2} iyonlarının indirgemesi esasına dayanan metal şelatlama aktivitesi önemli bir tekniktir. Şelat ajanlarının demir iyonlarını şelatlaması sonucu kırmızı renkteki azalma ile metal şelatlama aktivitesi belirlenir. Metal şelatlama aktivitesi lipid peroksidasyonundaki katalize olmuş geçiş metallerini indirgediği için önem taşımaktadır. Sekonder antioksidan olan şelatlama

ajanları redoks potansiyelini indirgeyerek metal iyonlarının oksidasyonunu stabilize edebilirler. [68, 69].

2.6.4.3 Toplam fenolik içeriğinin belirlenmesi yöntemi

Toplam fenolik madde miktarının tespit edilmesi, hidroksil grupları hakkında fikir vermesi açısından antioksidan aktiviteyi sağlamaktadır. Doğal ürünlerde toplam fenolik madde ölçümünde FC yöntemi kullanılmaktadır. Ayrıca oksidasyon redüksiyon reaksiyonlarına dayanana temel mekanizma antioksidan ölçüm yöntemi olarak da kullanılmaktadır. Genellikle antioksidan aktivitesi ve toplam fenol içeriği arasında oldukça iyi bir ilişki görülür [70].

2.7. Literatür özeti

Azolla pirinç tarımında azot gübresine mineral olarak iyi bir kaynak olma özelliği göstermektedir. Bitkinin azot bağlama kapasitesinin yüksek olması, büyüme kapasitesinin fazla olması, hızlı mineralizasyonu ve içerdiği azotun bitkiler tarafından daha kolay alınabilen amonyum şeklinde olması gibi özelliklerinden dolayı pirinç ekiminde biyolojik gübre olarak kullanılmaktadır. [71]. *Azolla* pirinç tarımında yüzey suyunun buharlaşmasını azaltarak suyun pirinç tarafından etkili bir şekilde kullanımını sağlamaktadır. *Azolla*'nın çeltik tarımında kullanılması sonucunda toprağın verimliliği artmakta ve kimyasal azot kullanımı azaltılmaktadır [72].

Vesely ve ark. [45], sucul bitkiler üzerine yaptıkları laboratuvar çalışmasında (*Pistia stratiotes* L., *Salvinia auriculata* Aubl., *Salvinia minima* Baker. ve *Azolla filiculoides* Lam) kullanarak farklı konsantrasyonlarda kadmiyum (3.5 mgL^{-1} ve 10.5 mgL^{-1}) ve kurşun (25 mgL^{-1} ve 125 mgL^{-1}) uygulayarak bitkilerde ortaya çıkan farklılıklar ve ağır metal stresi incelenmiştir.

Rahman ve Hasegawa [73] yaptıkları çalışmada; sucul bitkilerden, su mercimekleri (*Lemna minor*, *Lemna gibba*, *Spirodela polyrhiza*), su sümbülü (*Eichhornia crassipes*), su ıspanağı (*Ipomoea aquatica*), su marulu (*Pistia stratiotes*), su eğrelti otları (*Azolla caroliniana*, *Azolla filiculoides* ve *Azolla pinnata*), hydrilla (*Hydrilla verticillata*) ve su teresinin (*Lepidium sativum*) arsenik alım yetenekleri ve mekanizmalarını

değerlendirilmişlerdir. Yapılan çalışma, bu sucul makrofitlerin ağır metal akümülayon kapasitelerinin fazla olduğunu ve bu nedenle bitkisel arıtım yöntemi için uygun bitkiler olduklarını ortaya koymuştur [73].

Vaseem ve Banarjee tarafından [74] Hindistan'da, metallerin geri kazanılması için kullanılan polimetalik deniz nodüllerden ortaya çıkan zehirli atıkların *L. minor* ve *A. pinnata* kullanılarak ortamın temizlenmesi hedeflenmiştir. Çalışma sonucunda *A. pinnata*'nın metal temizleme oranları Fe % 70, Pb % 96, Mn % 96, Cr % 93, Cu % 97, Zn % 98, Cd % 78 iken, *L. minor* bitkisinin metal temizleme oranı ise Fe % 74, Pb % 84, Mn % 94, Cr % 63, Cu % 86, Zn % 62, Cd % 78 olarak tespit edilmiştir. Bitkilerin 7 gün boyunca klorofil içeriği *A. pinnata* için % 51 ve *L. minor* için % 59 azalmıştır. Çalışmanın sonuçlarına bakıldığında *L. minor* ve *A. pinnata* nın metal arıtma potansiyallerinin yüksek olduğu ve toksik atık arıtma da etkili oldukları tespit edilmiştir. [74].

Rofkar ve ark.'ın [75] yaptıkları çalışmada *Azolla caroliniana* ve *L. minor* bitki türlerinde silikon, arsenik ve bakırın toksik etkileri ve akümülayonu incelenmiştir. Bitkiler, tek başlarına ve kombinasyon halinde arsenik (0 ya da 20 µM), bakır (2 veya 78 µM) ve silikon (0 ya da 1.8 mM) ile muamele edilerek hoagland çözeltisinde kültüre alınmışlardır. Çalışmada tolerans biyokütle büyümesi, klorofil ve antosiyanin miktarları tespit edilmiştir. Araştırma sonucuna göre her iki bitki türünde silikon, arsenik ve bakır biyoakümülayonu gözlenmiş; *L. minor*'de akümülayonun en yüksek olduğu gözlenmiştir. Silikon *A. caroliniana*'nın büyüme oranı üzerinde arsenik etkisini artırırken *L. minor* üzerindeki bakır etkisini azalttığı tespit edilmiştir [75].

Landis ve ark., [76] farklı sucul bitkiler üzerinde yaptıkları incelemede Zn ve Cd'nin bitkiler tarafından kirli sulardan yüksek oranda akümüle edildiğini gözlemişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda ağırmetallerin etkili şekilde kökten gövdeye taşındığı ve hiperakümülayon özelliği gösteren türlerde ise 100-1000 kat daha yüksek oranda akümülayonun gözlendiği bildirilmiştir.

3. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Araştırma Materyallerinin Temini

Tez kapsamında deney materyali olarak kullanılan bitki, bir tatlı su eğreltisi olan *Azolla filiculoides* Lam.'dır (Şekil 3.1.) Çalışmamızda kullanılan bitkiler kültür ortamında yetiştirilmiştir. Bitkiler ticari olarak temin edildikten sonra Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi serasında bulunan ortamda gerekli havalandırma ve su sirkülasyonu sağlanarak kültüre alınmış ve çoğaltılmıştır (Şekil 3.2.).



Şekil 3.1. *Azolla filiculoides*

3.1.1. *Azolla filiculoides*'in Sistematığı

Alem: Plantae

Bölüm: Pteridophyta

Sınıf: Filicopsida

Alt Sınıf: Salviniidae

Takım: Salviniiales

Familya: Azollaceae

Tür: *Azolla filiculoides*

3.1.2. *Azolla filiculoides*

Bir tatlı su eğreltisi olan *Azolla* (Su kadifesi), Azollaceae familyasına ait olup sürekli ve kalıtsal ortağı, azot fikse eden, heterosist yapısına sahip filamentli bir siyanobakteri olan *Anabaena azollae* ile birlikte simbiyotik olarak yaşamaktadır. *Azolla* siyanobakteriye yaprak boşluğuna bıraktığı sukrozu sağlarken siyanobakterinin serbest bıraktığı NH_3 de bitki almaktadır [77]. Ayrıca yaprak boşluğunda ve yaprak yüzeyinde çeşitli heterotrofik bakteriler de bulunmaktadır. Dorsal yaprak boşluklarında yaşayan, azot fikse eden simbiyotik ortağından dolayı genellikle pirinç tarlalarında gübre olarak kullanılmaktadır. Ayrıca iyi aminoasit profili, yüksek protein ve karotenoid içeriğinden dolayı balık, domuz, kümes hayvanları, tavşan ve hatta insanların beslenmesinde de kullanılabilir. Yeşil olan yaprakları direkt güneş ışığı altında, fosfor eksikliğinde ya da olumsuz çevresel koşullarda kırmızıya dönmektedir [78].

Azolla her bir yaprakçığın tabanındaki absiyon tabakasının bölünmesi ile genellikle vegetatif olarak çoğalmaktadır. Eşeyli üremesi oldukça karmaşıktır ve çoğunlukla olumsuz çevresel koşullar altında meydana gelmektedir [79-84].

A. filiculoides Alaska'dan güney Amerika'ya, güney Afrika, batı Avrupa, güney Avustralya, Yeni Zelanda, Uzakdoğu yayılım gösterirken Ülkemizde de Trakya bölgesinde yayılım göstermektedir [85]

Tatlı su eğreltisi olan *Azolla* gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerin tarımsal aktiviteleri için büyük önem taşımaktadır. *Azolla* – *A. azollae* simbiyozisi ökaryotik partner *Azolla* ve prokaryotik endosimbiyant *A. azollae* arasındaki tek simbiyotik ilişkidir. Bu ilişkinin agronomik potansiyeli bitkinin azot bakımından düşük ya da yoksun alanlarda başarılı bir şekilde yetişmesinden kaynaklanmaktadır [78].

Azot fikse eden dorsal yaprak boşluklarında yaşayan simbiyotik ortağından dolayı pirinç tarlalarında gübre olarak kullanılmaktadır. Simbiyotik ortaklıktan yıllık hektar başına 100-150 kg azot (N) elde edilebilmektedir [80]. *Azolla* çeltik tarımında mineral azot gübresine iyi bir alternatif N kaynağıdır. Hızlı çoğalması, hızlı mineralizasyonu, bitkinin yüksek azot bağlama kapasitesi ve içerdiği azotun bitkiler tarafından nispeten daha kolay alınabilen amonyum formunda olması gibi özelliklerinden dolayı çeltik tarımında biyogübre olarak kullanılmaktadır [81]. *Azolla* yüzey suyunun buharlaşmasını minimuma indirerek suyun pirinç tarafından daha verimli kullanılmasını artırdığından pirinç tarımında tercih edilmektedir. Ayrıca amonyağın buharlaşma ile kaybını önleyerek tarımda kimyasal azot kullanımını da azaltmaktadır. *Azolla*'nın çeltik tarımında kullanılması ile birlikte toprak verimliliği de artmaktadır [82].

Azolla ilaç ve gıda endüstrisinde, iyi aminoasit profili, yüksek miktarda protein ve karotenoid içermesi nedeniyle balık, tavuk, domuz, ördek ve tavşanların beslenmesi gibi çok fazla kullanım alanı olan bir bitkidir.

Azolla kullanımı ile yapılan çalışmalarda ekosistemde yabancı otların ve sivrisineklerin kontrolünde ve tatlı sulardaki organik ve inorganik kirliliklerin giderilmesinde başarılı sonuçlar alınmıştır. [83]. Türkiye' de sadece Kırklareli' nde yetişen *Azolla*'nın doğal yayılış gösteren tek türü *Azolla filiculoides* dir. Diğer taraftan 5 farklı *Azolla* türüne ait farklı genotiplerin Ege bölgesine adaptasyonu ile ilgili çalışmalarda *A. mexicana*-2026 genotipinin Ege ve Akdeniz ekolojik koşullarına uyum gösterdiği belirlenmiştir [85].

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitki Yetiştirme ve Ağır Metal Uygulaması

Laboratuvar ortamında örnekler, her bir deneme üçer tekrarlı olacak şekilde 400 ml'lik beherlerde 5'er gram bitki kullanılarak yapılmıştır. Bitki büyütme işlemleri kontrollü şartlar altında (23°C ve 14-saat fotoperiyot) bitki büyüme çemberinde yapılmıştır (Şekil 3.3.). Bu çalışmada Arsenik (As) (1- 5- 10- 50 mg L⁻¹), kurşun (Pb) (5- 10- 25- 50 mg L⁻¹), nikel (Ni) (1- 5- 10- 20 mg L⁻¹), kadmiyum (Cd) (1- 2- 4- 8 mg L⁻¹) ön denemelerle belirlenen konsantrasyonlarda kullanılmıştır. Bitki örnekleri deney süresinin sonunda

tartılmadan kurutma kâğıdı üzerinde 5 dakika bekletilerek suyunu çekmesi sağlanmıştır. Aşağıdaki formüle göre büyüme oranları hesaplanmıştır.

$$RGR = [\ln(W2) - \ln(W1)] / (t2 - t1) \quad (3.1)$$

(W1= bitkinin ilk yaş ağırlığı ve W2= bitkinin son yaş ağırlığı (g), t1=ilk zaman ve t2= son zaman) [86].



Şekil 3.2. *A. filiculoides*'in kültür ortamı.



Şekil 3.3. *A. filiculoides* in büyüme çemberine alınan örnekleri

3.2.2. MDA (Lipid Peroksidasyonu Analizi)

0,5 g bitki örnekleri, toplamda 3 ml olacak şekilde % 20'lik TCA (triklor asetik asit) ve % 5'lik TBA (tiobarbitürikasit) içerisinde homojenize edilmiştir. Homojenat 30 dakika süre ile 95°C'de inkübe edildikten sonra, süre bitiminde reaksiyonu durdurmak için buz içerisine konulmuştur. Örnekler 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı alınmış ve 532 nm absorbans değeri ve 600 nm deki non-spesifik absorpsiyon için absorbans değeri okunmuştur [87].

Lipid peroksidasyonu'nun hesaplanması için; 532 nm'de ölçülen absorbans değerinden 600 nm' de belirlenen değeri çıkarılmış ve 1ml çözeltildeki

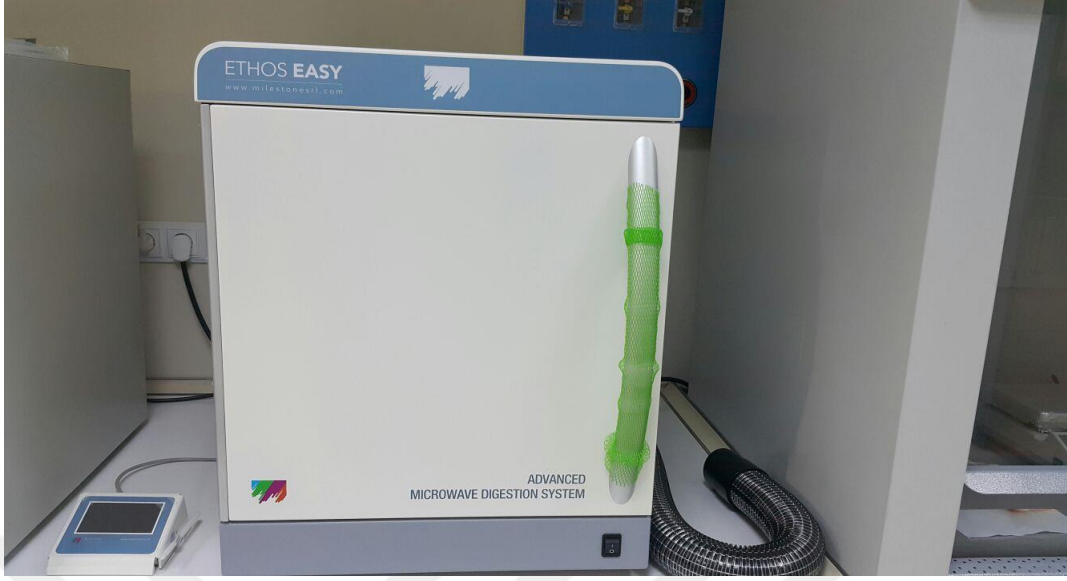
$$\text{MDA (nmol/g): } [(A_{532}-A_{600})/155X (\text{seyreltme faktörü})] \times 1000 \quad (3.2)$$

Formülüyle hesaplanmıştır. Sonuçlar MDA (nmol/gram doku) şeklinde verilmiştir.

3.2.3. Ağır Metal Seviyesinin Tespiti

Deterjanlı su içerisinde bir gün bekletilen kullanılacak plastik, cam ve porselen malzemeler daha sonra çeşme suyuyla yıkanmıştır. Yıkanan malzemeler % 20'lik HNO₃ içerisinde bir gece bekletildikten sonra çift distile su ile yıkanmış ve 60 °C'de etüv de kurutulmuştur. Bu çalışmada kullanılan standartların ve çözeltilerin hazırlanmasında, % 65'lik (Merck reagent) Nitrik asit kullanılmıştır. Bitki kısımlarının çözülmesinde HNO₃ kullanılması oldukça yaygın bir yöntemdir. Ayrıca standartların ve örneklerin hazırlanmasında ve seyreltme işleminde çift distile su kullanılmıştır.

Ağır metal içeriklerini belirleyebilmek için bitki örnekleri distile su ile yıkanarak 105⁰C'de kurutulmuştur. Kurutulduktan sonra örnekler 0,05 g tartılarak üzerine 8 ml HNO₃ eklenerek mikrodalga numune hazırlama cihazında çözülmüştür (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. Microwave Digestion System

Kenarları distile su ile yıkanan hücreler içerisindeki örnekler 50 ml'lik propilen tüplere alınmış, çift distile su ile üzerleri 10 ml'ye tamamlanmış ve ICP-MS cihazında ölçüm işlemi yapılmıştır (Şekil 3. 5.)



Şekil 3.5. ICP-MS cihazı

3.2.4. *A. filiculoides* ekstrelerinin eldesi

Bitki örnekleri 60 °C'deki etüvde 72 saat bekletilerek kurutulmuştur. Kuruyan bitki örnekleri havan ile toz haline gelinceye kadar ezilmiştir. Toz halindeki örneklerin 1 g'ı 10 ml etanolde çözdürülmüş ve sonikasyon ile homojenize edilmiştir. Elde edilen ekstreler kullanıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.5. DPPH radikalini temizleme kapasitesinin belirlenmesi

Bitki ekstrelerine ait serbest radikal temizleme aktiviteleri DPPH (2,2-difenil-1 pikrilhidrazil) tespit edilmiştir [88]. Farklı konsantrasyonlarda (50, 100, 200, 400, 500, 1000 ppm) ekstrakt çözeltileri hazırlanmıştır. 1 ml bitki ekstresi 1 ml 0,1 mM DPPH çözeltisi ile karıştırılmıştır. Tüpler karanlıkta ve oda sıcaklığında 30 dk. inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra örneklerin 517 nm dalga boyundaki absorbans değerleri spektrofotometrede körve karşı okunmuştur. Pozitif kontrol olarak BHT, BHA ve α - tokoferol kullanılmıştır. Serbest radikal temizleme aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{İnhibisyon (\%)} = [1 - (A_1 / A_0)] \times 100 \quad (3.3)$$

(A_0 = kontrolün absorbansı ve A_1 = örneğin absorbansı).

Testler üç kere tekrarlanmıştır, kontrol olarak BHA, BHT ve α - tokoferol kullanılmıştır.

3.2.6. Metal iyonlarını şelatlama kapasitesi

Metal şelatlama aktivitesi yapılırken Decker ve Welch'in [89] belirledikleri yöntem esas alınarak, üzerinde yapılan bazı düzenlemelerle gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için farklı konsantrasyonlarda (50, 100, 200, 400, 500, 1000 ppm) ekstrakt çözeltileri hazırlanmıştır. 1 ml bitki ekstresine 50 2 mM FeCl₂ ve 100 5 mM ferrozin çözeltisi ilave edilmiş ve tüpler karıştırılmıştır. Tüpler karanlıkta ve oda sıcaklığında 10 dk. bekletilmiştir. İnkübasyondan sonra çözeltilerin 562 nm dalga boyundaki absorbans değerleri körve karşı spektrofotometrede okunmuştur. Aşağıdaki eşitlik kullanılarak % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır:

$$\text{İnhibisyon (\%)} = [1 - (A_1 / A_0)] \times 100$$

(A_0 = kontrolün absorbansı ve A_1 = örneğin absorbansı).

Testler üç kere tekrarlanmıştır, kontrol olarak EDTA kullanılmıştır.

3.2.7. Toplam fenolik içerik düzeylerinin belirlenmesi

Bitki örneklerine ait toplam fenolik bileşik miktarları, Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak, gallik asit eşdeğeri olarak belirlenmiştir [90]. Bunun için; 0,1 ml ekstrakt 0,2 ml % 50'lik folin reaktifi ile karıştırılmış ve 3 dk. inkübe edilmiştir. Bu karışıma % 2'lik Na_2CO_3 eklenmiş ve 45 dk. oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra çözeltilerin 760 nm dalga boyundaki absorbans değerleri körve karşı spektrofotometrede okunmuştur.

Gallik asit eşdeğeri hesaplanırken, standart gallik asit grafiğinden elde edilen aşağıdaki eşitlikten yararlanılmıştır.

$$\text{Abs} = 0,0063x - 0,0101$$

(Burada; Abs 760 nm'deki absorbans değerini, x ise örnekteki toplam fenolik içeriği ($\mu\text{g mg}^{-1}$) ifade eder.)

3.2.8. β -karoten ve likopen içeriğinin belirlenmesi

Bitki ekstrelerinin içerdiği β -karoten ve likopen miktarlarının tespiti Nagata ve Yamashita'ya [91] göre yapılmıştır. 100 mg kuru ekstre 10 ml aseton-hekzan (4:6) karışımında çözülmüş ve daha sonra karışım filtre edilmiştir (0,45 μm ; Millipore). Filtratların absorbans değerleri; 453 nm, 505 nm ve 663 nm dalga boylarında spektrofotometrede ölçülmüştür.

β -karoten ve likopen miktarının tespitinde aşağıdaki eşitlikten yararlanılmıştır.

$$\beta\text{-karoten } (\mu\text{g mg}^{-1}) = (0.216 \times A_{663}) - (0.304 \times A_{505}) + (0.452 \times A_{453}) \quad (3.4)$$

$$\text{Likopen } (\mu\text{g mg}^{-1}) = (0.0458 \times A_{663}) + (0.372 \times A_{505}) - (0.0806 \times A_{453}) \quad (3.5)$$

(Burada; A_{663} 663 nm'deki, A_{505} 505 nm'deki, A_{453} ise 453 nm'deki absorbans değerini ifade eder.)

3.2.9. İstatistiksel Analizler

SPSS istatistik programı kullanılarak istatistik analizleri yapılmıştır. Her bir örnek için 3 kez okunan değerlerin ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri hesaplanmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde kolaylık sağlaması açısından SPSS programı kullanılarak, ANOVA ve Duncan testleri gerekli parametreler ve gruplar için uygulanmıştır. Ortalamalar ve gruplar arası farklılıklar bu testler yardımı ile karşılaştırılmıştır.

4.BÖLÜM

BULGULAR

4.1. As Akümülayonu

Azolla filiculoides bitkisine farklı konsantrasyonlarda (0, 1, 5, 10, 50 mg L⁻¹) As uygulanmıştır. 8 günlük uygulama sonunda örneklerdeki As miktarları Tablo 4.1.'de verilmiştir. Tablo 4.1 bakıldığında uygulanan As miktarı yükseldikçe bitkideki As akümülayonunun da yükseldiği tespit edilmiştir. Yoğunluklara bağlı olarak birbirimleri birbirinden farklıdır ve bu fark istatistiksel yönden anlamlıdır (p<0,05)

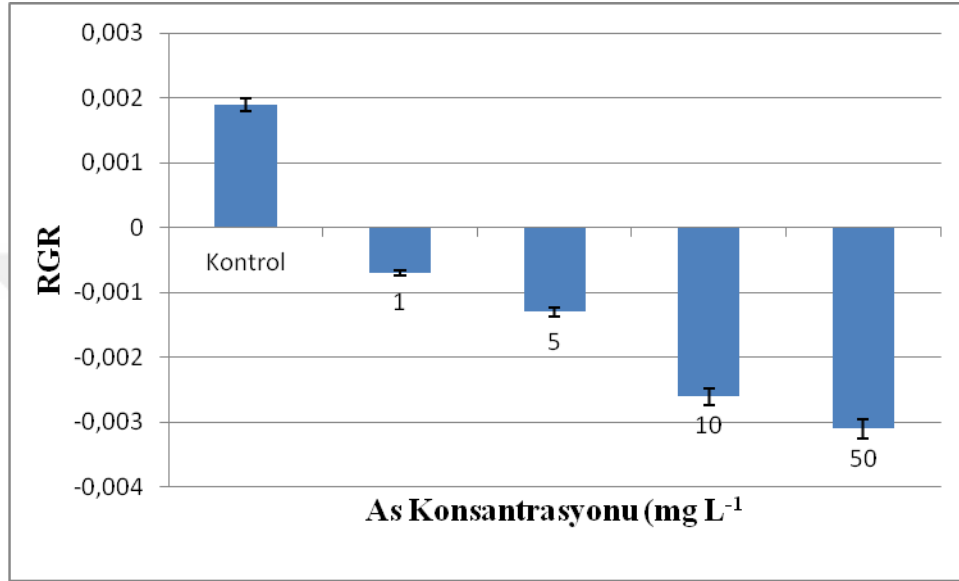
Tablo 4.1. *Azolla filiculoides* örneklerindeki As miktarı ve standart hata değerleri ($\mu\text{g g}^{-1}$ kuru ağırlık, n=3).

As Konsantrasyonu (mg L ⁻¹)	Ort/Std hata ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Min	Maks
Kontrol	0,654 ^a ±0,001	0,514	0,875
1	22560 ^b ±23,5	22323	22714
5	30610 ^c ±85,6	30536	30770
10	61902 ^d ±132,7	61566	62124
50	103763 ^e ±214,0	10244	105641

Aynı satırda gösterilen farklı harfler p<0,05 (ANOVA) seviyesinde bitki örneklerine göre konsantrasyonlar arasında önemli farklılığın olduğunu göstermektedir.

4.1.1. As Uygulanmış *Azolla filiculoides* Örneklerindeki Büyüme Oranı (RGR)

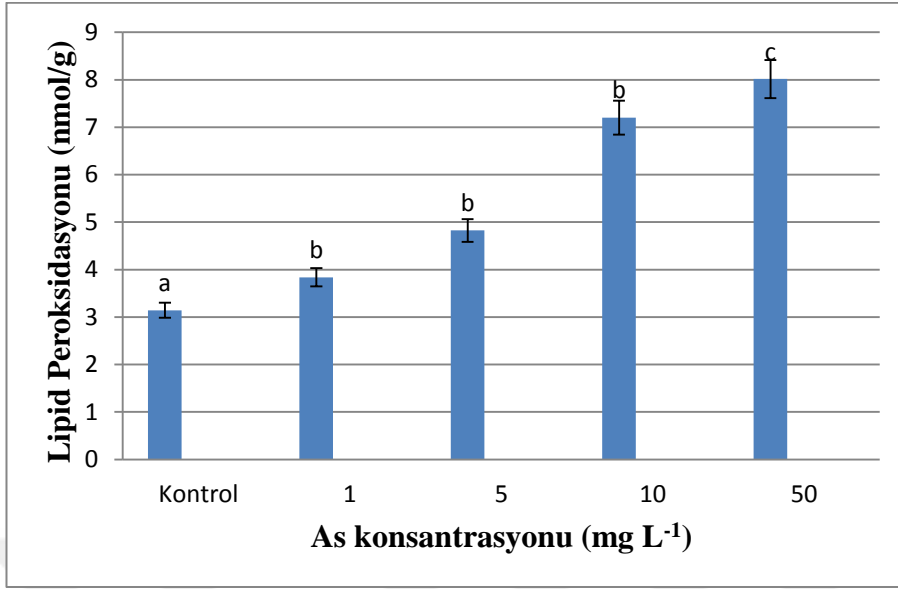
Sekiz günlük As uygulanması sonucunda *Azolla filiculoides* örneklerindeki büyüme oranı Şekil 4.1’de verilmiştir. Uygulanan As yoğunluğu yükseldikçe büyüme oranının göreceli olarak azaldığı belirlenmiştir ($p<0,05$).



Şekil 4.1. Sekiz gün As (1-50 mg L⁻¹) uygulanan *Azolla filiculoides*'in büyüme oranı ve standart hata değerleri (n=3)

4.1.2. As Uygulanan *Azolla filiculoides* Örneklerinin Lipid Peroksidasyonu

Azolla filiculoides örneklerine farklı konsantrasyonlarda As uygulaması sonucunda MDA miktarı Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Arsenik sitresi lipid peroksidasyonu miktarını yükseltmiştir. Yoğunluklara bağlı olarak MDA miktarlarının farklılık gösterdiği ve bu sonuçları istatistiksel yönden anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).



Şekil 4.2. As (1-50 mg L⁻¹) uygulanan *Azolla filiculoides* bitkisindeki MDA miktarı ve standart hata değerleri (nmol/g yaş ağırlık, n=3)

4.2 Pb Akümülayonu

Azolla filiculoides bitkisine farklı konsantrasyonlarda (0, 5, 10, 25, 50 mg L⁻¹) Pb uygulanmıştır. 8 günlük uygulama sonunda örneklerdeki Pb miktarları Tablo 4.2.'de verilmiştir. Tablo 4.2 ye bakıldığında uygulanan Pb miktarı yükseldikçe bitkideki Pb akümülayonunun da yükseldiği görülmektedir. Farklı konsantrasyonlar farklı akümülayonlara neden olmaktadır ki bu farklılıklar istatistiksel açıdan önemlidir (p<0,05)

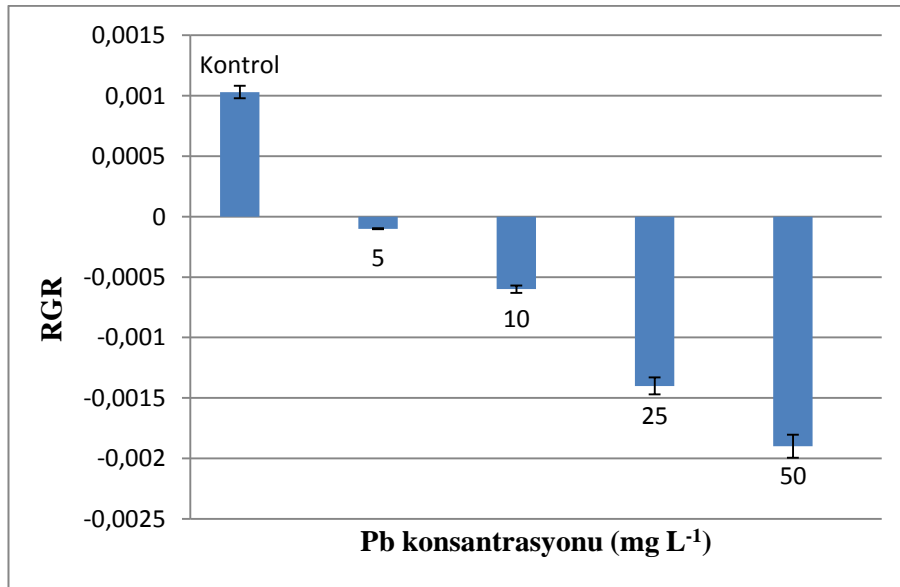
Tablo 4.2. *Azolla filiculoides* örneklerindeki Pb miktarı ve standart hata değerleri ($\mu\text{g g}^{-1}$ kuru ağırlık, n=3).

Pb Konsantrasyonu (mg L^{-1})	Ort/Std hata ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Min	Maks
Kontrol	0,124 ^a ±0,001	0,482	0,485
5	15608,98 ^b ±38,3	15391	15758
10	25290,42 ^c ±90,6	25138	25561
25	32198,15 ^d ±128,7	32101	32592
50	45745,25 ^e ±113,0	45643	45847

Aynı satırda gösterilen farklı harfler $p<0,05$ (ANOVA) seviyesinde bitki örneklerine göre konsantrasyonlar arasında önemli farklılığın olduğunu göstermektedir.

4.2.1.Kurşun (Pb) Uygulanmış *Azolla filiculoides* deki Büyüme Oranı (RGR)

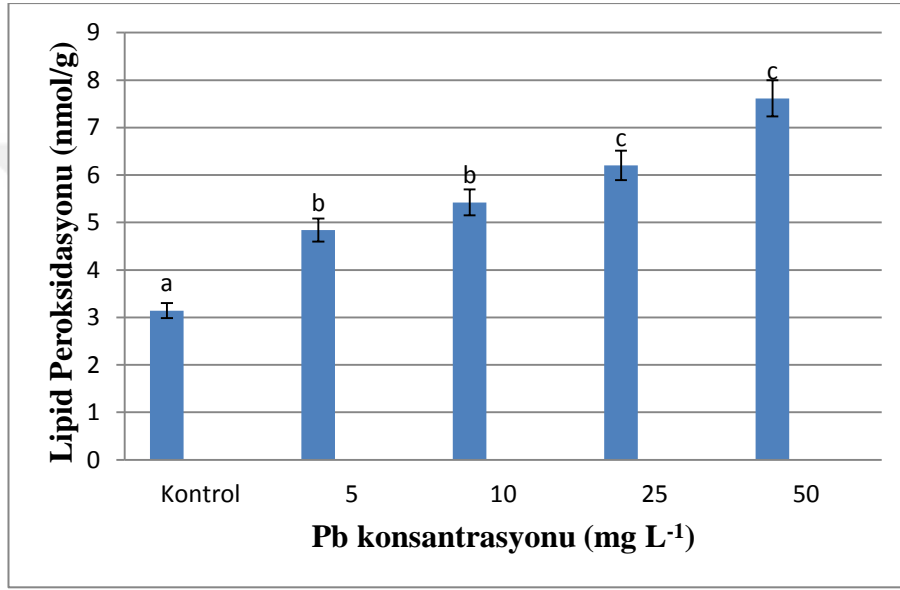
Sekiz günlük Pb uygulanması sonucunda *Azolla filiculoides* örneklerindeki büyüme oranı Şekil 4.3’de gösterilmiştir. Uygulanan Pb yoğunluğu artmasına bağlı olarak büyüme oranının göreceli olarak azaldığı belirlenmiştir ($p<0,05$).



Şekil 4.3. Sekiz gün Pb (5-50 mg L^{-1}) uygulanan *Azolla filiculoides* örneklerindeki büyüme oranı ve standart hata değerleri (n=3).

4.2.2. Pb Uygulanmış *Azolla filiculoides* Örneklerindeki Lipid Peroksidasyonu

Azolla filiculoides örneklerine farklı konsantrasyonlarda Pb uygulaması sonucunda MDA miktarları Şekil 4.4’de verilmiştir. Kurşun stresi lipid peroksidasyonu miktarını artırmıştır. Farklı konsantrasyonlarda Pb uygulanması sonucunda lipid peroksidasyonu miktarlarının da farklılık gösterdiği ve bu farklılıkların istatistiksel yönden önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).



Şekil 4.4. Pb (5-50 mg L⁻¹) uygulanmış *Azolla filiculoides* bitkisindeki lipid peroksidasyonu miktarı ve standart hata değerleri (nmol/g yaş ağırlık, n=3)

4.3. Ni Akümülyasyonu

Azolla filiculoides bitkisine farklı konsantrasyonlarda (0, 1, 5, 10, 20 mg L⁻¹) Ni uygulanmıştır. 8 günlük uygulama periyodu sonucunda bitki örneklerindeki Ni miktarları Tablo 4.3.’de verilmiştir. Tablo 4.3’e bakıldığında uygulanan nikel miktarı yükseldikçe bitkideki Ni akümülyasyonunun da yükseldiği görülmektedir. Farklı konsantrasyonlarda Ni uygulanması sonucunda akümülyasyonların da farklılık gösterdiği ve bu farklılıkların istatistiksel yönden önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).

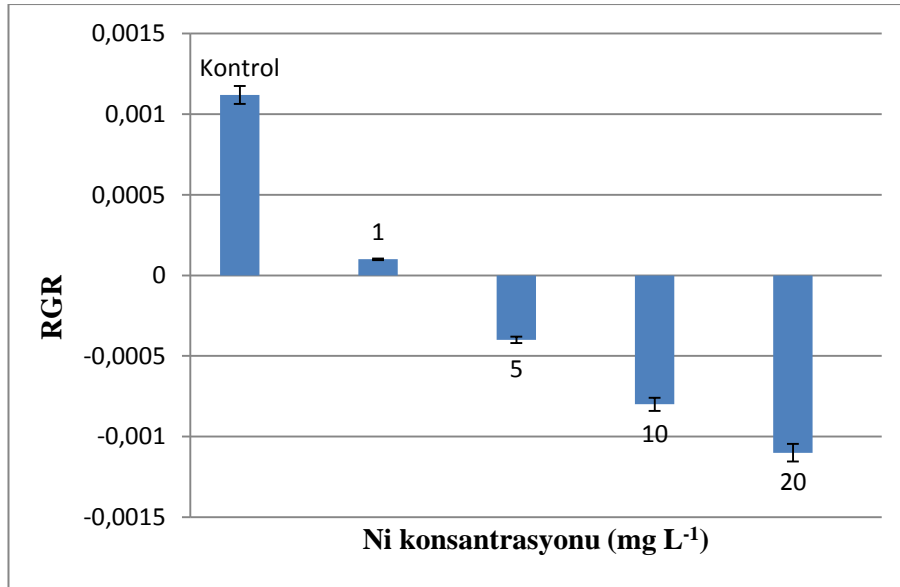
Tablo 4.3. *Azolla filiculoides* deki Ni miktarı ve standart hata değerleri ($\mu\text{g g}^{-1}$ kuru ağırlık, n=3).

Ni Konsantrasyonu (mg L^{-1})	Ort/Std hata ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Min	Maks
Kontrol	0,154 ^a ±0,00	0,152	0,156
1	28675,06 ^b ±42,3	28476	28736
5	81530,87 ^c ±168,2	81465	81617
10	108149,8 ^d ±204,1	107992	109113
20	163189,6 ^e ±28,8	162346	163390

Aynı satırda gösterilen farklı harfler $p<0,05$ (ANOVA) seviyesinde bitki örneklerine göre konsantrasyonlar arasında önemli farklılığın olduğunu göstermektedir.

4.3.1. Nikel Eklenmiş *Azolla filiculoides* Bitkilerindeki RGR (Büyüme Oranı)

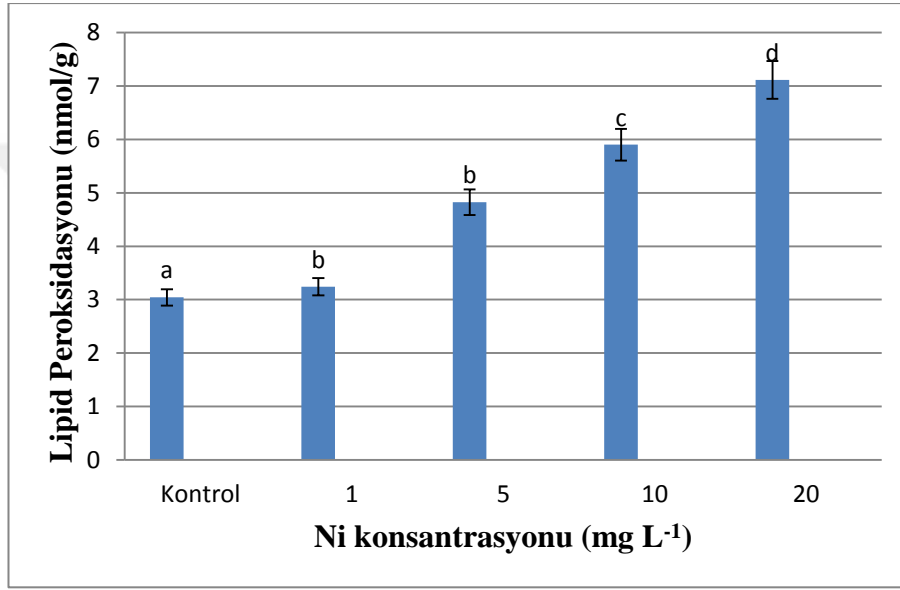
Sekiz günlük periyotta nikel uygulanması neticesinde *Azolla filiculoides* örneklerindeki RGR Şekil 4.5’de verilmiştir. Uygulanan Nikel yoğunluğu yükseldikçe büyüme oranının göreceli olarak düştüğü belirlenmiştir ($p<0,05$).



Şekil 4.5. Sekiz günlük Nikel (1-20 mg L^{-1}) uygulaması sonucunda *Azolla filiculoides*'in büyüme oranına etkisi ve standart hata değerleri (n=3)

4.3.2. Nikel Eklenen *Azolla filiculoides* deki MDA (Lipid Peroksidasyonu)

Azolla filiculoides örneklerine farklı konsantrasyonlarda Ni uygulaması sonucunda MDA miktarı Şekil 4.6'de verilmiştir. Nikel sitresi lipid peroksidasyon miktarını yükseltmiştir. Farklı konsantrasyonlar sonucunda lipid peroksidasyonu miktarlarının farklılık gösterdiği ve bu farklılıkların istatistiksel yönden anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).



Şekil 4.6. Ni (1-20 mg L⁻¹) uygulanmış *Azolla filiculoides* bitkisindeki lipid peroksidasyonu miktarı ve standart hata değerleri (nmol/g yaş ağırlık, n=3)

4.4. Kadmiyum (Cd) Akümülayonu

Azolla filiculoides bitkisine farklı konsantrasyonlarda (0, 1, 2, 4, 8 mg L⁻¹) kadmiyum eklenmiştir. 8 günlük uygulama sonucunda bitki örneklerindeki kadmiyum miktarları Tablo 4.4.'de verilmiştir. Tablo 4.4'e bakıldığında uygulanan Cd miktarı yükseldikçe bitkideki Cd akümülayonunun da yükseldiği görülmektedir. Farklı konsantrasyonlar sonucunda akümülayonlar farklılık göstermektedir ki bu farklılıklar istatistiksel yönden anlamlıdır ($p<0,05$).

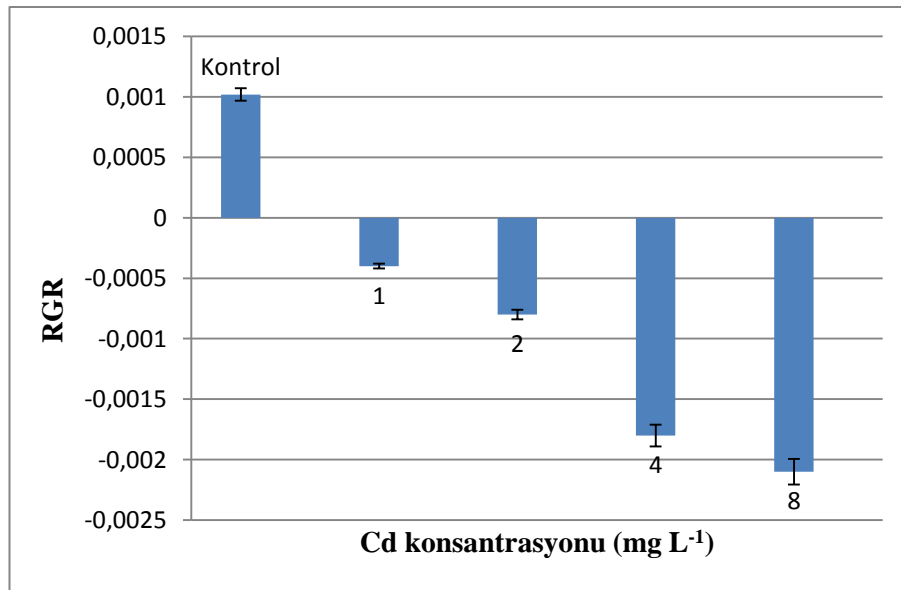
Tablo 4.4. *Azolla filiculoides* örneklerindeki Cd miktarı ve standart hata değerleri ($\mu\text{g g}^{-1}$ kuru ağırlık, n=3).

Cd Konsantrasyonu (mg L^{-1})	Ort/Std hata ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Min	Maks
Kontrol	0,636 ^a ±0,002	0,634	0,638
1	3406 ^b ±27,3	3377	3430
2	9939 ^c ±278,8	9619	10133
4	14914 ^d ±196,8	14721	15115
8	23550 ^e ±77,0	23465	23615

Aynı satırda gösterilen farklı harfler $p<0,05$ (ANOVA) seviyesinde bitki örneklerine göre konsantrasyonlar arasında önemli farklılığın olduğunu göstermektedir.

4.4.1. Kadmiyum (Cd) Eklenmiş *Azolla filiculoides* deki RGR (Büyüme Oranı)

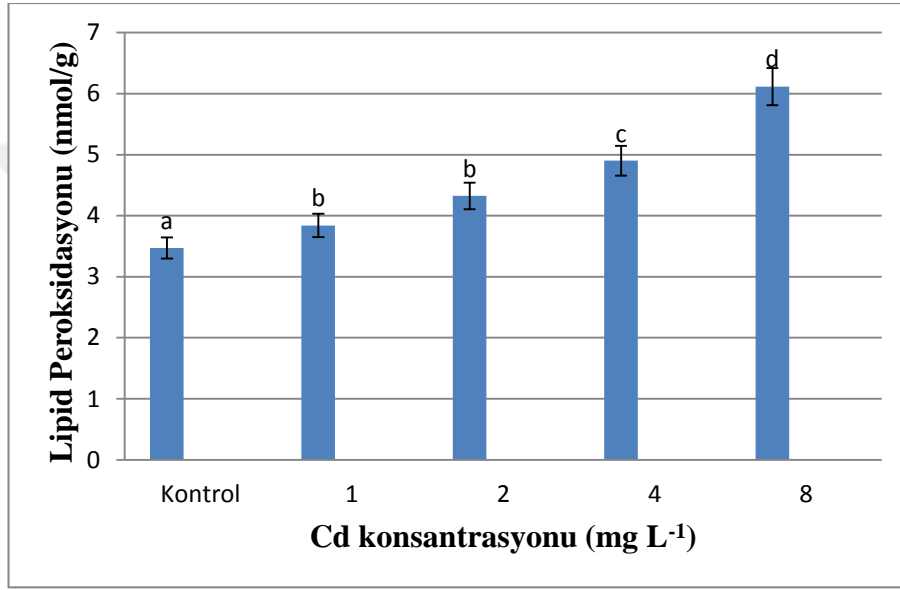
Sekiz günlük kadmiyum uygulanması neticesinde *Azolla filiculoides* örneklerindeki RGR Şekil 4.7’de gösterilmiştir. Uygulanan kadmiyum yoğunluğu yükseldikçe RGR nin göreceli olarak düştüğü belirlenmiştir ($p<0,05$).



Şekil 4.7. Cd (1-8 mg L^{-1}) sekiz gün uygulamasının neticesinde *Azolla filiculoides*'in büyüme oranına etkisi ve standart hata değerleri (n=3).

4.4.2. Kadmiyum Eklenmiş *Azolla filiculoides* deki Lipid Peroksidasyonu

Azolla filiculoides örneklerine farklı konsantrasyonlarda Cd uygulaması sonucunda MDA miktarı Şekil 4.8’de verilmiştir. Cd sitresi lipid peroksidasyonu miktarını yükseltmiştir. Farklı konsantrasyonlar sonucunda MDA miktarları farklılık göstermektedir ki bu farklılıkların istatistiksel yönden anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).



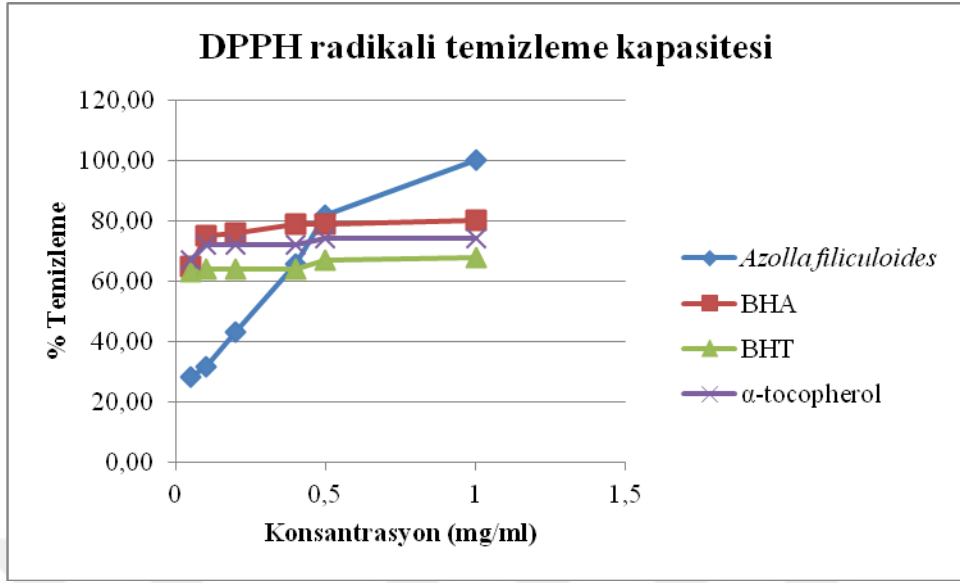
Şekil 4.8. Kadmiyum (1-8 mg L⁻¹) eklenmiş *Azolla filiculoides* bitkisindeki MDA miktarı ve standart hata değerleri (nmol/g yaş ağırlık, n=3)

4.5. DPPH radikali temizlenme kapasitesi

Test edilen bitki ekstralarının farklı konsantrasyonlarının serbest radikal olan DPPH’i temizleme kapasitelerine bakıldığında her ekstre için konsantrasyon oranı arttıkça aktivite oranının da yükseldiği gözlemlenmiştir. Test edilen bitki türünün DPPH yakalama aktivitesi en yüksek konsantrasyonları göstermiştir.

Bulgular BHA, BHT ve α -tocopherol gibi antioksidan aktiviteleri bilinen standart antioksidanlar ile karşılaştırılmıştır ve Şekil 4.9’da verilmiştir.

1 mg ml⁻¹ konsantrasyonda *A. filiculoides* ortamdaki serbest radikali %100 oranında temizlerken, aynı konsantrasyonda BHA %80, α -tocopherol %74 ve BHT %68 oranında temizlemiştir.



Şekil 4.9. *Azolla filiculoides* türünün ve kontrollerin DPPH radikali temizleme kapasiteleri

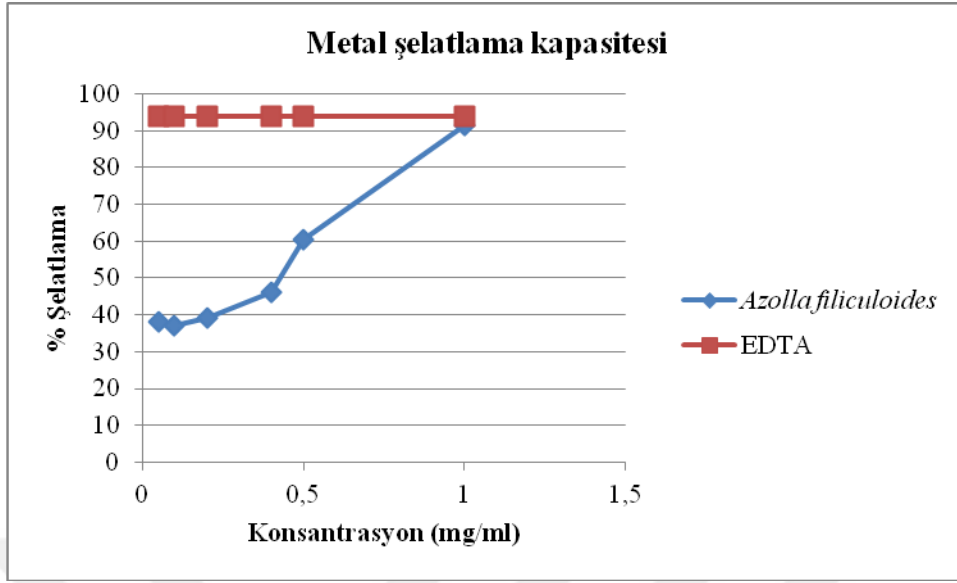
Şekilden elde edilen denklem kullanılarak %50 inhibisyondaki ekstre konsantrasyonunu veren IC_{50} değeri hesaplanmış ve *Azolla filiculoides* için $0,27 \text{ mg ml}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

4.6. Metal İyonlarını (demir) Şelatlama Kapasitesi

Test edilen *Azolla filiculoides* ekstrelerinin farklı konsantrasyonlarının metal şelatlama aktivitelerine bakıldığında her ekstre için konsantrasyon oranı arttıkça aktivite oranının da yükseldiği gözlemlenmiştir.

Bulgular iyi bir metal şelatörü olan EDTA ile karşılaştırılmıştır ve Şekil 4.10'da verilmiştir.

1 mg ml^{-1} konsantrasyonda *Azolla* %91,35 metal şelatlama kapasitesine sahipken, aynı konsantrasyonda EDTA %94 metal şelatlama kapasitesine sahiptir.



Şekil 4.10. *Azolla filiculoides* türünün ve kontrollerin metal şelatlama kapasiteleri

Şekilden elde edilen denklem kullanılarak %50 inhibisyondaki ekstre konsantrasyonunu veren IC_{50} değeri hesaplanmış ve *Azolla filiculoides* için $0,34 \text{ mg ml}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

4.7. Biyoaktif içerik miktarları

Antioksidan özellikte olan biyoaktif içerikler baz alındığında, çalışılan *Azolla filiculoides* bitkisinin β -karoten, likopen ve toplam fenolik içerikleri Tablo 4.7.'de verilmiştir. β -karoten içeriği $0,478 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$ 'dir. *Azolla filiculoides* türünün likopen miktarı $0,074 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$ bulunmuştur. Toplam fenolik miktarına baktığımızda ortalama $367,95 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$ tespit edilmiştir.

Tablo 4.7. *Azolla filiculoides* türünden elde edilen β –karoten, likopen ve total fenolik içerik miktarı

Biyoaktif içerik	Miktar($\mu\text{g mg}^{-1}$)
Total fenolik içerik	367,95
β karoten	0,48
Likopen	0,074

5. BÖLÜM

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmalar göstermektedirki sucul bitkilerin bir kısmı kirlenmiş sularda bulunan ağır metalleri, akümüle ederek suların bitkisel arıtımına önemli oranda katkı sağlamaktadırlar. Bu şeklide yapılan fitoremediasyon çalışmaları son zamanlarda popüler bir araştırma konusu haline gelmiştir. Doğaya dost olmaları, hızla çoğalabilmeleri ve düşük maliyetli olmaları sebebiyle sulak alan bitkileri bu amaçla başarılı bir şekilde kullanılmaktadırlar. Bitkisel arıtıma (Fiteromediasyon) ait birçok farklı teknoloji ve bitki çeşidinin bulunması, bu yöntemin kullanım olanağını artırmaktadır. Bitkisel arıtım amaçlı faydalanılan bitkiler ortamda kirlenme oluşturacak ise yakılmak suretiyle veya uygun bir depolama alanında toplanarak uzaklaştırma yapılmaktadır.

Yaptığımız çalışmada kullandığımız *Azolla filiiiculoides*, deney ortamına çabucak adaptasyon göstermesi, ortamda hızla çoğalması, kütüre alınmasının kolay olması gibi özellikleri sayesinde tercih edilmiştir.

Azolla filiiiculoides üzerinde As, Ni, Pb ve Cd metallerinin biyoakümülyasyon miktarı, bitkinin lipid peroksidasyonu ve büyüme oranına ağır metallerin ne oranda etki ettikleri belirlenmeye çalışılmıştır.

Ayrıca bitkinin DPPH serbest radikal yakalama yeteneği, metal şelatlama aktivitesi, Total fenol içeriği, β karoten ve likopen miktarı belirlenmiştir.

Çalışma sonucunda farklı konsantrasyonlarda ağır metal uygulanması yapılmış olan *A. filiiiculoides*'de morfolojik ve fizyolojik değişimler gözlemlenmiş, en yüksek ağır metal akümülyasyonu As'in 50 mg l⁻¹'lik konsantrasyonunda 103763 μ gg⁻¹ olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte ağır metallerin *A. filiiiculoides* üzerindeki etkilerinin birbirinden farklı olduğu saptanmıştır. *A. filiiiculoides*'in incelenen ağır metaller açısından akümülyatör özelliğininde yüksel olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda; yüksek konsantrasyonlardaki ağır metal uygulamalarının *A. filiculoides*'in büyüme oranı üzerine olumsuz yönde etki ettiği anlaşılmış olup, büyüme oranı konsantrasyon miktarı arttıkça düşüş göstermiştir. Sonuçlardan elde edilen hesaplamalar göz önüne alındığında büyüme oranına ağır metallerin etkisinde, As'nin Cd, Ni ve Pb'ye oranla büyüme oranını daha fazla azalttığı, büyüme oranında en fazla düşüşün As 50 mg l⁻¹'lik konsantrasyonunda -0,0031 mg d⁻¹ olduğu tespit edilmiştir.

Lipit peroksidasyonu incelendiğinde; bitkiye uygulanan ağır metal akümüasyonu arttıkça, strese bağlı olarak bitkideki MDA miktarı artış göstermiştir. En yüksek MDA miktarı As 50 mg l⁻¹'lik konsantrasyonunda 8,015 nmol/g olarak ölçülmüştür.

Rahman ve Hasegawa [73] yaptıkları çalışmada; sucul bitkilerden, su sümbülü (*Eichhornia crassipes*), su mercimekleri (*Lemna minor*, *Lemna gibba*, *Spirodela polyrhiza*), su marulu (*Pistia stratiotes*), su eğrelti otları (*Azolla filiculoides*, *Azolla caroliniana*, *Azolla pinnata*), su ispanağı (*Ipomoea aquatica*), hydrilla (*Hydrilla verticillata*) ve su teresinin (*Lepidium sativum*) arsenik akümüasyon miktarları ve mekanizmalarını değerlendirilmişlerdir. Yapılan çalışma, bu sucul makrofitlerin ağır metal akümüasyon yeteneklerinin fazla olması sebebiyle bitkisel arıtım amacıyla kullanılabileceklerini önermişlerdir [73]. Sonuçlar çalışmamızda kullandığımız *Azolla filiculoides* ilede uyum içerisindedir ve bitkinin ağır metal akümüasyonunun yüksek olduğu belirlenmiştir.

Vaseem ve Banarjee tarafından [74] Hindistan'da, deniz ortamından çıkan zehirli atıklardaki ağır metallerin *A. pinnata* ve *L. minor* ile ortamdan temizlenmesi hedeflenmiştir. *A. Pinnata*'nın metal temizleme oranları Zn % 98, Fe % 70, Mn % 96, Cu % 97, Pb % 96, Cr % 93, Cd % 78 iken, *L. minor*'in ağır metal temizleme oranı ise Zn % 62, Fe % 74, Mn % 94, Cu % 86, Pb % 84, Cr % 63, Cd % 78 olarak tespit edilmiştir. Bitkilerin klorofil miktarları *L. minor* için % 59, *A. pinnata* için % 51 ve azalmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde; bitkilerin ortamdan ağır metalleri temizleme oranlarının yüksek olduğu ve bitkisel arıtım amaçlı olarak uygun bitkiler oldukları belirtilmiştir.[74].

Rofkar ve ark.'ın [75] yaptıkları çalışmada *L. minor* ve *Azolla caroliniana* örneklerinde bakır, silikon ve arseniğin akümüasyonu ve toksik etkileri incelenmiştir. Bitkiler kombinasyon halinde ve, tek başlarına bakır (2 veya 78 μM) arsenik (0 ya da 20 μM), ve silikon (0 ya da 1.8 mM) ile muamele edilerek hoagland çözeltisinde kültüre alınmışlardır. Çalışmada tolerans biyokütle büyümesi, klorofil ve antosiyanin miktarları tespit edilmiştir. Çalışma sonuçları incelendiğinde bitkilerde bakır silikon ve arsenik biyoakümüasyonu gözlenmiş; *L. minorde* akümüasyonun en yüksek olduğu gözlenmiştir [75]. Çalışmamızda da *A. filiculoides* bitkisinde ağır metal uygulamaları esnasında büyüme oranında azalmalar meydana gelmiş, solüsyondaki metal konsantrasyonları arttıkça, bitki dokusundaki ağır metal akümüasyonunun arttığı belirlenmiştir.

4 farklı makrofit üzerinde Vesely ve ark.'ın yaptığı çalışmada (*Azolla filiculoides* Lam, *Salvinia auriculata* Aubl., *Pistia stratiotes* L., ve *Salvinia minima* Baker.); farklı konsantrasyonlarda kurşun (25 mgL^{-1} ve 125 mgL^{-1}) ve kadmiyum (3.5 mgL^{-1} ve 10.5 mgL^{-1}) uygulanmış ve bitkilerde gözlenen morfolojik ve fizyolojik değişiklikler kaydedilmiştir. [45]. Yaptığımız çalışmada, *Azolla filiculoides* örneklerine Cd ve Pb uygulanmış, MDA miktarı strese bağlı olarak artış göstermiş ve büyüme oranının azaldığı belirlenmiştir, Ağır metal akümüasyonu uygulanan Cd ve Pb konsantrasyonu arttıkça artış göstermiştir.

Spirodela polyrhiza L. bitkisine farklı miktarlarda Ni (1, 5, 10, 20 mg L^{-1}) uygulayan Leblebici ve Aksoy [92] 1, 3, 5 ve 7. günlerde bitkinin büyüme oranını incelemiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde uygulanan metal miktarı arttıkça bitkide meydana gelen biyoakümüasyon miktarında artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Leblebici ve Aksoy tarafından yapılan çalışma sonuçları çalışmamızı destekler niteliktedir. Araştırma sonucumuzda bitkiye uygulanan Ni miktarı arttıkça *Azolla filiculoides*'de Ni biyoakümüasyonu artış gösterirken, göreceli büyüme oranı konsantrasyon miktarı arttıkça azalmıştır [92].

Duman ve ark. [93] *Nasturtium officinale*'nin bitkisel giderim ve biomonitor olarak kullanımını üzerine çalışma yürütmüşlerdir. Çalışma sonucunda Cd, Co ve Cr'nin en etkili alımı sırasıyla 0.5, 0.5 ve 10 mM olduğu belirlenmiştir. Sonuçlardan da anlaşıldığı

üzere *S. polyrrhiza* Cd'ye karşı daha hassastır. Çalışmamız da ise *Azolla filiculoides*'de 23550 $\mu\text{g g}^{-1}$ Cd akümülyasyonu olduğu, Cd miktarı arttıkça bitkide biyotalınım miktarında arttığı gözlenmiştir.

Yalçın, [94] Pb, Cd ve Ni ağır metallerinin *Salvinia natans* ve *Lemna minor* üzerindeki stres ve biyolojik yanıtlar üzerine yaptığı tez çalışmasında; Pb konsantrasyonu 5 mg L⁻¹'den 50 mg L⁻¹'e doğru yükseldikçe akümülyasyon değerinde sırasıyla *Salvinia natans*'ta (2530,0-8570,2 μgg^{-1}), *L.minor*'de (657,9-9006,2 μgg^{-1}) düzeyinde belirlenmiş, *Salvinia natans*'ın Pb akümülyasyon yeteneğinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda *A. filiculoides* bitkisi üzerinde 4 farklı ağır metal ile yapılan tespitlerde de bu bitkinin ağır metal akümülyasyon yeteneğinin yüksek olduğu ve elementlerin yüksek miktarlarının bitkide fizyolojik strese sebep verdiği tespit edilmiştir.

Leblebici ve ark. [95] tarafından *Spirodela polyrhiza*'nın Ni ve Cd biyotalınım miktarı incelenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre kadmiyum ve nikelin toksik etkisinin *Spirodela polyrhiza*'da kadmiyum için 8 mg L⁻¹, nikel içinse 20 mg L⁻¹ olduğu gözlenmiştir. Çalışma sonuçlarımızda da; benzer bir durum gözlemlenmiştir. *A. filiculoides* bitkisinde nikel ve kurşun miktarı arttıkça bitki bünyesindeki kurşun ve nikelin biyotalınım miktarında da artış olduğu tespit edilmiştir. Yani konsantrasyonlar arttıkça akümülyasyonda da artış meydana gelmiştir. Sonuç olarak çalışma sonucumuz Leblebici ve arkadaşları [95] tarafından gerçekleştirilen çalışma sonuçlarıyla benzerdir.

Domates fidelerinde Cd'nin antioksidan enzimler ve lipid peroksidasyonuna etkisi üzerine yapılan çalışmada; Cd'nin yüksek konsantrasyonlarının MDA miktarını artırdığı gözlenmiştir. O₂⁻ artışı, biyolojik membranlara zarar verecek şekilde, yağ asitlerini tehlikeli lipid peroksidazlara dönüştüren hidroperoksil radikallerini üretir [76]. Araştırmamızda *A. filiculoides* için lipid peroksidasyon miktarı kontrol grubunda 3,47 nmol/g 8 mg L⁻¹ Cd konsantrasyonunda ise 6,11 nmol/g olarak gözlemlenmiştir. Bu çalışma bizim araştırmamızı desteklemektedir.

DPPH yöntemi araştırmacılar tarafından, gıdalar ve bitkilerden elde edilen ekstraler ya da bileşiklerdeki serbest radikal söndürücü aktiviteyi belirlemesi sebebiyle, sık sık

başvurulan bir yöntemdir [96]. DPPH çözeltilisinde mordan sarıya doğru gerçekleşen renk değişikliğinin derecesi, antioksidanın miktarı ile orantılıdır. DPPH radikalleri üzerinde *Azolla filiculoides* türünden elde edilen etanol ekstralarının serbest radikal yakalama aktivitesi konsantrasyon artışı ile yükselmektedir.

Gülçin ve ark. [97] *Lemna minor*'ün antioksidan özelliği üzerine yaptıkları çalışmada, 45 µg/mL'lik konsantrasyonda *Lemna minor*, α-tokoferol, BHA, BHT ve troloksun linoleik asit emulsiyonunun peroksidasyonunu sırasıyla %100, % 92.2, % 99.6, % 84.6 and % 95.6 inhibe ettiğini gözlemlemişler, Sonuç olarak, bu bitkinin bir doğal gıda antioksidanı olarak umut verdiğini belirtmişlerdir [97]. Çalışmamızda; 1 mg ml⁻¹ konsantrasyonda *A. filiculoides* ortamdaki serbest radikali %100 oranında temizlerken, aynı konsantrasyonda BHA %80, α-tocopherol %74 ve BHT %68 oranında temizlemiştir. Çalışmamızda *A. Filiculoides*'in ortamdaki serbest radikali temizleme aktivitesi daha düşük çıkmıştır.

Türkoğlu ve arkadaşları [98] *L. sulphureus* ile yaptıkları antioksidan ve antimikrobiyal çalışmasında DPPH serbest radikal yakalama aktivitesini 100, 200, 400 ve 800 µg/mL'lik konsantrasyonlarda sırasıyla % 14, % 26, % 55 ve % 86 oranlarında sergilediğini tespit etmişlerdir. Bu çalışmada kullandığımız *Azolla filiculoides* ekstralarının 100, 200 ve 400 µg/mL'lik konsantrasyonlarda sırasıyla %32, %43, %66 oranlarında inhibisyonla aynı konsantrasyonlarda Türkoğlu ve arkadaşları [98] *L. sulphureus* üzerine yaptıkları antioksidan çalışmasındakinden daha iyi bir etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Antioksidan aktivite açısından değerlendirildiğinde bu çalışmada kullanılan *Azolla filiculoides* türünün sentetik antioksidanlar kadar yüksek ya da yakın bir antioksidan aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir.

Günümüzde insanların, biyomolekülleri oksidatif hasardan koruması sebebiyle, organizmanın kendisinin sentezlediği ya da dışarıdan alınan antioksidanlara karşı ilgisi giderek artmaktadır. Araştırmacılar organizmaya zararı olmayan ve antioksidan aktivitesi yüksek olan sentetik bileşiklerin arayışı içerisine girmektedir. Sentetik antioksidanlar doğal antioksidanların sadece bir tipini oluşturmaktadırlar. Doğal

antioksidanın en etkin tipini taklit edecek şekilde geliştirilmektedirler. Örneğin E vitamininin doğada 4 farklı tipde bulunduğu bilinmektedir. Bunlar α , β , γ ve δ formlarıdır. Antioksidanlar, lipid oksidasyonunu engellemekte veya geciktirmektedirler. Gıdaların kalitesini korumakta hem de raf ömrü uzamaktadır. Bu amaçla gıdalara bütillenmiş hidrokşianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve tersiyer bütihidroksikinon (TBHQ) gibi sentetik antioksidanlar ilave edilmektedir. Günümüzde besin ve ilaçlara ilave edilen stabilize edici sentetik antioksidan bileşiklerin kullanımı zararlı etkilerinden dolayı yasal olarak sınırlanmakta ve bunların yerine doğal antioksidan bileşikler tercih edilmektedir. Ayrıca sentetik antioksidanların akciğer, karaciğer ve bağırsak hasarlarına neden olduğu [99] ve kanser yapma etkisine sahip olduğu gözlenmiş ve bu nedenle doğal antioksidanlara olan ilgi artmıştır. Sentetik ürünler yerine doğal ürünlerin kullanılmasına yönelik isteğin artması bitkiler üzerindeki çalışma sayısının artmasına neden olmaktadır.

Bu çalışmada *Azolla filiculoides* ekstrelerinin 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,5, 1 mg ml⁻¹ 'lik konsantrasyonları için DPPH serbest radikali temizleme aktivitesi sırasıyla %28, %32, %43, %66, %82 ve %100 olarak bulunmuştur. IC₅₀ değeri hesaplanmış ve *Azolla filiculoides* için 0,27 mg ml⁻¹ olarak bulunmuştur.

Fe⁺³ ün Fe⁺²ye dönüştürebilmesi bir bileşiğin indirgeme kapasitesini ifade etmektedir. Bir bileşiğin indirgeme kapasitesi o bileşiğin antioksidan etkiye sahip olduğunun önemli bir göstergesidir. Bu yöntemde sarı renkte olan çözelti karışımı, reaksiyonun gerçekleşmesi ile Prusya mavisine dönüşmektedir [100].

Bu çalışmada *Azolla filiculoides* ekstrelerinin 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,5, 1 mg ml⁻¹ 'lik konsantrasyonları için metal şelatlama aktivitesi sırasıyla %38, %37, %39, %46, %62, %91 olarak bulunmuştur. IC₅₀ değeri hesaplanmış ve *Azolla filiculoides* için 0,34 mg ml⁻¹ olarak bulunmuştur.

Çalışmada kullanılan *Azolla filiculoides* ekstrelerinin farklı konsantrasyonlarının metal şelatlama aktivitelerine bakıldığında her ekstre için konsantrasyon oranı arttıkça aktivite oranının da yükseldiği tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan *Azolla filiculoides*

türünün metal şelatlama aktiviteleri için etanol ekstraları kıyaslandığında en yüksek oranı %91 olarak 1 mg ml⁻¹'lik konsantrasyonda göstermiştir.

β -karoten yağda çözünen bir pigmenttir ve yağda çözünen Vit-A'nın hammaddesi olmaktadır. Oksidasyon ile oluşan serbest radikalleri scavenging etki ile süpürerek oksidasyonun neden olduğu hastalıklara karşı korumaktadır. Aynı zamanda immün sistemi düzenleyici bir etkiye sahiptir. Bu çalışmada *Azolla filiculoides* türünün β -karoten içeriği 0,478 μ g/mg, olarak tespit edilmiştir.

Likopen koyu kırmızı renkte olan pigmentlerden biridir. Karotenoid gruplar domatesin kırmızı rengini etkilemektedir. Karotenoid bileşikler yüksek antioksidan gücü olan bileşikler olarak bilinmektedir. Bu bileşik kirlilik ve UV ışınlarından kaynaklanan serbest radikallerle savaşmaktadır. Çalışmamızda *Azolla filiculoides* türünün Likopen miktarı 0,074 μ g/mg bulunmuştur.

Gülçin ve ark. [97] *Lemna minor*'ün antioksidan özelliği üzerine yaptıkları çalışmada bitkinin toplam fenol içeriğini 20 μ g/mg tespit etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada *Azolla filiculoides* türünün toplam fenolik madde miktarı ortalama 367,9 μ g/mg değerinde ve *L. minor*'e oranla yüksek bulunmuştur.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçları değerlendirdiğimizde;

- *A. filiculoides* bitkisine uygulanan As, Pb, Ni ve Cd ağır metallerinin yüksek konsantrasyonlarının lipit peroksidasyonu ve bitkinin büyümesi üzerine olumsuz yönde etki ettiği, bitkilerde strese sebep olduğu,
- *A. filiculoides* bitkisine uygulanan ağır metallerin bu bitki üzerinde farklı fizyolojik etkilere ve farklı akümülyasyon oranına sebep olduğu,
- Uygulanan ağır metalleri bünyesinde akümüle edebilme özelliğine sahip olduğu için *A. filiculoides* 'in iyi bir biyolojik indikatör olduğu,
- *A. filiculoides* 'in ağır metallerle kirlenmiş sucul ortamlarda bitkisel arıtım amaçlı kullanılabileceği ve bu bağlamda çalışmamızın bitkisel arıtım çalışmalarına örnek oluşturacağı sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Topçu, S., “Tarım Mühendisliğinde Çevre Sorunları”, *Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Genel Yayın*, No: 207, Ders Kitapları Yayın No: A-65, 269s, 1998.
2. Akman, Y., Ketenoğlu, O., Evren, H., Kurt, L., Düzenli, S., “Çevre Kirliliği”, *Palme Yayıncılık Yayın No: 166*, 64-65, 2000.
3. Jerome, O., Nriagu, Global., “Metal Pollution: Poisoning the Biosphere?” *Journal Environment: Science and Policy for Sustainable Development*, 32 (7), 1990.
4. Okcu, M., Tozlu, E., Kumlay, A.M., Pehlivan M., “Ağır metallerin bitkiler üzerine etkileri”, *Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Erzurum*, Iğdır Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Iğdır, 1307-3311, 2009.
5. Gadd, G. M., “Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal obilization and immobilization”, *Current opinion in biotechnology*, 271-279, 2000.
6. Hamutoğlu, R, Dinçsoy,A. B., Cansaran-Duman D, Aras S., “Biyosorpsiyon, adsorpsiyon ve fitoremediasyon yöntemleri ve uygulamaları”, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69(4), 235-53, 2012.
7. Taylan, Z. S., Böke Özkoç, H., “Potansiyel ağır metal kirliliğinin belirlenmesinde akuatik organizmaların biokullanılabilirliği”, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(2), 17-33, 2007.
8. St-Cyr, L., Campbell, P,G,C, Guertin, K., “Evaluation of the role of submerged plant beds in the budget of a fuvial lake”, *Hydrobiologia*, 291, 141-156, 1994.
9. Herpin, U., Berlekamp J., Markert B., Wolterbeek B., Grodzinska K., Siewers U., Lieth H., Weckert V., “The distribution of heavy metals in a transect of the three states the Netherlands, Germany and Poland, determined with the aid of moss monitoring”, *The Science of the Total Environment*, Vol. 187, 185-198, 1996.
10. Martin, M. J., Coughtrey, P. J., “Biological monitoring of heavy metal pollution”, *Land and Air Applied Science Publishers*, England, 1985.
11. Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S., “Metallerin Çevresel Etkileri I”, *İTÜ, Metalürji ve Malzeme Müh. Bölümü, Metalurji Dergisi*, 136, İstanbul 47-53, 2004.

12. Yıldız, N., “Toprak ve bitki ekosistemindeki ağır metaller”, Yüksek Lisans Ders Notları. *Erzurum*, ZT-531, 2004.
13. Jung, M.C., Thornton, I., Chon, H.T., “Arsenic, Sb and Bi contamination of soils, plants, waters and sediments in the Vicinity of the Dalsung CuW mine in Korea”, *The Science of the Total Environment*, 295, 81-89, 2002.
14. Çınar, Ö., “Çevre kirliliği ve kontrolü”, yayın no 1331, s. 101, 2008.
15. Merian, E., “Metals and Their Compounds in the Environment”, *VCH, Weinheim*, 1991.
16. Klassen, C.D., Amdur, M.O., Doull, J., “Toxicology”, 3th Ed. *Macmillan Publishing Company*, Nevyork, USA, 1986.
17. Bigersson, B., Sterner, O., Zimerson, E., Chemie und Gesundheit “Eine verstdliche einführung in die toxikologie”, *VCH Verlagsgesellschaft*, 3-527-26455-8, 1988.
18. John H. Duffus, Howard G.J. Worth, “Fundamental toxicology for chemists”, *Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry Information Services*, 1996.
19. Markert, B., “Plants as biomonitors: indicators for heavy metals in the terrestrial environment”, *VCH Publishar*, 1993.
20. Thornton I., “Metals in the Global Environment—Facts and Misconceptions”, ISBN/ISSN, 1-895720-09-5, ICME, Ottawa, 1995.
21. Jarup, L., “Hazards of Heavy Metal Contamination” *British Medical Bulletin*, 68: 167-182, 2003.
22. Mertz, W., “Trace elements in human and animal nutrition”, 5th Ed. Vol. II. *Academic press, Inc, USA*, 1986.
23. Angioni, A., Cabitza, M., Russo, M.T., Caboni, P., “Influence of olive cultivars and period of harvest on the contents of Cu, Cd, Pb and Zn in virgin olive oils”, *Food Chemistry*, 99, 525-529, 2006.
24. IARC (International Agency for Research on Cancer), “Arsenic, Metals, Fibres and Dusts”, IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Hum., 100C, 41-85, 2012.
25. Denizli, A., Yavuz H., “Ağır Metal Toksikolojisi”, *Standard Ekonomik ve Teknik Dergi*, 477, 76-82, 2001.

26. Uluözlü, Ö.D., “Bazı eser elementlerin zenginleştirilmesi, türlendirilmesi ve biyosorbisyonu”, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Doktora Tezi, Tokat, 2010.
27. Bobak, M., “Ultrastructure changes of the nucleus and its components in meristematic root cells of the horse-bean after zinc intoxication”, *Physiol. Plant.*, 15, 31–36, 1985.
28. Bekiaroglou, P., Karataglis, S., “The effect of lead and zinc on *Mentha spicata*”, *Journal of Agronomy Crop Science*, 188, 201-205, 2002.
29. Lyons-Alcantara, M., Tarazona J.V. and Mothersill C., “The differential effect of cadmium exposure on the growth and survival of primary and established cells from fish and mammals”, *Cell Biol. and Toxicol.*, 12: 29-38, 1996.
30. Jiang, W.Z. and Li J.L., “Effects of cadmium on photosynthetic characteristics of tobacco”, *Plant Physiology Communications*, 6: 27-31, 1989.
31. Çatak, E., Güler Ç., Süleyman T. ve Orhan B., “Bazı domates ve tütün genotiplerinde kadmiyum etkilerini inceleyen istatistiksel bir çalışma”, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2 (1), 2000.
32. Haktanır, K., “Çevre kirliliği”, *A.Ü. Ziraat Fakültesi Ders Notu*, Teksir no 140, 1987.
33. Massoud, A.K.S., Ezzat, A.A., El-Rayis, O.A., Hayez, H., “Occurrence and distribution of chemical pollutants in lake maruit, Egypt. II. Heavy Metals”, *Water, A.R. and Soil Pollution*, 16, 401-407, 1981.
34. Çalışkan, E., “Asi Nehrinde Su, Sediment ve Karabalık'ta Ağır Metal Birikiminin Araştırılması”, *Mustafa Kemal Üniversitesi*, Yüksek Lisans Tezi, , Hatay, 2005.
35. Salt, D., et al., “Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard”, *Plant Physiol.*, 109, 1427-1433, 1995.
36. Aberhart, A.R., Larson, G.L., Mathews, J.R., “Heavy metals in surficial sediments of fontana lake”, *North Carolina*, 18, (13), 351-354, 1984.
37. Eduljee, G. Badsha, K., Price, L., “Environmental monitoring and heavy metals in the vicinity of a chemical waste disposal facility-1”, *Chemosphere*, 14, (9), 1371-1382, 1985.

38. Henry, J., “An overview of the phytoremediation of lead and mercury”, *U.S. EPA*, Office of Solid Waste and Emergency Response Technology Innovation Office, 51 p, 2000.
39. Sutherson, S., “Phytoremediation” “Remediation engineering: design concepts”, (ed.). *CRC Press LLC*. Boca Raton, 1999,
40. Yıldız, S., “Nişasta sanayi atıksularının bitkisel iyileştirilmesi (fitoremediasyon) kapasitesine mikorizal simbiyozun etkilerinin araştırılması”, *Çukurova Üniversitesi Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı*, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 2008.
41. EPA (Environmental Protection Agency), “Introduction to phytoremediation, EPA/600/R-99/107, National Risk Management Research Laboratory Office Of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency Cincinnati”, *Ohio* 45268, USA, 2000.
42. Padmavathiamma, P. K. ve Loretta, Y.L., “Phytoremediation technology: hyper-accumulation metals in plants”, *Water Air Soil Pollution*, 184, 105126, 2007.
43. Bert, V., Girondelot, B., Quatannens, V. ve Laboudigue, A., “A phytostabilisation of a metal polluted dredged sediment deposit mesocosm experiment and field”, Trial. In: Uhlmann, O., Annokée, G.J. ve Arendt, F. (eds.), *Proceedings of the 9th International FZK/TNO Conference on Soil–Water Systems, Remediation Concepts and Technologies*. Bordeaux, pp. 1544-1550, 2005.
44. Söğüt, Z., ve ark., “Su kalitesinin artırılmasında bitki kullanımı (yeşil ıslah-Phytoremediation)”, *Çukurova Üniversitesi*, Adana, 2004.
45. Vesely. T., Tlustos, P., Szakova J., “The use of water lettuce (*Pistia stratiotes* L.) for rizofiltration of a highly polluted solution by cadmium and lead”, *International Journal of Phytoremediation*, 13:859-872, 2011.
46. Mishra VK, Upadhyaya AR, Pandey SK, Tripathi BD., “Heavy metal pollution induced due to coal mining effluent on surrounding aquatic ecosystem and its management due through naturally occurring aquatic macrophytes”, *Bioresour Technol.*, 99(5): 930-936, 2008.
47. WHO., “Trace Elements in Human Nutrition And Health” *World Health Organization* Geneva 1996,

48. European Commission., DG ENV. E3 Project ENVE. 3/ETU/2000/0058, “Heavy Metals in Waste”, *Danimarka*, February 2002.
49. Cha, J.W., Kim, B.W., “Ecological studies of plants for the control of environmental pollution, IV. Growth of various plant species as influenced by soil-applied cadmium”, *Kor. J. Bot.*, 18,23-30, 1975.
50. Lichtenthaler, H.K., “The stress concept in plants: An introduction”, *Ann. NY. Acad. Sci.*, 851, 187-198, 1998.
51. Doğan, M., “Akuatik makrofitlerde ağır metal akümülyasyonu”, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 4 (2):33-36, 2011.
52. Tester, M., Leigh, R.A., “Partitioning of nutrient transport processes in roots”, *J. Exp. Bot.*, 52, 445-457, 2001.
53. Harrison, R.M., Chirgawi, M.B., “The assessment of air and soil as contributors of some trace metals to vegetable plants I. Use of a filtered air growth cabinet”, *Sci. Total Environ.*, 83, 13-34, 1989.
54. Godzik, B., “Heavy metals content in plants from zinc dumps and reference area”, *Pol. Bot. Stud.*, 5, 113-132, 1993.
55. Seregin, I.V., Ivaniov, V.B., “Histochemical investigation of cadmium and lead distribution in plants”, *Fiziol. Rast.*, 44, 915-921, 1997.
56. Aruma, G.I., Spencer, J.P.E., Warren, Q.D., Jenner, P., Butler, P., Halliwell, B., “Characterization of food using commercial garlic antioxidants”, *Illustrated and Food Chemistry*, 60: 149-156, 1997.
57. Karadağ, A., Özçelik, B., Saner, S., “Review of methods to determine antioxidant capacities”, *Food Analytic Methods*, 2:41–60, 2009.
58. Halliwell, B., Murcia, M.A., Chirico, S., Aruoma, O.I., “Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work”, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35: 7, 1995.
59. Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., “The chemistry behind antioxidant capacity assays”, *J. Agric. Food Chem.* 53:1841, 2005.
60. Gökpınar, S., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., Durmaz, Y., “Algal antioksidanlar”, *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 23: 85-89, 2006.

61. Surveswaran, S., Cai, Y.Z., Corke, H., Sun, M., “Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants”, *Food Chemistry*, 102(3), 938-953, 2007.
62. Aydın, H., “Bazı baharatların farklı ekstraktlarının antioksidan özelliklerinin belirlenmesi”, *Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi*, 2011.
63. Pradedova, E., Isheeva, O., Salyaev, R., “Classification of the antioxidant defense system as the ground for reasonable organization of experimental studies of the oxidative stress in plants”, *Russian Journal of Plant Physiology*, 58(2): 210-217, 2011.
64. Antolowich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K., “Methods for testing antioxidant activity”, *Analyst*, 127(1): 183-198, 2002.
65. Fridovich, I., Darr, D., “Adaptation to oxidative stress in young, but not in mature or old, *Caenorhabditis elegans*”. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(2): 195-201, 1995.
66. Halliwell, B., “Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?”, *The Lancet*, 344(8924): 721-724, 1994.
67. Wu, G., Wei, Z.K., Shao, H.B., “The mutual responses of higher plants to environment: Physiological and microbiological aspects”, *Biointerfaces*, 59:113-9, 2007.
68. Can, A., Özçelik, B., Güneş, G., “Meyve sebzelerin antioksidan kapasiteleri”, *GAP IV. Tarım Kongresi Bildirileri*, 2005.
69. Shi, H., Noguchi, N., Niki, E., “Introducing natural antioxidants”. In J. Pokorny, N. Yanishlieva and M. Gordon (eds), *Antioxidants in food*. CRC Press, USA, 2001.
70. Maslarova, N.V.Y., “Inhibiting oxidation”, In J. Pokorny, N. Yanishlieva, and M. Gordon (eds), *Antioxidants in food*. CRC Press, USA, 2001.
71. Singh, A.L., Singh, P.L., “Nitrogen fixation in Indian rice fields (*Azolla* and blue green algae)”. Bikana, India: *Agrobotanical Publisher*, 1989.
72. Raja, W., Rathaur, P., John, S.A., Ramteke, P.W., “*Azolla-Anabaena* Association and Its Significance In Supportable Agriculture”, *Hacettepe J. Biol. & Chem.*, 40 (1): 1–6, 2012.

73. Rahman, M. A., Hasegawa, H., “Aquatic arsenic: phytoremediation using floating macrophytes”, *Chemosphere*, 83, p. 633-46, 2011.
74. Vaseem, H., Banerjee, T. K., “Phytoremediation of the Toxic Effluent Generated During Recovery of Precious Metals from Polymetallic Sea Nodules”. *International Journal of Phytoremediation*, 14, p.457-66, 2012.
75. Rofkar, J. R., Dwyer, D. F., Bobak, D. M., “The potential of two plant species, *Phragmites australis* (common reed) and *Typha latifolia* (cattail), in the phytoremediation process of selenium (Se) was studied in subsurface-flow constructed wetland (SSF)”, *International Journal of Phytoremediation* 16, p. 155-66, 2014.
76. Dong, J., Wu F., Zhang, G., “Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*)”, *Chemosphere*, 64 (10), 1659-1666, 2006.
77. Özbay, H., “Kırmızı Eğrelti *Azolla*: Biyolojisi ve Tarımda Kullanımı”, *Kafkas Üniversitesi, Fen -Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kars.* 552-563, 2004.
78. Kösesakal, T., “*Azolla–Anabaena* Ortaklığının Biyolojisi”, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 6 (2): 38-44, 2013.
79. Ladha, JK., Watanabe I., “Antigenic Similarity among *Anabaena–azollae* separated from different species of *Azolla*”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 109: 675 682, 1982.
80. Maejima, K., Uheda, E., Shiomi, N., Kitoh, S., “Relationship between nitrogen fixation and numbers of cyanobionts and heterocysts in fifteen *Azolla* strains”, *Soil. Sci. and Plant Nut.*, 48 (3): 447-449, 2002.
81. Van Hove, C., Lejeune, A., “The *Azolla– Anabaena* symbiosis”, *Biology and Environment: Proceedings Of The Royal Irish Academy*, 102B (1): 23-26, 2002.
82. Nyalemegbe, K., Oteng, J.W., Ahiabu, R.K., “The utilization of *Azolla* as a source of nitrogen for rice production in Ghana”, *Ghana Jnl agric, Sci.*, 29: 125-129, 1996.
83. Singh, A.L., Singh, P.L., “Nitrogen fixation in Indian rice fields (*Azolla* and blue green algae)”, *Bikana, India: Agrobotanical Publisher*, 44, 6 (2): 38-44, 2013.

84. Raja W, Rathaur P, John SA, Ramteke P.W., “Azolla-Anabaena Association and Its Significance In Supportable Agriculture”, *Hacettepe J. Biol. & Chem.*, 40 (1): 1–6, 2012.
85. Ünal, M., Üzen, E., “A New Aquatic Fern Record For The Flora of Turkey: *Azolla filiculoides* Lam”., *Turkish Journal of Botany*, 20: 379-381, 1996.
86. Hunt, R., “Plant growth analysis, studies in biology”, Edward Arnold Ltd., London, 67, 1978.
87. Heath, R.L., Packer, L., “Photoperoxidation in isolated chloroplast I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 25, 189-198, 1968.
88. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., “Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity”, *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologies*, 28: 25-30, 1995.
89. Decker, E. A., Welch, B., “Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38: 674-677, 1990.
90. Singleton, V.L., Rossi, J.A., “Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents”, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158, 1965.
91. Nagata, M., Yamashita, I., “Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit”, *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaish*, 39: 925-928, 1992.
92. Leblebici, Z. and Aksoy, A., “Growth and heavy metal accumulation capacity of *Lemna minor* and *Spirodela polyrhiza* (Lemnaceae): Interactions with nutrient enrichment”, *Water Air and Soil Pollution*, 214, 175-184, 2011.
93. Duman, F., Leblebici, Z., Aksoy, A., “Bioaccumulation of nickel, copper, and cadmium by *Spirodela polyrhiza* and *Lemna gibba*”, *Journal of Freshwater Ecology*, 24, 177-179, 2009.
94. Yalçın, V., “Bazı ağır metallerin (Pb, Cd, Ni) sucul bitkiler (*Salvinia natans*, *Lemna minor*) üzerinde yaptığı stres ve biyolojik yanıtlar”, *Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi*, Nevşehir, 2014.

95. Leblebici, Z., Aksoy, A. and Duman, F., "Influence of salinity on the growth and heavy metal accumulation capacity of *Spirodela polyrhiza* (Lemnaceae)", *Turkish Journal of Biology*, 35 (2), 215-220, 2011.
96. Scalzo, R.L., "Organic acids influence on DPPH scavenging by ascorbic acid", *Food Chem.*, 107, 40–43, 2008.
97. Gulcin, İ., Kirecci, E., Akkemik, E., Topal, F., Hisar, O., "Antioxidant, antibacterial, and anticandidal activities of an aquatic plant: duckweed (*Lemna minor* L. Lemnaceae)", *Turk J Biol.* 34:175-188, 2010.
98. Turkoglu' A., Mehmet Emin Duru' M.E., Mercan, N., Kivrak, I., Gezer, K., "Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill", *Food Chemistry*, 101(1): 267-273, 2007.
99. Wanasundara, U.N., Shahidi, F., "Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils", *Food Chemistry*, 63: 335-342, 1998.
100. Stamets, P., "Mycelium running", 1st ed. Ten speed press, *Berkeley*, 339 pp., 2005.

ÖZGEÇMİŞ

Yahya LEBLEBİCİ 1980 yılında Kayseri’de doğdu. İlk ve orta öğrenimini Kayseri’de tamamladı. 1999’da kazandığı Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2005 yılında mezun oldu. 2014 yılında Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalında Yüksek Lisansa başladı. 2004 yılından itibaren iş hayatına devam etmektedir. Evli ve 2 çocuk babasıdır.

Adres: Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Lojmanları, C Blok Kat 4,
Daire:20 38039 - Nevşehir

Telefon: 05333902949

e-posta : yyleblebici@hotmail.com