

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2015-YL-000

**İKİ FARKLI BİRYOFİT TÜRÜNÜN FOTOSENTETİK
PİGMENT İÇERİĞİ VE ANTIOKSİDAN MEKANİZMASI
ÜZERİNE AĞIR METALLERİN (BAKIR VE KURŞUN)
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

İlknur KUZU

Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Bengi ERDAĞ

AYDIN

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi İlkur KUZU tarafından hazırlanan “İki farklı Biryofit türünün fotosentetik pigment içeriği ve antioksidan mekanizması üzerine ağır metallerin (Bakır ve Kurşun) etkisinin araştırılması” başlıklı tez, 19.01.2015 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan Üye	: Doç. Dr. Bengi ERDAĞ	ADÜ
Üye	: Doç. Dr. Lale YILDIZ AKTAŞ	Ege Üniversitesi
Üye	: Doç. Dr. Mesut KIRMACI	ADÜ

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu yüksek lisans tezi, Enstitü Yönetim KurulununSayılı kararıylatarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Aydın ÜNAY
Enstitü Müdürü

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

...../...../20...

İlknur KUZU

ÖZET

İKİ FARKLI BİRYOFİT TÜRÜNÜN FOTOSENTETİK PİGMENT İÇERİĞİ VE ANTIOKSIDAN MEKANİZMASI ÜZERİNE AĞIR METALLERİN (BAKIR VE KURŞUN) ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

İlknur KUZU

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Bengi ERDAĞ

2015, 57 sayfa

Bu çalışmada *Brachytheciaceae* familyasına ait *Homalothecium sericeum* (Hedw.) Schimp. ve *Hypnaceae* familyasına ait *Hypnum cupressiforme* Hedw. türlerinde ağır metal uygulaması ile meydana gelen kısa süreli tepkiler fizyolojik ve biyokimyasal parametreler ışığında değerlendirilmiştir. Arazi çalışmasında toplanan bitkiler uygun torbalara alınarak laboratuvar ortamına getirilmiştir. Yıkama işleminin ardından biryofit türleri uygun muamele ortamları hazırlanarak Cu ve Pb içeren çözeltilerde kültüre alınmıştır. İki biryofit türü için; ağır metal biriktirme düzeyleri, kuru ağırlıkları, fotosentetik pigment analizi, hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarı tayini, lipid peroksidasyonu, antioksidan enzimler (süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz, askorbat peroksidaz) ve enzimatik olmayan antioksidant moleküllerden (askorbat ve prolin) miktarları çalışılmıştır. Her iki türünde maruz kaldıkları metalleri bünyelerinde belirli oranlarda biriktirdikleri belirlenmiştir. *Hypnum cupressiforme*'nin Cu uygulanmış örneklerinde süperoksit dismutaz, peroksidaz aktivitesinde artışlar meydana gelirken askorbat miktarında anlamlı bir değişim görülmemiştir. Katalaz aktivitesinde meydana gelen azalmanın nedeni olarak bakır katyonları gibi ağır metal iyonlarının katalaz'ın yarayışlı olmayan inhibitörleri gibi davranıp enzim aktivitesini durdurmasındandır. *Homalothecium sericeum*'un Pb uygulanmış örneklerinde pigment degradasyonu ve H_2O_2 birikiminin olmaması askorbat peroksidaz ve katalaz aktivitesinin H_2O_2 'nin detoksifikasyonunda etkili olduğunun ya da bu metalin hücreyi aşırı strese sokacak oksidatif hasarı tetiklemediğinin göstergesi de olabilir.

Anahtar kelimeler: *Homalothecium Sericeum*, *Hypnum Cupressiforme*, Ağır Metal, Stres, Antioksidan

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE IMPACT OF HEAVY METALS (COPPER AND LEAD) ON THE PHOTOSYNTHETIC PIGMENT CONTENT AND ANTIOXIDANT MECHANISM OF TWO DIFFERENT BRYOPHYTE SPECIES

İlknur KUZU

M. Sc. Thesis, Biology Department
Supervisor: Associate Prof. Dr. Bengi ERDAĞ
2015, 57 pages

In this study, short term reactions caused by heavy metal administration was evaluated in light of physiological and biochemical parameters on types of *Homalothecium sericeum* (Hedw.) Schimp. which belongs family of Brachytheciaceae and *Hypnum cupressiforme* Hedw. which belongs family of Hypnaceae. The plants collected in the field work has been brought to the laboratory on the appropriate bag. After appropriate treatment of the washing operation bryophyte species prepared media were cultured in solutions containing Cu and Pb. Heavy metal deposition levels, dry weight, photosynthetic pigments analysis, hydrogen peroxide (H₂O₂) content determination, lipid peroxidation and antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, peroxidase, ascorbate peroxidase) non –enzymatic antioxidant molecules (ascorbate and proline) quantity were studied for the types of bryophyte. Both type of the metal structure are exposed is determined that accumulate in specific proportions. Activity of superoxide dismutase and peroxidase has been increased in spite of there is no significant change was not seen ascorbate values on Cu applied samples of *Hypnum cupressiforme* as the cause of the decrease in the catalase enzyme activity such as catalase activity is from stopping act by plants inhibitors of non-heavy metal ions such as copper cations. Pb applied samples of *Homalothecium sericeum*, The absence of H₂O₂ accumulation of ascorbate peroxidase and catalase activities effect on pigment degradation and H₂O₂ detoxification or this metals can be indicator of oxidative damages that will cause excessive stress on cells.

Key Words: *Homalothecium sericeum*, *Hypnum cupressiforme*, heavy metal, stress, antioxidant

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince engin bilgilerinden yararlandığım, bana her konuda sonsuz sabırla destek olan danışman hocam Doç. Dr. Bengi ERDAĞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmalarımız sırasında türlerin toplanması ve tanımlanmasında aynı zamanda bir çok konuda derin bilgilerinden faydalandığım hocam Prof. Dr. Adnan ERDAĞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma sürecim boyunca bilgilerinden yararlandığım Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı öğretim üyesi hocam Lale YILDIZ AKTAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresi boyunca bana laboratuvarlarında çalışma fırsatı sunan, Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Gönül AYDIN, Arş. Gör. Dr. Mustafa Ali KAPTAN, Arş. Gör. Seçil KÜÇÜK ve Biyolog Ersin KARADEMİR'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam süresi boyunca yardımlarını esirgemeyen, araştırmalarımın her aşamasında bana yardımcı olan, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Arş. Gör. Dr. Yelda EMEK'e teşekkürlerimi sunarım

Çalışmam süresi boyunca benden yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Mithat Evrim DEMİR ve Arş. Gör. Rukiye YAVAŞER'e teşekkür ederim.

Araştırma süresi boyunca laboratuvarında beraber çalıştığım, her türlü yardım ve desteğini gördüğüm dostum Biyolog Münire Nihan BAĞDATLI'ya teşekkür ederim.

Tez süresi boyunca olanaklarından yararlanma imkanı bulduğum Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne teşekkür ederim.

Doğduğum andan bugüne beni yetiştiren, sonsuz desteğiyle her zaman yanımda olan bana her konuda destek veren Aileme ve Hayat Arkadaşım Samet KARABULUT'a sonsuz teşekkürlerimle...

İlknur KUZU

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxi
1. GİRİŞ	1
1.1. Stres	1
1.2. Ağır Metaller	1
1.3. Serbest Radikaller	3
1.4. Antioksidant Sistemler	6
1.5. Ağır Metallerin Alınım Mekanizmaları	12
2. KAYNAK ÖZETLERİ	14
3. Materyal ve YÖNTEM	17
3.1. MATERYAL	17
3.2. YÖNTEM	19
3.2.1. Bitkilerin toplanması ve izolasyonu	19
3.2.2. Ağır Metal Uygulanması	19
3.2.3. Ağır Metal Birikim Düzeyi	20
3.2.4. Kuru Ağırlık Tayini	20
3.2.5. Fotosentetik Pigment Analizi	20
3.2.6. Lipit Peroksidasyonu.	20
3.2.7. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Miktarı Tayini	21

3.2.8. Enzim Ekstraklarının Hazırlanması	21
3.2.9. Çözünebilir Protein Miktarının Belirlenmesi	21
3.2.10. Süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) Aktivitesinin Belirlenmesi.....	22
3.2.11. Peroksidaz (PO; E.C.1.11.1.7) Aktivitesinin Belirlenmesi	22
3.2.12. Katalaz (KAT; (EC 1.11.1.6) Aktivitesinin Belirlenmesi	22
3.2.13. Askorbat peroksidaz (APX; EC 1.1.1.11) Aktivitesinin Belirlenmesi	22
3.2.14. Askorbat Miktarı Tayini	22
3.2.15. Prolin Miktarı Tayini	23
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.	24
4.1. Ağır Metal Birikim Düzeyinin Belirlenmesi	24
4.2. Kuru Ağırlık	25
4.3. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Miktarı.	26
4.4. Lipit Peroksidasyonu	27
4.5. Fotosentetik Pigment Analizi	28
4.6. Protein Miktarları	31
4.7. Süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) Aktivitesi.	32
4.8. Katalaz (KAT; (EC 1.11.1.6) Aktivitesi	33
4.9. Peroksidaz (PO; E.C.1.11.1.7) Aktivitesi	34
4.10. Askorbat peroksidaz (APX; EC 1.1.1.11) Aktivitesi.....	35
4.11. Askorbat Miktarı	36
4.12. Prolin Miktarı.	36
5. SONUÇ.	38
KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇMİŞ.....	55

SİMGELER DİZİNİ

APX	Askorbat peroksidaz
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
GR	Glutasyon redüktaz
G	Gram
GSH	İndirgenmiş glutasyon
GSSG	Yükseltgenmiş glutasyon
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
KAT	Katalaz
L	Litre
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
mL	Mililitre
µg	Mikrogram
µM	Mikromol
M	Molar
MDHA	Monodihidroaskorbat
OH [·]	Hidroksil radikali
O ₂ ^{·-}	Süperoksit radikali
PMSF	Fenil metil sulfonil florid
ppm	Parts per million
PO	Peroksidaz
PVPP	Polivinil poliprolidon
ROT	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
TBA	Tiyobarbütirik asit
TCA	Trikloroasetik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Ağır metaller tarafından aktif oksijen türlerinin oluşumu.....	9
Şekil 3.1. Hypnum cupressiforme'nin genel bir görüntüsü.....	18
Şekil 3.2. Homalothecium sericeum'un genel bir görüntüsü	19
Şekil 4.1. BSA (Bovine Serum Albumin) standartları kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi	32

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. <i>Homalothecium sericeum</i> ve <i>Hypnum cupressiforme</i> ' de ağır metal birikimi	24
Çizelge 4.2. Ağır metal uygulanan <i>Homalothecium sericeum</i> ve <i>Hypnum cupressiforme</i> ' nin kuru ağırlıkları	26
Çizelge 4.3. Ağır metal uygulanan <i>Homalothecium sericeum</i> ve <i>Hypnum cupressiforme</i> ' nin H ₂ O ₂ miktarları.....	26
Çizelge 4.4. Ağır metal uygulanan <i>Homalothecium sericeum</i> ve <i>Hypnum cupressiforme</i> ' nin oluşan malonildialdehit miktarları	27
Çizelge 4.5. Ağır metal uygulanan <i>Homalothecium sericeum</i> 'un klorofili <i>a,b</i> Total klorofil ve klorofil <i>a/b</i> miktarındaki değişimler	28
Çizelge 4.6. Ağır metal uygulanan <i>Hypnum cupressiforme</i> 'nin klorofili <i>a,b</i> Total klorofil ve klorofil <i>a/b</i> miktarındaki değişimler	29
Çizelge 4.7. Ağır metal uygulanan <i>Homalothecium sericeum</i> 'un total karotenoid, β -Karoten, lutein, neoksantin pigment miktarındaki değişimler	30
Çizelge 4.8 Ağır metal uygulanan <i>Hypnum cupressiforme</i> 'nin total karotenoid, β -Karoten, lutein, neoksantin pigment miktarındaki değişimler.....	31
Çizelge 4.9. Ağır metal uygulanan <i>Homalothecium sericeum</i> ve <i>Hypnum cupressiforme</i> ' nin oluşan protein miktarları.....	32
Çizelge 4.10. Ağır metal uygulanan <i>Homalothecium sericeum</i> ve <i>Hypnum cupressiforme</i> ' nin SOD enzim spesifik aktiviteleri.....	33
Çizelge 4.11. Ağır metal uygulanan <i>Homalothecium sericeum</i> ve <i>Hypnum cupressiforme</i> ' nin CAT enzim spesifik aktiviteleri.....	34
Çizelge 4.12. Ağır metal uygulanan <i>Homalothecium sericeum</i> ve <i>Hypnum cupressiforme</i> ' nin POX enzim spesifik aktiviteleri	35
Çizelge 4.13. Ağır metal uygulanan <i>Homalothecium sericeum</i> ve <i>Hypnum cupressiforme</i> ' nin APEX enzim spesifik aktiviteleri	35
Çizelge 4.14. Ağır metal uygulanan <i>Homalothecium sericeum</i> ve <i>Hypnum cupressiforme</i> ' nin Askorbat miktarları	36

Çizelge 4.15. Ağır metal uygulanan *Homalothecium sericeum* ve *Hypnum cupressiforme*' nin prolin miktarla.....37

1. GİRİŞ

1.1. Stres

Bitkiler en iyi gelişimi kendileri için optimum olan koşullarda gösterirler. Normal metabolizmanın esnekliğine bağlı olarak, bitkiler günlük ve mevsimlik değişimler karşısında büyümelerini devam ettirebilmelerine rağmen, beklenmedik bir koşula sürekli veya zaman zaman maruz kalmaları sonucunda, gelişmelerini ve hayatta kalmalarını etkileyecek hasarlar ve fizyolojik değişimler meydana getirebilirler (Shao vd., 2008). Bitkilerde elverişsiz şartlara sebep olan, gelişimi ve fizyolojik olayları etkileyen ve/veya yavaşlatan ve durdurabilen çevresel faktörlerin tümüne ‘stres’ adı verilir.

Bitkileri etkileyen stres faktörleri biyotik ve abiyotik olmak üzere ikiye ayrılır. Biyotik stres faktörleri bitkiler, hayvanlar ve antropojenik etkiler iken abiyotik stres faktörlerini ise radyasyon, sıcaklık, kuraklık, tuzluluk, bitki besin elementleri, pestisitler ve ağır metaller oluşturmaktadır (Larcher, 1995).

Abiyotik stres faktörlerinden birisi olan ağır metaller günümüzde, ekosistemlerin toprak, su ve hava gibi ortamlarında yaygın bir şekilde birikmeye başlarken, Dünya yüzeyindeki tüm organizmaların yaşamını tehdit eden önemli bir çevre sorunu haline almıştır (Stresty ve Madhava Rao, 1999). Toprak ve suda bulunan zararlı maddelerden bazıları uzaklaştırılabilmelerine rağmen, ağır metaller uzaklaştırılamazlar. Alıcı ortama girmiş bulunan ağır metaller, yüksek oranda birikimiyle biyolojik ve kimyasal süreçleri olumsuz etkilerler. Metallerin toksisitesi; metabolit, makromolekül ve hücre organelleri ile birlikte biyolojik yaşam faaliyetlerine ve yaşam süreçlerine zarar verme potansiyeline dayanır (Artan, 2007).

1.2. Ağır Metaller

Ağır metaller, “yoğunluğu sudan en az beş kat daha fazla olan kimyasal elementler” olarak tanımlanır ya da diğer bir ifadeyle yoğunluğu “5 g mL⁻¹’den fazla olan metaller” için kullanılan bir kavramdır (Lambers vd., 1998). Fizyologlar tarafından ise bu tanım, biyolojik yapıda birikebilen ve toksik etki yapabilen metaller için yapılmaktadır. Bu gruba kurşun, kadmiyum, krom, demir, kobalt,

bakır, nikel, çinko, molibden, vanadyum, alüminyum, arsenik, kalay ve manganez olmak üzere altmıştan fazla metal dâhildir.

Ekolojik açıdan ağır metaller hayvan ve bitkiler için mikro besin maddesi olabildikleri gibi aynı zamanda toksik maddelerdir. Toksikite kavramı metalden metale değişebildiği gibi organizmadan organizmaya da değişebilmektedir.

Tez çalışmasında etkilerini belirlemeye çalıştığımız biyokimyasal ve fizyolojik olaylara sebep olan elementler ve etkileri aşağıda verilmiştir:

Bakır (Cu)

Bakır bitki büyüme ve gelişimi için gerekli bir mikrobeseleyicidir. Bunlarla birlikte aşırı miktarda bakır; fotosentez, pigment sentezi, nitrojen ve protein metabolizması, membran bütünlüğü, mineral alınımı gibi çok sayıda fizyolojik prosesi etkilemektedir (Shen vd., 1988; Nielsen vd., 2003; Demireuska Kepoua vd., 2004).

Bakır redoks-aktif bir metaldir ve süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^-), gibi zararlı reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunu katalizler (Schutzendubel ve Polle, 2002). Lipitler, proteinler ve nükleik asitlerle reaksiyona giren bu reaktif oksijen türleri lipid peroksidasyonu, membran hasarı ve enzim inaktivasyonuna neden olabilir. Bakırın karayosunlarında karbonhidrat metabolizmasını ve kloroplastlar içinde gelişen büyük nişasta tanelerini etkilediği, hücre membranları ve organellerinde anomalilere sebep olduğu saptanmıştır (Simola, 1977).

Kurşun (Pb)

Kurşun; karasal ve akuatik ekosistemler için önemli bir metal kirleticidir ve bitki metabolizması ve büyümesi için yan etkiler yapabilir (Goldbold and Kettner, 1991). Kurşun; besin alınımını engeller, tohum çimlenmesi ve fide büyümesini indirger, su dengesini bozar ve fotosistem I ve II'yi etkiler (Burzynski ve Grabowski, 1984; Iqbal ve Mustaq, 1987; Godbold ve Kettner, 1991; Moustakas vd., 1994). Ayrıca kurşun bitkilerde kloroplast yapısını değiştirebilir (Poskuta vd., 1987; Bassi vd., 1990; Moustakas vd., 1994).

Ağır metallerin çevreye yayılmasına neden olan etmenlerin başında endüstriyel faaliyetler, motorlu taşıtların egzozları, maden yatakları ve işletmeleri, volkanik faaliyetler, tarımda kullanılan gübre ve ilaçlar ile kentsel atıklar gelmektedir (Stresty ve Madhava Rao, 1999). Ağır metallerin ekolojik sistemde yayılımları dikkate alındığında doğal çevrimlerden daha çok insanın neden olduğu etkiler sebebiyle çevreye dağılımının söz konusu olduğu görülmektedir. Genel olarak doğal kaynaklardan ortaya çıkan ağır metal kirliliği antropojenik kökenli ortaya çıkan ağır metal kirliliğinden birkaç kat daha azdır (ztrk vd., 1992).

1.3. Serbest Radikaller

Bitkilerde ağır metallere; serbest radikal oluşumu ve oksidatif stresin indükleyicisi olarak bilinirler. Serbest radikallerin atom veya moleküllerindeki elektronlar çekirdeğin etrafında orbital olarak tanımlanan bölgelerde hareket ederler. Her yörüngede birbirine zıt yönde hareket eden fazla iki elektron bulunur. Bir atom veya molekül dış orbitallerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektron bulunduruyorsa ‘‘serbest radikal (SR)’’olarak tanımlanır. Bu tip moleküller, ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktifler (Halliwell ve Gutteridge, 1990).

Başlıca serbest oksijen radikalleri; Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali (OH^{\cdot}), singlet oksijen (1O_2) dir.

Reaktif Oksijen Türleri

Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit radikali oluşur. Başlıca řu yollarla üretilmektedir:

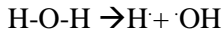
- (1) İndirgeyici özellikteki moleküler oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken süperoksit radikali oluşur. Flavinler, tiyoller gibi indirgenmiş nükleotitler aerobik ortamda oksitlenirken süperoksit yapımına neden olurlar.
- (2) Başta çeşitli dehidrogenazlar ve oksidazlar olmak üzere, yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında süperoksit radikali bir ürün olarak oluşabilir (Corpas vd., 2001).

- (3) Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken, tüketilen oksijenin %1-5 kadarı süperoksit yapımı ile sonlanır (Maxiwell vd., 1999).
- (4) İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu süperoksit meydana getirebilir.

Süperoksit radikalının önemi H_2O_2 kaynağı olması ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Ayrıca hücrel koşullarda üretilen süperoksit hem oksitleyici hem de indirgeyici olarak davranabilir. Aldığı elektronu metal iyonunu, sitokrom-c ye veya bir radikale verirse tekrardan oksitlenmektedir.

Hidroksil Radikali (OH^\cdot)

Hidroksil radikali geçiş metalleri varlığında H_2O_2 'nin indirgenmesiyle (Fenton reaksiyonu) oluşur. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalması ile de oluşabilir.



Biyolojik sistemlerdeki en reaktif ve hasar verici radikal türüdür. Yarılanma ömrü çok kısa olmasına rağmen ortamda rastladığı her biyomolekülle tepkimeye girer ve oluştuğu yerde büyük hasara sebep olur (Akkuş, 1995, Halliwell ve Gutteridge,1990). Her tür biyolojik molekülle reaksiyona girse de özellikle elektronca zengin bileşikler tercihli hedefleridir, nükleik asitler (pürin ve pirimidin bazları) ve proteinler (aromatik amino asitler) ile çeşitli radikalik tepkimeler verir.

Singlet oksijen (1O_2)

Moleküler oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle singlet oksijen oluşur. Singlet oksijen ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal değildir. Oksijenin ortaklanmamış elektronları paralel spinli olduğundan oksijendeki spin kısıtlaması singlet oksijende yoktur ve oldukça reaktif bir oksijen bileşiğidir (Akkuş, 1995).

Singlet oksijen; pigmentlerin oksijenli ortamda ışığı absorblamasıyla, $O_2^{\cdot-}$ 'nin dismutasyon tepkimesi sırasında, hidroperoksitlerin metaller varlığındaki tepkimelerinde oluşabilirler (Halliwell ve Gutteridge, 1990).

Bitkiler serbest radikallerin zararlarını ortadan kaldırmak için belirli savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bu savunma mekanizmaları; düşük molekül ağırlıklı, tiyol içeren ve metal bağlayan bir polipeptit sınıfı olan bitki şelatları (Kramer vd., 1996) ve antioksidan savunma sistemlerini içermektedir. Bitkiler, oksidatif hasarlara karşı kendilerini koruyan glutatyon, askorbat, α -tokoferol gibi düşük molekül ağırlıklı antioksidan moleküller ve katalaz, peroksidaz, süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimlere sahiplerdir.

Farklı bitkiler ile yapılmış olan birçok çalışmada, ağır metallerin toksik düzeylerine karşı geliştirilen savunma mekanizmalarında antioksidan enzimlerin önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Kloroplastlarda su-su döngüsü, kloroplast, sitoplazma, mitokondri, apoplast ve peroksizomlarda askorbat-glutatyon döngüsü, glutatyon peroksidaz ve peroksizomlarda katalaz aktivitesi ile reaktif oksijen türlerinin süpürülmesinde rol oynamaktadırlar (Prasad-Putertas., 1999; Romero vd., 1999; Schickler ve Caspi, 1999; Fang ve Kao, 2000, Rao ve Stresty, 2000; Landberg ve Grager, 2002; Tewari vd., 2002; Schutzenubel ve Polle, 2002; Baek ve Skinner, 2003; Nikookar vd., 2005).

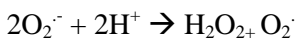
Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu H_2O_2 oluşur.



Yapısında eşleşmemiş elektron içermediği için radikal değildir, ancak biyolojik membranları geçerek hücrelerin arasına veya içine kolayca difüze olabilir ve uzun ömürlü bir oksidandır (Halliwell ve Gutteridge, 1990; Halliwell, 1994).

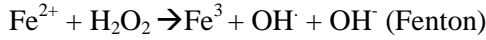
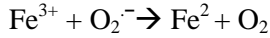
Biyolojik sistemlerde H_2O_2 'nin asıl üretimi süperoksidin nonenzimatik veya SOD katalizli dismutasyon reaksiyonu ile H_2O_2 'ye dönüşmesiyle olur.



H_2O_2 bir radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri (ROT) içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli rol oynar. Çünkü geçiş metal iyonları varlığında

Fenton reaksiyonu sonucu; süperoksit radikali varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve daha çok hasar verici olan hidroksil radikaline dönüşür (Halliwell vd., 2000).

Haber-Weiss reaksiyonu süperoksidin direkt olarak H_2O_2 ile reaksiyonudur ve katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerler. Demirle katalizlenen ikinci şekli ise çok hızlıdır. Bu reaksiyonda önce ferrik demir (Fe^{3+}) süperoksit tarafından ferro demire (Fe^{2+}) indirgenir. Sonra Fenton reaksiyonu ile H_2O_2 'den $\bullet OH$ ve \bar{OH} üretilir. Reaksiyon mekanizması aşağıdaki şekildedir:



Süperoksit radikalinin lipitte çözünürlüğü sınırlı olduğu halde, H_2O_2 lipitte çözünebilir. H_2O_2 özellikle proteinlerdeki *hem* grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup hücre zarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir.

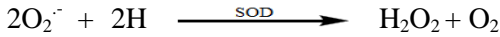
1.4. Antioksidant Sistemler

ROT oluşumu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizması vardır. Bu mekanizmalar “antioksidan savunma sistemleri” veya kısaca “antioksidanlar” olarak bilinirler. Antioksidanlar; enzimatik olmayan antioksidanlar (C vitamini, E vitamini, karotenoidler gibi), antioksidan enzimler ise (süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz gibi) olarak sınıflandırılabilirler.

Enzimatik Antioksidant Sistemler

Süperoksit Dismutaz (SOD, EC. 1.15.1.1)

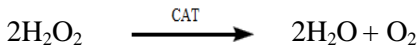
Serbest radikallere karşı organizmadaki ilk savunma SOD enzimiyle gerçekleşir. Enzimin fizyolojik fonksiyonu, oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikalinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Süperoksidin daha az toksik olan H_2O_2 'ye dönüşümünü katalizler.



SOD enzimi H_2O_2 ürettiği için H_2O_2 uzaklaştırıcı enzimlerle işbirliği içinde çalışır. Bitkilerde metal kofaktörüne bağlı olmak üzere SOD'un 3 izoformu bulunmaktadır: Demir SOD (FeSOD), Mangan SOD (MnSOD) ve Bakır – Çinko SOD (Cu – Zn SOD) olmak üzere üç farklı izoenzime sahip olan süperoksit dismutazdan; FeSOD kloroplastlarda, MnSOD mitokondri ve peroksizomlarda ve Cu – Zn SOD kloroplast ve sitoplazmada yer almaktadır (Alscher vd., 2002). Stres sırasında gerek hücresel gerekse apoplastik SOD miktarında artma olduğu görülmüştür (Hernandez vd., 2001).

Katalaz (CAT, EC. 1.11.1.6)

Tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan, özellikle peroksizomlarda lokalize dört alt birimden oluşan enzimdir; kendi substratına olan ilgisi az ve ışığa karşı duyarlıdır. H_2O_2 'nin yıkılmasını sağlar. H_2O_2 oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda indirgeyici aktivite gösterir (Murray vd., 1996).



Peroksidaz (POX, EC 1.11.1.7)

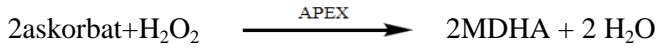
Toksik özellikteki H_2O_2 'yi su ve oksijene dönüştürmektedir. Aynı zamanda suyu indirgerken substratı da okside ederler. Oluşmakta olan oksijen ise hücredeki diğer bileşikler ile sekonder ürünleri meydana getirmektedir. Bazı durumlarda oksidazlar peroksidaz gibi H_2O_2 'yi oksijen kaynağı olarak kullanmaktadır.



Askorbat Peroksidaz (APX, EC 1.8.5.1)

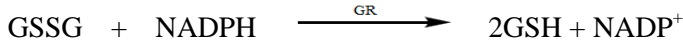
APX, H₂O₂ detoksifikasyonunda yer alan diğerk bir enzim olup bu enzimin izoenzim grupları kloroplast stroması ile tilakoid zarı, mitokondri, sitozol ve peroksizom olmak üzere dört farklı bitki kısmında bulunur.

APX, H₂O₂'i suya dönüştürürken, askorbatı spesifik elektron donörü olarak kullanır; bu reaksiyona askorbat'ın tek değerlikli oksidant formu olan monodihidroaskorbat (MDHA) oluşumu eşlik eder (Secenji vd., 2008).



Glutasyon Redüktaz (GR, EC 1.6.4.2)

Bir flavoprotein olan glutasyon redüktaz, NADPH yardımıyla okside glutasyonun (GSSG), glutasyona indirgenmesini katalize eder. Glutasyonun indirgenmiş halde kalması birçok antioksidan enzim aktivitesi için önemlidir.



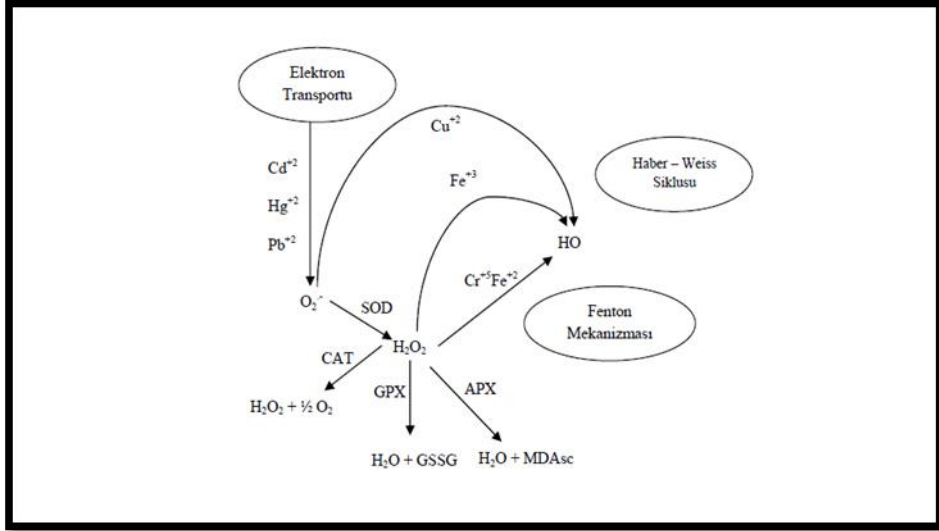
Oksidatif stres sonucu glutasyon redüktazın hücre içi seviyesi artmakta ve glutasyon redüktaz yeniden aktive olmaktadır (Kılınç, 1985).

Enzimatik olmayan antioksidant sistemler

Enzimatik olmayan antioksidant savunma mekanizmaları karotenoidler, askorbat, glutasyon, vitamin E ve flavanoidler, tanenler, lignanlar ve ligninler gibi çeşitli fenilpropanoid türevlerini içerirler.

Karotenoidler

Bitkilerde yaygın şekilde bulunan doğal renk pigmentleridir. Fotooksidatif proseslere karşı bitkileri korur. En bilineni A vitamini öncüsü olan β-karotendir. Karotenoidler özellikle singlet oksijeni (¹O₂) ve peroksil radikallerini gideren etkili antioksidanlardır. Karotenoidler arasında en etkin ¹O₂ tutucu; β-karotenin açık zincirli analogu olan likopendir (Benavides vd., 2005).



Şekil 1.1. Ağır metaller tarafından aktif oksijen türlerinin oluşumu (Cd^{+2} , kadmiyum iyonu; Hg^{+2} , cıva iyonu; Pb^{+2} , kurşun iyonu; Cu^{+2} , bakır iyonu; Fe^{+2} ve Fe^{+3} , demir iyonu; Cr^{+5} , krom iyonu; $O_2^{\cdot-}$ süperoksit radikali; HO, hidroksil radikali; SOD, süperoksit dismutaz; CAT, katalaz; H_2O_2 , hidrojenperoksit; APX, askorbat peroksidaz; MDAsc, monodehidroaskorbik asit; GSSG, okside glutatyon; H_2O , su; O_2 , moleküler oksijen) (Benavides vd., 2005).

Askorbat

Askorbik asit bitki hücrelerinde reaktif oksijen türlerine bağlı olarak meydana gelen hasarın etkilerini en aza indirmede ve önlemede rol oynayan en güçlü ve en bol antioksidandır (Foyer vd., 1995). Askorbatın etkisi en çok H_2O_2 , süperoksit, hidroksil ve peroksil radikalleri ve singlet oksijen üzerindedir. Sıvı fazdaki tüm peroksil radikallerini plazma lipidlerine difüze olmadan tutar ve bu şekilde lipid peroksidasyonunun başlamasını engeller. Membranlarda oluşan α -tokoferol radikali ile reaksiyona girerek α -tokoferolün rejenerasyonunu sağlar (Akkuş, 1995; Halliwell, 1994). Askorbat; kloroplast, sitosol ve vakuolde bulunmaktadır. Askorbik asidin bir kısmı yaprak mezofil hücrelerinde lokalize olmuştur. Kloroplastlar, askorbik asidin okside formundan indirgenmiş formunu oluşturacak tüm enzimleri bulundurmaktadırlar.

Glutasyon

Glutasyon (GSH) bitkilerde oksidatif strese karşı rolü olan en önemli metabolitlerden birisidir. Birçok bitkide bulunan γ -Glu-Cys-Gly dan oluşan bir tripeptittir. Aminoasitlerin hücre içine taşınması görevinden başka, çeşitli metabolik fonksiyonları vardır. Suda çözünen önemli bir antioksidandır. H_2O_2 , disülfidler, monodihidroaskorbat ve serbest radikalleri indirgeyebilir ve böylece hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Bitki dokularında sitozol, endoplazmik retikulum, vakuol, mitokondri, kloroplast, peroksizom gibi neredeyse bütün hücre kısımlarında buldukları gözlenmiştir.

Normal koşullar altında sülfat taşınımının düzenlenmesi, sinyal iletimi, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ve stresle ilişkili genlerin ekspresyonu gibi birçok fizyolojik süreçte rol oynamaktadırlar. Aynı zamanda yapılan araştırmalara göre glutasyon bitkilerde hücre farklılaşması, hücre ölümü, patojen direnci ve enzimatik düzenleme gibi birçok büyüme ve gelişme ile ilgili olayda da merkezi bir role sahiptir (Onat vd., 2002).

Prolin

Metal stresine maruz kalmış bitkilerde oluşan diğer bir reaksiyon şekli ise serbest prolin amino asiti gibi özel metabolitlerin akümüle edilmesidir. Strese maruz kalan bitkilerde reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu hasara karşı prolin oluşumu gerçekleşmektedir. Ağır metal stresi sonucu oluşan reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonunda stresi azalttığı vurgulanmıştır (Siripornadulsil vd., 2002). Aynı zamanda şelatlama özelliğinden dolayı ağır metal stresine maruz bırakılan bitkilerin hayat döngüsünü tamamlayabilmelerine katkıda bulunmaktadır (Sinha ve Saxena, 2006).

Ağır metal kirliliği bitkilerde; fizyolojik ve biyolojik süreçlerde neden oldukları etkilerle transpirasyon, stoma hareketleri, su alınımı, fotosentez, çimlenme, protein sentezi, membran stabilitesi gibi bozulmalara neden olmaktadır (Kennedy ve Gonsalves, 1987). Bitkilerin vejetatif ve generatif organ gelişimini olumsuz yönde etkilemektedirler (Folkesson ve Andersson-Bringmark, 1988). Değişiklikler ancak yüksek kirlenici seviyelerine maruz kaldıktan sonra belirlenebilirken, metabolizmada ağır metal etkisi çok daha erken belirlenebilmektedir. Ağır metal konsantrasyonu bitki biyogörüntüleme, metal kirliliğine karşı yalnız çelişik

cevaplar verebilir. Bu nedenle, bitkilerde gözle görülebilir semptomlar belirlenemediğinde, metabolik değişiklikler ağır metal kirliliği durumunun uygun bir göstergesi olarak işlev görebilir. Bu anlamda ağır metal kirliliğinde biomarker olarak antioksidan enzimlerden faydalanılabileceği gibi çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir (Ahmad vd., 2000).

Çevresel stres faktörlerine karşı her bitkinin toleransı farklıdır. Bu durum bitki türüne hatta aynı türün genotipine, stres faktörüne, strese maruz kalma süresine ve strese maruz kalan doku ve organın yapısına göre büyük farklılıklar göstermektedir. Günümüze değin yapılan çalışmalar genellikle yüksek bitkiler üzerinedir. Fakat bitkilerin çevresel stres faktörlerine karşı geliştirdikleri adaptif mekanizmalar bu tip çalışmaların çok sayıda farklı tür üzerinde yapılmasını zorunlu hale getirmektedir.

Ağır Metal Birikim Çalışmalarında Karayosunlarının Kullanımı

Karayosunları; neredeyse tüm karasal ekosistemlerde gelişebilen kriptogamik organizmalardır ve uzun süren kuraklıklara dayanabildiklerinden dolayı ekstrem çevre koşullarında bile çoğalabilme özelliğine sahiptirler. Yüksek yüzey, hacim oranları, kökleri, iletim demetleri ve kütikular yapıları olmayan basit yapılu bitkiler olma özelliklerinden dolayı ağır metalleri dokularında toplayarak biriktirirler. Bu özelliklerinden dolayı uzun dönemler boyunca atmosferdeki çözülmüş gazlar, partikül halindeki madde ve metal iyonlarına göre bir element kompozisyonu gösterirler (Brown, 1984; Conti ve Cecchetti, 2001). Buna bağlı olarak metalleri seçimsiz olarak biriktirebilmeleri, yılın her mevsimi toplanabilmeleri, geniş coğrafik yayılıma sahip olmaları nedeniyle ağır metalin birikiminin saptanmasında ideal bitkilerdir (Tonguç, 1995). Karayosunları, atmosferde bulunan birçok elementi absorplamada yüksek kapasiteye sahip olduğundan dolayı biyomonitör olarak tercih edilmektedirler (Steinnes ve Berg, 1995). Bu özellikleri sayesinde pek çok biryofit türü çevresel kirlilik çalışmalarında kullanılmaktadırlar. *Marchantia polymorpha*'nın bakırı, *Bryum argenteum*, *Dicranella heteromalla* ve *Pottia turuncata* türlerinin kadmiyum, çinko ve bakırı, *Pleuruchaete squarrosa* ve *Timmia barbuloidea* türlerinin ise kurşun ve bakırı belli oranlarda bünyelerinde biriktirdikleri tespit edilmiştir (Briggs, 1972; Nash, 1972; Thomas, 1983; Kurt, 2012).

1.5. Ağır Metallerin Alınım Mekanizması

Karayosunlarının içeriğinin büyük bir kısmını metaller oluşturur. Fakat bunlar hücre içine alınmazlar. Yalnızca partiküler tuzak yolu ile bitki yüzeyinde tutunup iyon değişim mekanizması ile hücreler arası boşlukta depo edilebilirler.

Partiküler Tuzak

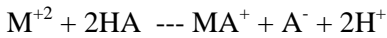
Karayosunu gametofitlerinin yüzeyi taramalı elektron mikroskobu ile incelendiğinde, yüzeylerin girift olduğu görülmüştür. Bu yapıların daha sonraki çalışmalarda küçük partikülleri yakalayabilmek için olduğu anlaşılmıştır. Bu bitkiler grift yüzeyleri ve çok sayıdaki küçük yaprakları ile metal içeren toprak ve kül partiküllerinin yakalanması için ideal bir ortam oluşturmaktadırlar.

İyon Değişim Mekanizması

Karayosunlarının çeperinde metal iyonlarının bağlanabileceği iyon değişim bölgeleri bulunur. Bu bölgelerde bağlı metal iyonları vardır. Bu bağlı metal iyonları ile, partiküler tuzak yolu ile tutulan yapıya dahil olmayan iyonlar yer değiştirebilir.

Eğer bir karayosunu metal veya tuz solüsyonun içinde bulunursa o an iyon değişimi sorunu ortaya çıkar ve metabolik enerji harcamaya gerek duyulmadan bu olay aşağıda izah edildiği gibi gerçekleşir.

Takip eden iyon değişim dengesinde metal iyonları artırılırken hidrojen iyonları da serbest bırakılır.



Buradaki M^{+2} giren metal iyonlarını, H^+ serbest bırakılan hidrojen iyonlarını, HA iyon değişim bölgesindeki bağlı eksi yüklü fonksiyonel grubu, MA^+ fonksiyonel gruba bağlı metal iyonlarını gösterir (Nieboer vd., 1978).

Biryofitler kirlilik ile ilgili çalışmalarda yaygın olarak kullanılmalarına rağmen, ağır metale maruz kalan biryofitlerin oksidatif stres mekanizmaları hakkında çok az bilgi bulunmaktadır (Sun vd., 2009). Stres faktörüne maruz kalan biryofitlerde reaktif oksijen türlerini detoksifiye edici sistemin aktivitesindeki değişikliklere

veya ROT seviyesindeki etkilerine dair bilgiler hala çok yetersizdir. Bu çalışma; Biryofitlerde antioksidan metabolizma ve ağır metal ilişkisinin ortaya konulması yönünde yapılan çalışmalara katkı sağlamak amacını taşımaktadır. Tez çalışması kapsamında *Brachytheciaceae* familyasına ait *Homalothecium sericeum* (Hedw.) Schimp. ve *Hypnaceae* familyasına ait *Hypnum cupressiforme* Hedw. türlerinin Bakır ve Kurşun ağır metale maruz bırakıldıklarında gösterdikleri kısa süreli tepkiler ve antioksidan mekanizmalarında oluşan değişimler araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Biryofitlerin ağır metalleri bünyelerinde biriktirerek akümülatör bitki olarak görev yaptıkları ve çevresel kirliliğin biyoindikatörleri oldukları çok sayıda araştırmada rapor edilmiştir. Ancak bu birikimin fizyolojik ve biyokimyasal temellerine yönelik çalışmalar oldukça yenidir ve literatürde konu ile ilgili olarak görece az sayıda çalışma vardır.

Brown ve Wells (1990), bir biryofit türü olan *Rhytidiadelphus squarrosus* ile yapılmış olan çalışmada Cu, Pb, Cd, Ni ve Zn ağır metallerinin meydana getirdiği hasarları belirlemiştir. Bunun için 10 µM ve 1 M konsantrasyonlarında ağır metal çözeltileri kullanılmıştır. Her iki konsantrasyonda uygulanan ağır metallere biryofitin farklı tepkiler gösterdiği belirlenmiştir. Fotosentez oranında azalma ve membran hasarı gözlenmiştir. Fotosentez oranında meydana gelen azalmanın nedeni olarak ağır metal konsantrasyonu, ağır metale maruz kalma süresi gibi etkilerin fizyolojik süreçte ağır metallerin meydana getirdiği hasarın nedeni olarak belirtilmiştir.

Tremper vd. (2004), yapmış oldukları bir araştırmada, *Rhytidladelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst. ve *Pleurozium scheberi* (Brid.) Mitt. türlerinde belirli aralıklar ile toplanan örneklerde Pb, Zn ve Cu birikimini araştırmışlardır. Örneklerde metal birikiminin muamele süresine bağlı olarak arttığını belirlemişlerdir. Aynı örneklerde klorofil konsantrasyonu ve ağır metal birikimi arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir, ama anlamlı bir ilişki görememişlerdir. Klorofil konsantrasyonunu başka şartların etkilediğini düşünerek, Cu, Pb ve Zn uygulamalarını laboratuvar ortamında gerçekleştirmişler ve Cu'nun özellikle klorofil a konsantrasyonu üzerinde önemli derecede azalmaya sebep olduğu tespit edilmiştir.

Panda ve Choundhury (2005), *Polytrichum commune* Hedw.'ye Cr, Cu ve Zn'nin 24 ve 48 saat metal uygulanmasının ardından birikimin azdan çoğa doğru Zn, Cr ve Cu da olduğunu belirlemişlerdir. Her 3 ağır metalde uygulaması klorofil miktarında azalmaya, MDA içeriğinde artmaya sebep olmuştur. Ayrıca artan metal konsantrasyonlarının glutatyon redüktaz, süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitesinde artmaya neden olduğu, Cu'nun ise GPX aktivitesinde azalmaya sebep olduğu belirlenmiştir.

Choundhury ve Panda (2005), *Taxithelium nepalense* (Schwaegr.) Broth.'de Cr ve Pb stresinin etkisini incelemişlerdir. 12 ve 24 saat Pb ve Cr uygulanan örneklerde toplam klorofil ve kuru ağırlığın azaldığını belirlemişlerdir. 24 saat Cr ve Pb uygulanması sonucu bu metaller biryofitlerde önemli derecede birikmiş Pb'daki birikim; Cr'a göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. Cr ve Pb uygulanmasından sonra O_2^- ve H_2O_2 radikallerinin üretiminin arttığı fakat bunun 24 saat Pb uygulanması sonrası daha belirgin olduğunu belirlemişlerdir. Aynı zamanda SOD aktivitesi artarken katalaz, peroksidaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerin azaldığını saptamışlardır. Askorbat ve glutatyon miktarının önemli derecede arttığını belirlemişlerdir. Denemelerin sonunda metallerin yüksek konsantrasyonlarının oksidatif stresi indüklediği ve antioksidant metabolizmayı inhibe ettiği rapor edilmiştir.

Shakya vd. (2008)'nin iki biryofit türü *Thuidium delicatulum* (Hedw.) Schimp. ve *Thuidium sparsifolium* (Mitt.) Jaeg. ve ciğerotu türü olan *Ptychanthus stariatus* (Lehm. & Lindenb.) Nees.'da Pb, Cu ve Zn'nin klorofil içeriği üzerine etkilerini incelemişlerdir. Zn ve Pb'un birikimi her iki biryofit türünde de klorofil içeriğinde önemli derecede azalmaya sebep olmazken ciğerotu türünde total klorofil içeriğinde önemli azalmaya sebep olmuştur. Çalışılan tüm türlerde Cu birikimi; klorofil a, klorofil b ve total klorofil miktarında azalma meydana getirmiş ve Cu'nun meydana getirdiği hasarın klorofil biyosentezinde görevli enzimlerde aktivite azaltıcı ve/veya inhibe edici etkisinden kaynaklandığını belirtmişlerdir.

Sun vd., (2009), *Hypnum plumaeforme* Wils.'de Ni ve Pb stresinin etkisi incelemiş ve bu ağır metallerin tek başına ve/veya birlikte uygulanması ile lipid peroksidasyonu ve reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir. Denemelerin sonunda her iki uygulamada da katalaz, süperoksit dismutaz, ve total klorofil içeriğinde azalma, peroksidaz aktivitesinde artış belirlemişlerdir. Süperoksit radikalının birikimini düşük süperoksit dismutaz aktivitesi ile hidrojen peroksit'in birikimi ise azalan katalaz aktivitesi ile açıklamışlardır.

Dazy ve Masfaraud (2009), *Fontinalis antipyretica* Hedw.'da Zn, Cu, Pb ve Cd'un etkisi incelenmişlerdir. Bu metallerin etkisinin sonucunda süperoksit dismutaz, askorbat peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerinde artış olduğu belirlenmiştir. Yüksek metal konsantrasyonlarında

hücrel savunma sistemlerinin regüle olduğu ve bunu da melonildialdehit (MDA) seviyesindeki artışlara bağlamışlardır.

Sun vd., (2011), *Hypnum plumaeforme* Wils., *Thuidium cymbifolium* (Dozy & Molk.) Dozy & Molk. ve *Brachythecium piligerum* Card. türlerinde Pb ve Ni'in etkisini araştırmışlardır. Uygulanan metallerin lipit peroksidasyonunu ve ROT oluşumunu arttırdığını, *Hypnum plumaeforme* ve *Thuidium cymbifolium*'da SOD ve CAT aktivitelerinde de azalmaya neden olduğunu belirlemişlerdir. *Brachythecium piligerum*'da Pb uygulanmasının SOD aktivitesinde artışa, Ni uygulamasının ise CAT aktivitesinde artışa sebep olduğu belirlenmiştir. Her üç biryofit türünde de PO aktivitesinde artış belirlenmiştir. Kurşun ve Nikel metallerine en hassas tür *Brachythecium piligerum* en toleranslı tür ise *Thuidium cymbifolium* olarak belirlenmiştir.

Kurt (2012), iki farklı biryofit türü olan *Timmiella barbuloidea* ve *Pleurochaete squarrosa* türlerine 48 saatlik Ni, Pb, Cr ve Cu'nun 48 saat süre ile uygulanması sonucunda metalleri bünyelerinde biriktirdikleri en çok biriken metallerin Pb ve Ni olduğu belirlenmiştir. *Timmiella barbuloidea* Ni ve Pb'ü yüksek derecede biriktirmiş olmasına rağmen, kuru ağırlığın azalmaması, lipit peroksidasyonu ve pigment degradasyonuna sebep olmaması türün metallerle olan toleranslarını belirlerken, *Pleurocheate squarrosa*'nın ağır metal stresinden göreceli olarak daha çok etkilendiği ve *Timmiella barbuloidea*'e göre daha hassas olduğu belirlenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Denemelerimizde çalışma materyali olarak *Brachytheciaceae* familyasına ait *Homalothecium sericeum* (Hedw.) Schimp. ve *Hypnaceae* familyasına ait *Hypnum cupressiforme* Hedw. türleri kullanılmıştır.

Türler ve genel özellikleri:

Hypnum cupressiforme Hedw.

Bitkiler ince-uzun veya orta boylu, genellikle parlak ya da kuru olduklarında, açık-koyu yeşil ve pürüzsüzdür. Gövdeleri düzensiz dallanmıştır. Yapraklar 225-450 µm uzunluğunda, dar lanseolat yada doğrusal-mızraksı yada lanseolat lobları ile derinden 2-3 lobludur. Gövde yaprakları güçsüz oraksı- konkav yada konkav, lanseolat yada ovat lanseolat tabandan gitgide 1/4-1/3 oranında incelmış, 1.0-2.1 × 0.3-0.6 (-0.8) mm ; yaprak dişleri üstü kısımda marjinden geriye doğru eğilmiş; Kosta oldukça kısa, çift yada yoktur ; küçük bitkiler dışında hücre çeperi genellikle incelmış, taban hücreleri paralel şekilde, alar hücreler renksiz yada soluk kahverengi, köşe hücreler tabandan doğru zor olarak artarken boşluk yoktur, çok küçük bitkiler dışında ilk hücreler daha çok dikdörtgen yada kare orta yaprak hücreleri 57-76 µm uzunluğundadır. Dal yaprakları gövde yapraklarında daha dar ve küçüktür; orta yaprak hücreleri 48-96 µm uzunluğunda ortalama 59-74 µm dir. Kapsüller silindir şeklinde kıvrılmış ya da kısmen kıvrımlıdır. Kapsül yapısı 1.7-2.4 mm uzunluğunda, başlık gaga şeklinde 0.6-0.9 mm uzunluğundadır. Genellikle sonbaharda vardır. Çoğunlukla ağaç dallarının altında, kütüklerde, kayalarda, duvar diplerinde gelişirken nadiren de olsa kuru topraklarda ve kuru ama açık kuytu alanlarda ve kireçli topraklarda yaşarlar (Smith, 2004).



Foto Adnan ERDAĞ

Şekil 3.1. *Hypnum cupressiforme*'nin genel bir görüntüsü

***Homalothecium sericeum* (Hedw.) Schimp.**

Bitkiler kısmen dayanıklı, çoğunlukla mat, bazen sert yaygın, parlak sarımsı-yeşil yada kızıl kahverengidir. Gövdeler tırmanıcı ve 5-10 cm uzunluğunda, uzun rizoidlerin büyük kısmı substrata bağlı, sıkı tüylü, dallı, dallar dik, yan dallar genellikle eğimlidir. Aksiller tüyler 24-42 µm uzunluğundadır. Yapraklar nemli zamanlarda dik, boylamasına güçlü kıvrımlı; gövde yaprakları dar üçgenimsi, taban kenarından incelmış, kenar boşlukları alttan geriye doğru dar, tabandan dişli, üzeri hafif dişli yada bütündür. Kosta incedir. Seta kırmızımsı, papilloz, hafifçe dik yada düz, kapsüller dik, silindirik, kısmen ağız taban kenarından sivrilir, başlık gaga şeklinde ve kısa, konik dar; endostomda tüyler eksik; sporlar 11-22 µm dir. Kuru muhafazasız yada hafifçe korunaklı dik ve yatay substratlarda, dal, ağaç, kaya, duvar, çatı altları gibi genellikle temel yaşam alanlarda bulunurlar (Smith, 2004)



Şekil 3.2. *Homalothecium sericeum*'un genel bir görüntüsü

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitkilerin Toplanması ve İzolasyonu

Aydın ili ve çevresinde yapılan arazi çalışması ile toplanan *Homalothecium sericeum* (Hedw.) Schimp. (AYDN 3450) ve *Hypnum cupressiforme* Hedw. (AYDN 3451) türleri çalışma materyali olarak kullanılmıştır. Arazi çalışmasında toplanan bitkiler uygun torbalara alınarak laboratuvar ortamına getirilmiştir. Bitkiler burada tür bazında ayrılmış, araya karışma ihtimali olan yabancı türler stereo mikroskop kullanılarak ayıklanmıştır. Taze örnekler toprak partiküllerinden arındırılmak için çeşme suyu altında bir süre bekletildikten sonra, distile su ile yıkılarak filtre kağıtları üzerinde kurutulmuştur. Toplanan örneklerden birer üye Adnan Menderes Üniversitesi Herbarium'unda (AYDN) saklanmıştır..

3.2.2. Ağır Metal Uygulaması

Brachytheciaceae familyasına ait *Homalothecium sericeum* (Hedw.) Schimp. ve Hypnaceae familyasına ait *Hypnum cupressiforme* Hedw. türleri için muamele ortamı olarak 1mM'lık kurşun asetat ($Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$) ve bakır sülfat

(CuSO₄.5H₂O) çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler daha önceden steril edilen kavanozlara paylaştırılmış, böylece her tür için muamele ortamları hazırlanmıştır Her örnek için sadece 1000 mL'lik distile su içeren kontrol grupları da hazırlanmıştır Hazırlanan ortamlara yaklaşık 85 g olacak şekilde yerleştirilen bitkiler, 24 ± 2 °C sıcaklığa ve 16/8 saat fotoperiyot koşullarına sahip iklim odasında 48 saat bekletilmiştir. 48 saat sonunda örnekler muamele edildikleri ortamlarından alınmış, filtre kağıtlarında kurutulduktan sonra yapılması planlanan analizler için gereken miktarlarda tartılmış ve sıvı azot ile muamele edildikten sonra, analizler gerçekleştirilene kadar -20 ° C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3. Ağır Metal Biriktirme Düzeyleri

Ağır metal biriktirme düzeyinin belirlenmesi için örnekler, yaş yakma yöntemi kullanılarak analize hazırlanmıştır (Kaçkar ve İnal, 2008). AAS 220 FS Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi kullanılarak bitkilerin ağır metal biriktirme düzeyleri belirlenmiştir.

3.2.4. Kuru Ağırlık Tayini

Muamele sonrası kurşun, bakır ve kontrol grubundan oluşan yaklaşık 0.5 gramlık örnekler, 48 saat boyunca 70°C etüvde bekletilmiştir. 48 saatin sonunda örnekler etüvden alınarak yeniden tartımları yapılmış ve kuru ağırlıkları belirlenmiştir.

3.2.5. Fotosentetik Pigment Analizi

Fotosentetik pigment analizi Welburn (1994) tarafından önerilen yöntem ile spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir. 665.1 nm, 649.1nm ve 480 nm dalga boylarında okunan absorbans değerlerinden sırası ile Klorofil a, klorofil b ve total karotenoid miktarları mikrogram/mililitre olarak hesaplanmıştır. 461 nm 'de Lutein, 477.8 nm 'de β-karoten ve 453.4 nm 'de okunan neoksantin değerleri ise absorbans değeri olarak kaydedilmiştir. Ağır metallerin fotosentetik pigment içeriğine etkileri muamele görmemiş kontrol bitkilerine göre değerlendirilmiştir.

3.2.6. Lipid Peroksidasyonu

Lipid peroksidasyon düzeyinin belirlenmesi, oksidatif hasar sonucunda oluşan malondialdehid'in (MDA) tiyobarbitürük asit (TBA) reaktifi kullanılarak

spektrofotometrik tayinine dayanmaktadır. Oluşan MDA, TBA ile renkli bir kompleks oluşturmaktadır. 0.15 g olarak tartılan her örnek, % 0.1 'lik TCA (trikloroasetik asit) ile homojenize edilmiştir. Homojenat 20 dk 10.000 rpm +4°C de santrifüjlenmiştir. Temiz tüplere aktarılan süpernatantan, daha sonra 1'er ml alınarak ikiye bölünmüştür. 1 mL süpernatant içeren bir seriye 1.5 mL TCA içinde TBA (%20'lik TCA içinde %0.5 TBA olacak şekilde) ilave edilmiştir. 1 mL süpernatant içeren diğer bir seriye ise 1.5 mL sadece %20'lik TCA ilave edilmiştir. %20'lik TCA ilave edilen örnekler antosiyanin girişiminden kaynaklanan hataya karşı kontrol olarak hazırlanmıştır. TCA içinde TBA içeren örnekler 100°C su banyosunda 30 dk kadar bekletildikten sonra hemen buz banyosuna aktarılmıştır. Buz banyosundan sonra örneklerin oda sıcaklığına gelmeleri beklenmiştir. Örneklerin spektrofotometrik olarak absorbanları 532 nm ve 600 nm'de belirlenmiştir. Malondialdehit konsantrasyonu (μM olacak şekilde) ekstinksiyon katsayısından ($155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) yararlanılarak hesaplanmıştır (Cakmak ve Horst, 1991).

3.2.7. Hidrojen Peroksit (H_2O_2) Miktarı Tayini

Hidrojen peroksit içeriği Patterson vd., (1984) tarafından önerilen yöntemi ile belirlenmiştir. H_2O_2 içeriği standart eğri kullanılarak hesaplandıktan sonra nmol g^{-1} taze ağırlık olarak ifade edilmiştir.

3.2.8. Enzim Ekstraktlarının Hazırlanması

0.5 g biryofit örneği; 10 μl 0.1 M PMSF (Phenyl methyl sulfonyl fluoride), 1 mL ekstraksiyon ortamı (50 mL 0.1 M potasyum fosfat tamponu pH=7.8, 2 mM EDTA, % 10 gliserol) ve % 2 lik PVPP (Polyclar AT) ile homojenize edilmiş ve homojenatlar 12000 rpm'de 30 dakika boyunca 4°C'ta santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatantlar çözülebilir protein miktarının belirlenmesi ve enzim analizleri için kullanılmıştır. Örnekler analiz yapıncaya kadar -20°C de tutulmuştur.

3.2.9. Çözünebilir Protein Miktarının Belirlenmesi

Tüm örneklerde çözülebilir protein miktarı Bradford (1976) tarafından önerilen yönteme göre, 595 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. BSA (Bovine Serum Albumin) standartları kullanılarak ($0.1\text{-}0.8 \text{ mg mL}^{-1}$) oluşturulan

kalibrasyon eğrisinden faydalanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda protein miktarı mg mL^{-1} olarak belirlenmiştir.

3.2.10. Süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) Aktivitesinin Belirlenmesi

Örneklerdeki süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) içeriği, Bauchamp ve Fridovich (1971) tarafından önerilen yönteme göre spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Örneklerin absorbansları 560 nm de ölçülmüştür. Spesifik enzim aktivitesi, enzim ünitesi $\text{mg protein}^{-1}\text{g yaş ağırlık}^{-1}$ olarak belirlenmiştir.

3.2.11. Peroksidaz (PO; EC.1.11.1.7) Aktivitesinin Belirlenmesi

Peroksidaz enzim aktivitesi Herzog ve Fahimi (1973) tarafından önerilen yönteme göre 465 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Spesifik aktivite olarak 1 mg proteinde bulunan enzim ünite sayısı kabul edilmektedir. Bir enzim ünitesi, dakikada 1 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ 'i parçalayan enzim miktarı olarak hesaplanmıştır. Spesifik enzim aktivitesi, enzim ünitesi $\text{mg protein}^{-1}\text{g yaş ağırlık}^{-1}$ olarak belirlenmiştir.

3.2.12. Katalaz (KAT; EC 1.11.1.6) Aktivitesinin Belirlenmesi

Örneklerdeki katalaz aktivitesi Bergmeyer ve Gralb (1983) tarafından önerilen yönteme göre 240 nm de spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Spesifik enzim aktivitesi okside $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ dk.}^{-1} \text{mg protein}^{-1} \text{ yaş ağırlık}^{-1}$ olarak belirtilmiştir.

3.2.13. Askorbat peroksidaz (APX; EC 1.1.1.11) Aktivitesinin Belirlenmesi

Garcia-Limones vd., (2002) tarafından belirlenen yönteme göre askorbat peroksidazın aktivitesi 290 nm'de askorbat oksidasyonu ölçülerek belirlenmiştir.

3.2.14. Askorbat Miktarı Tayini

Askorbat miktarı Kampfenkel vd. (1995) tarafından belirtilen yönteme göre 525 nm de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Askorbat düzeyleri $\mu\text{mol/g}$ olarak belirlenmiştir.

3.2.15. Prolin Miktarı Tayini

Prolin miktar tayini Bates vd., (1973)'e göre 518 nm de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Prolin miktarı standart grafik üzerinden μg prolin olarak belirlenmiştir.

Tüm verilerin ortalamaları ve standart hatalar SPSS 16.0 programı kullanılarak hesaplanmıştır. Farklılıklar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile test edilmiş 0.05 önem düzeyinde Duncan Çoklu Oran Testi ile karşılaştırılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Ağır Metal Birikim Düzeyinin Belirlenmesi

Brachytheciaceae familyasına ait *Homalothecium sericeum* (Hedw.) Schimp. ve *Hypnaceae* familyasına ait *Hypnum cupressiforme* Hedw. türleri ağır metaller ile muamele edildikten sonra ağır metalleri biriktirme düzeyleri atomik absorpsiyon spektrofotometresi kullanılarak belirlenmiştir. Her iki türde maruz bırakıldıkları ağır metalleri bünyelerinde biriktirebilmişlerdir. *Homalothecium sericeum* 'un Cu uygulanmış örneklerinde kontrole oranla 22 kat Cu artışı, Pb uygulanmış örneklerinde ise kontrole oranla 11 kat Pb artışı gözlenmiştir. *Hypnum cupressiforme*'nin Cu uygulanmış örneklerinde ise kontrole oranla 7.12 kat Cu artışı, Pb uygulanmış örneklerinde ise kontrole oranla Pb'nun 7.43 kat arttığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. *Homalothecium sericeum* ve *Hypnum cupressiforme*' de ağır metal birikimi (ppm, Ortalama \pm S.H, n=2)

Uygulamalar	<i>Homalothecium sericeum</i>		<i>Hypnum cupressiforme</i>	
	Kontrol	Metal	Kontrol	Metal
Cu	21.00 \pm 0.57b	471.00 \pm 72.74a	50.55 \pm 6.06 b	411.67 \pm 1.85 a
Pb	440.00 \pm 4.04b	5198.77 \pm 1.12a	415.67 \pm 17.18b	3506.00 \pm 1.12a

Polytrichum commune Hedw.'nin 12 ve 48 saat Cr, Cu ve Zn uygulamasından sonra ağır metal biriktirme düzeyleri incelendiğinde, en yüksek birikimin 48 saat sonunda 10 mM ve 100 mM metal uygulaması sonunda sırası ile Cu, Cr, ve Zn olarak belirlenmiştir (Choundry ve Panda, 2005). *Marchantia polymorpha*'nın Cu'ı *Dicranella heteromalla* ve *Bryum argenteum*'un Cd, Zn ve Cu'yu yüksek miktarlarda biriktirme eğiliminde oldukları rapor edilmiştir (Nash, 1972; Thomas, 1983).

Biryofitler neredeyse tüm karasal ekosistemlerde gelişebilen kriptogamik organizmalardır ve ekstrem çevre koşullarında bile çoğalabilme özelliğine sahiptirler. Yüksek yüzey ve hacim oranları, basit anatomileri ve mumsu bir

kutikuladan yoksun olma özelliklerinden dolayı ağır metalleri dokularında toplayarak biriktirirler. Bu yüzden çevresel kirlenmenin önemli biyomonitörleri olarak değerlendirilirler. Biryofitler 20 yılı aşkın süredir şehirlerdeki ağır metal ve radyonüklidlerin atmosferik depolanmasını değerlendirmek için geniş ölçüde kullanılmaktadır (Brown, 1984).

Biryofitler, ağır metallerin hiperakümülyasyonlarını hücre çeperinde bulunan negatif yüklü poliüronik asitler sayesinde yapmaktadırlar. Bu özellik biryofitlere yüksek derecede katyon değişim kapasitesi sağlamaktadır (Tyler, 1989, Chettri vd., 1998). Poliüronik asitler yapısında karboksil grubu bulundurlar. Kurşun ve diğer ağır metallerin negatif yüklü poliüronik asitlere bağlanması yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (Thurner ve Marshall, 1971; Burton ve Peterson, 1979; Satake vd., 1983; Satake ve Miyasaka, 1984).

Homalothecium sericeum ve *Hypnum cupressiforme*'nin ağır metalleri biriktirmesi negatif yüklü gruplar ve bu sayede gerçekleşen katyon değişim kapasitesi ile gerçekleşmiş olabilir. Ayrıca hücre içinde bulunan şelatlayıcı moleküller ve/veya ağır metallerin vakuol de depolanması sonucunda da gerçekleşmiş olabilir (Burns vd., 2001).

4.2. Kuru Ağırlık

Homalothecium sericeum'un Cu uygulanan örneklerinde kontrole oranla kuru ağırlıkta %8 azalma olurken, *Hypnum cupressiforme*'nin Cu uygulanan örneklerinde ise kontrole oranla %6'lık bir azalma olduğu belirlenmiştir. Cu toksisitesinin bitki bünyesinde meydana gelen birçok fizyolojik olayı olumsuz etkilediği bilinmektedir (Sossé vd., 2004). *Homalothecium sericeum*'un Pb uygulanmış örneklerinde kuru ağırlıkta %1'lik bir azalma, *Hypnum cupressiforme*'nin Pb uygulanan örneklerinde ise kuru ağırlıkta %26'lık bir artış görülmüştür. Pb uygulanan örneklerde kuru ağırlıkta meydana gelen artışlar bu ağır metalin biryofitlerin fotosentez metabolizmasında fotosentez ve diğer bağlantılı sentez olaylarında toleransa bağlı olarak gelişimin devam etmesine bağlı olabilir (Clements, 2006). Bunun yanında bitki yüzeyine tutunan iyonlarda bu artışta etkili olabilmektedir.

Çizelge 4.2. Ağır metal uygulanan *Homalothecium sericeum* ve *Hypnum cupressiforme* 'nin kuru ağırlıkları (g, Ortalama \pm S.H, n=2)

	Uygulamalar		
	Kontrol	Cu	Pb
<i>Homalothecium sericeum</i>	0.1024 \pm 0.0489 a	0.0938 \pm 0.0197 a	0.1007 \pm 0.0358 a
<i>Hypnum cupressiforme</i>	0.0814 \pm 0.0189 b	0.0761 \pm 0.0133 c	0.1028 \pm 0.0120 a

4.3. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Miktarı

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu H₂O₂ oluşur. Hidrojen peroksit zararlı etkisini hidroksil radikaline dönüşerek yapmaktadır. GPX, APX ve CAT gibi enzimler, H₂O₂'in hızla yıkımını sağlayarak hücrede birikmesini önlerler.

Çizelge 4.3. Ağır metal uygulanan *Homalothecium sericeum* ve *Hypnum cupressiforme* 'nin H₂O₂ miktarları (nmolg⁻¹, Ortalama \pm S.H, n=2)

	Uygulamalar		
	Kontrol	Cu	Pb
<i>Homalothecium sericeum</i>	40.66 \pm 0.43 b	299.16 \pm 8.20 a	60.517 \pm 0.86 b
<i>Hypnum cupressiforme</i>	22.329 \pm 0.43 c	236.488 \pm 6.48 a	101.150 \pm 0.012 b

Homalothecium sericeum'un Cu uygulanmış örneklerinde 6 kat *Hypnum cupressiforme* 'nin Cu uygulanmış örneklerinde ise 9 kat artış belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Cu uygulanan örneklerde H₂O₂'nin aşırı birikiminin önemli sebeplerinden biri olarak Cu uygulanan örneklerde CAT aktivitesinde meydana gelen azalma olduğu söylenebilir. *Homalothecium sericeum*'un Pb uygulanmış örneklerinde anlamlı bir değişim görülmezken *Hypnum cupressiforme* 'nin Pb uygulanmış örneklerinde 3 kat artış meydana gelmiştir. Pb uygulanmış örneklerde anlamlı bir değişimin olmaması denemelerin daha sonraki aşamalarında elde

edilen H₂O₂ detoksifikasyonundan sorumlu olan APX enzim aktivitesindeki artışla paralellik göstermektedir. *Pleurocheate squarrosa* ve *Timmiella barbuloides* türleri ile yapılmış olan çalışmada uygulanan Cu'nun örneklerdeki H₂O₂ miktarını arttığı yapılan çalışma ile rapor edilmiştir (Kurt, 2012).

4.4. Lipit Peroksidasyonu

Bitki hücreleri için lipid peroksidasyonu sıkça kullanılan ve membran hasarını ortaya koyan bir stres indikatörüdür (Taulavuori vd. 2001). Lipit peroksidasyonu, lipit hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesiyle sona ermektedir. Bu bileşiklerden biri olan malonildialdehit (MDA) miktarının ölçülmesi lipit peroksit düzeylerinin saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. (Ohkawa vd., 1979).

Denemelerimizde MDA oluşum miktarları *Homalothecium sericeum*'un Cu uygulanmış örneklerinde %53 artarken *Hypnum cupressiforme* de ise %120 oranında arttığı belirlenmiştir. *Homalothecium sericeum* ve *Hypnum cupressiforme*'nin Pb uygulanmış örneklerinde ise MDA oluşum miktarı sırayla %66 ve %348 artış göstermiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Ağır metal uygulanan *Homalothecium sericeum* ve *Hypnum cupressiforme*'nin oluşan MDA miktarları ($\mu\text{M g}^{-1}$, Ortalama \pm S.H, n=2)

Uygulamalar			
	Kontrol	Cu	Pb
<i>Homalothecium sericeum</i>	0.0376 \pm 0.0465 b	0.0576 \pm 0.0027 a	0.0226 \pm 0.023 c
<i>Hypnum cupressiforme</i>	0.0093 \pm 0.0001 c	0.0205 \pm 0.0004 b	0.04175 \pm 0.0015a

Toksik düzeyde metal uygulanan bitkide, hücre membranlarında metal konsantrasyonunun artması nedeniyle serbest radikallerin oluşumu hızlanır ve bu da bitkide lipit peroksidasyonunu tetikler. Toksik düzeyde metal uygulanan bitkilerde, hücre membranlarında metal konsantrasyonu artması nedeniyle serbest radikallerin oluşumu hızlanır ve bu da bitkide lipit peroksidasyonunu tetikler. Metal iyonları lipit peroksidasyonunu arttırabildiği gibi, membrana bağlı

enzimlerin çoklu doymamış yağ asitlerini okside ederek serbest radikal oluşturduğu ve lipid peroksidasyonunu arttırdığı rapor edilmiştir (Mazhoudi vd., 1997).

4.5. Fotosentetik Pigmentler

Stres faktörlerinin bitkiler üzerine etkilerinin araştırılması için kullanılan yöntemlerden biri de fotosentetik pigment içeriklerinin belirlenmesidir. Çalışmamızda kullanılan ağır metaller ve diğer ağır metal gruplarının da bitkilerin fotosentez mekanizmalarını olumsuz etkilediği belirtilmiştir (Foy vd., 1978; Kastori vd., 1992). Metallerin fotosentez yoluna zarar vermesi ya da doğrudan fotosentezi etkilemesi, fotosentezde yer alan enzimlerin aktivitesini bozması, membran permeabilitesi metallerin yarattığı dolaylı etkinin kanıtı olmaktadır (Heath, 1994).

Homalothecium sericeum 'un ağır metal uygulanan örnekleri kontrole göre kıyaslandığında fotosentetik pigment içerikleri Cu uygulanan örneklerde; klorofil *a* da %2 azalma, klorofil *b* de %51 artma, total klorofil de %10 artma, klorofil *a/b* de %35 azalma belirlenirken Pb uygulanmış örneklerinde ise klorofil *a* da %2 azalma, klorofil *b* de %14 artma, total klorofilde %1 artma, klorofil *a/b* de %40 azalma olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. Ağır metal uygulanan *Homalothecium sericeum* 'un klorofil *a,b* Total klorofil ve klorofil *a/b* miktarındaki değişimler ($\mu\text{g ml}^{-1}$, Ortalama \pm S.H, n=2)

Pigment	Kontrol	Cu	Pb
Klorofil a	3.16 \pm 0.20 a	3.08 \pm 0.02 b	3.07 \pm 0.13 b
Klorofil b	0.97 \pm 0.24 b	1.47 \pm 0.25 a	1.11 \pm 0.27 b
Total klorofil	4.13 \pm 0.26 b	4.55 \pm 0.12 a	4.18 \pm 0.60 b
Klorofil a/b	3.25 \pm 0.36 a	2.09 \pm 0.37 c	2.76 \pm 1.15 b

Hypnum cupressiforme'nin ağır metal uygulanan örnekleri kontrole kıyaslandığında fotosentetik pigment içerikleri Cu uygulanan örneklerde; klorofil *a* da %34 azalma, klorofil *b* de %128 artma, total klorofil de %3 azalma, klorofil *a/b* de %71 azalma belirlenirken Pb uygulanmış örneklerde ise klorofil *a* da %38

azalma, klorofil *b* de %3 artma, total klorofil de %30 azalma, klorofil *a/b* de %40 azalma olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Ağır metal uygulanan *Hypnum cupressiforme*'nin klorofil *a,b* Total klorofil ve klorofil *a/b* miktarındaki değişimler ($\mu\text{g ml}^{-1}$, Ortalama \pm S.H, n=2)

Pigment	Kontrol	Cu	Pb
Klorofil a	4.86 \pm 0.23 a	3.18 \pm 0.11 a	3.01 \pm 0.21 b
Klorofil b	1.16 \pm 0.17 b	2.65 \pm 0.54 a	1.20 \pm 0.09 b
Total klorofil	6.02 \pm 0.18 a	5.83 \pm 0.54 a	4.21 \pm 0.22 b
Klorofil a/b	4.18 \pm 0.28 a	1.20 \pm 0.30 b	2.50 \pm 1.29 a b

Ağır metal kirliliğinde klorofil *a*, klorofil *b* ve total klorofil içeriğinin azaldığını belirten çalışmalar bulunmaktadır (Monni vd., 2001; Chettri vd., 1998; Öncel vd., 2000). *Hypnum cupressiforme*'nin klorofil *a* miktarları Pb'un etkisi ile azalma göstermiştir. Klorofil pigment biyosentezinde ağır metallerin bu süreçte görev yapan enzimleri inhibe ettiği rapor edilmiştir (De Fillipps ve Pallaghy, 1994). Cu'nun kloroplast membranında peroksidasyona yol açarak, klorofil içeriğinde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Tremper vd., 2004). Bakır stresi uygulanan bitkilerde görülen klorofil miktarındaki azalma, Cu'm bitkiye verdiği hasarı da ortaya koyan parametrelerden biridir (Devi ve Prasad, 1998; Boswell vd., 2002).

Klorofil *a* ve *b* moleküler çözünürlük ve ışığı absorbe etme yönünden birbirlerinden ayrılırlar. Klorofil *a* miktarında meydana gelen azalmaya karşın klorofil *b* miktarı artmakta; bu artış klorofil *a*'nın klorofil *b* ye dönüşümünün indüklenmesi ile gerçekleşmektedir. Klorofil *a*'nın ikinci halkasında bulunan metil grubu okside olur, bu da klorofil *b*'nin oluşumuna neden olur (Chettri vd., 1998). *Homalothecium sericeum* ve *Hypnum cupressiforme*'nin klorofil *b* miktarlarında artış olduğu belirlenmiştir. Klorofil *b* de meydana gelen bu yükseliş ağır metal stresinden kaynaklanmaktadır. Klorofil *a* ve buna paralel klorofil *a/b* de meydana gelen azalma ağır metal toksisitesinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Hartmut vd., 1990).

Homalothecium sericeum ve *Hypnum cupressiforme*'nin Cu ve Pb uygulanmış örneklerinde total klorofil miktarında azalma görülmüştür. Sun vd., (2007),

Hypnum plumaeforme'de yaptıkları çalışmada Pb ve Ni uygulamasından sonra metal stresine bağlı lipid peroksidasyonunun sebep olduğu fotosentezin engellenmesi ile sonuçlanan bir tepki olduğunu belirtmişlerdir. Total klorofil miktarında meydana gelen azalma fotosentez inhibisyonu ve klorofil degradasyonuna sebep olan metallere özgü bir cevaptır (Bazzas vd., 1974).

Klorofil *a/b* miktarında Cu uygulanan *Homalothecium sericeum* %35 azalma görülürken *Hypnum cupressiforme* de ise %71 azalma olduğu belirlenmiştir. Klorofil *a/b* oranındaki değişimler Fotosistem I ve II arasındaki koşullardan etkilendiği ve bu bakımdan farklılıklar olduğu belirlenmiştir (Keleş 2000). Metal etkisi ile klorofil *a/b* oranının azaldığı, stroma ve grana lamellerinde yapısal bozulmaların meydana geldiği bilinmektedir (Chettri vd., 1998).

Stres faktörlerinin karotenoid birikimine de neden olduğu rapor edilmiştir (Havaux ve Kloppstech, 2001). Ancak bizim denemelerimizde olduğu gibi stres sırasında klorofiller gibi karotenoid miktarda da azalma görülebilir (Munné-Bosch ve Penvelas, 2004). *Homalothecium sericeum* 'un Cu uygulanan örneklerinde Total Karotenoid de %13 azalma, β - karoten de %11 artma, lutein de %13 artma, neoksantin de %15 artma Pb uygulanan örneklerinde ise total karotenoid de %18 artma, β - karoten de %23 artma, lutein de %23 artma, neoksantin de %25 artma olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Ağır metal uygulanan *Homalothecium sericeum* 'un total karotenoid, β -Karoten, lutein, neoksantin absorbans değişimleri (nm, Ortalama \pm S.H, n=2)

Pigment	Kontrol	Cu	Pb
Total Karotenoid	1.60 \pm 0.09 b	1.39 \pm 0.01 a b	1.99 \pm 0.12 a
β- Karoten	0.42 \pm 0.02 a	0.47 \pm 0.08 a	0.52 \pm 0.03 a
Lutein	0.59 \pm 0.02 b	0.67 \pm 0.03 a b	0.73 \pm 0.04 a
Neoksantin	0.66 \pm 0.01 b	0.76 \pm 0.06 a b	0.83 \pm 0.04 a

Hypnum cupressiforme'nin Cu uygulanan örneklerinde; Total Karotenoid de %68 azalma, β - Karoten de %51 azalma, Lutein de %47 azalma, Neoksantin de %43 azalma, Pb uygulanan örneklerinde ise Total Karotenoid de %72 azalma, β -

Karoten de %65 azalma, Lutein de %61 azalma, Neoksantin de %60 azalma olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.8)

Çizelge 4.8. Ağır metal uygulanan *Hypnum cupressiforme*'nin total karotenoid, β -karoten, lutein, neoksantin absorbans değişimleri (nm, Ortalama \pm S.H, n=2)

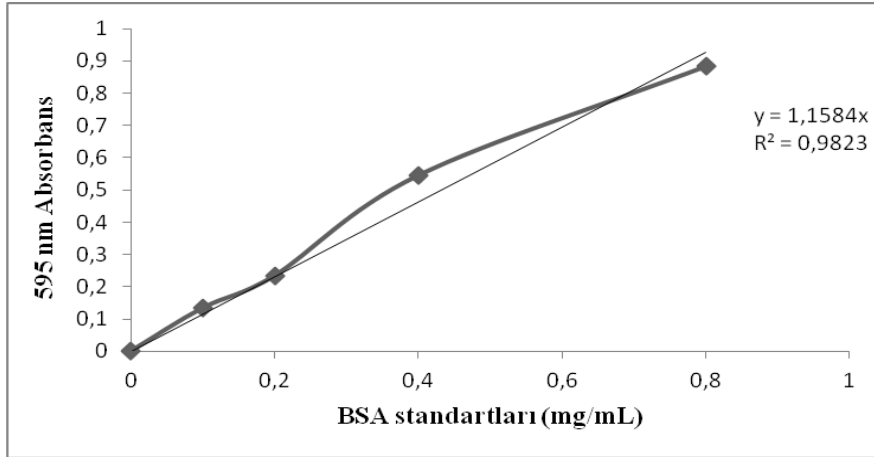
Pigment	Kontrol	Cu	Pb
Total Karotenoid	3.25 \pm 0.12 a	1.023 \pm 0.05 b	0.88 \pm 0.14 b
β- Karoten	0.82 \pm 0.01 a	0.40 \pm 0.03 b	0.28 \pm 0.02 c
Lutein	1.01 \pm 0.06 a	0.53 \pm 0.03 b	0.39 \pm 0.02 b
Neoksantin	1.026 \pm 0.05 a	0.58 \pm 0.03 b	0.41 \pm 0.02 c

Karotenoidler (Karoten, ksantofiller); hem fotosentetik sistemlerde hem de fotosentetik olmayan bitki dokularındaki plastitlere yerleşmiş bulunan tetraterpenler olup antioksidan özellikleriyle fotosistemleri koruyucu işlevlere sahiptirler. Kloroplast membranında lipid peroksidasyon ürünleri ile tepkimeye girerek zincir reaksiyonlarını bitirme özelliği karotenoidlerin en belirgin koruyucu özelliklerindedir (Burton ve Ingold, 1984). Aynı zamanda kloroplastları ve fotosistemleri oksidatif hasardan singlet oksijenin oluşmasını önlemek üzere triplet uyarılmış klorofil molekülleri ile tepkiyerek de korumaktadır (McKersie, 1996).

Bunların yanında stres faktörleri karotenoid birikimini artırabilirken azalmasında neden olabilir (Munne vd., 2004). *Hypnum cupressiforme*'nin bakır ve kurşun uygulanan örneklerinde meydana gelen azalmalar ağır metal stresine bağlı karotenoid miktarındaki azalmayı açıklayabilir. Cu uygulanan örneklerde görülen karotenoid kayıpları bu metal etkisiyle oluşan oksidatif strese bağlı lipid peroksidasyonu ile açıklanabilir.

4.6. Çözünabilir Protein Miktarları

Ağır metaller hücrelerde biyolojik makromoleküllerin göreceli miktarda değişimine neden olabilmektedirler (Stevenson vd., 1996). *Homalothecium sericeum* 'un Cu uygulanmış örneklerinde %28, Pb uygulanmış örneklerinde ise %44 oranında arttığı görülürken; *Hypnum cupressiforme*'nin Cu uygulanmış örneklerinde %10, Pb uygulanmış örneklerinde ise %19 oranında artış olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.9).



Şekil 4.1. BSA (Bovine Serum Albumin) standartları kullanılarak (0.1-0.8 mg L⁻¹) oluşturulan kalibrasyon eğrisi.

Her iki türde de protein miktarlarında meydana gelen artışlar ağır metal stresine karşı dayanıklı olma ile ilgili ilişkili metalotiyoneinler (Garcia-Hernandez vd., 1998), tiyoredoksinler, glutasyon metabolizmasının proteinleri (Xiang ve Oliver, 1998) ve antioksidant enzimlerin (Cho ve Park., 2000) ve miktarının artması ile ilgili olabilir (Didierjean vd., 1996).

Çizelge 4.9. Ağır metal uygulanan *Homalothecium sericeum* ve *Hypnum cupressiforme*' nin oluşan protein miktarları (mg/mL, Ortalama \pm S.H, n=2)

Uygulamalar			
	Kontrol	Cu	Pb
<i>Homalothecium sericeum</i>	1.381 \pm 0.12 b	1.778 \pm 0.02 a	1.994 \pm 0.01 a
<i>Hypnum cupressiforme</i>	1.744 \pm 0.04 c	1.925 \pm 0.07 b	2.080 \pm 0.09 a

4.7. Süperoksit Dismutaz (SOD EC 1.15.1.1.) Aktivitesi

Denemelerimizde SOD enzim aktivitesi *Homalothecium sericeum*'un Cu uygulanmış örneklerinde kontrole göre %131, Pb uygulanmış örneklerinde ise %87 oranında arttığı belirlenirken *Hypnum cupressiforme*' nin Cu uygulanmış

örneklerinde %145, Pb uygulanmış örneklerinde ise %58 oranında arttığı belirlenmiştir (Çizelge 4.8). Sucul biryofit türü olan *Fontinalis antipyretica* Hedw. da da Cu uygulamasından sonra SOD aktivitesinde kontrole oranla önemli bir artış olduğu belirlenmiştir (Dazy vd., 2009). *Pleurochaete squarrosa* türünün Cr ve Cu uygulanan örneklerinde kontrole göre SOD aktivitesinde önemli miktarlarda artışlar belirlenmiştir (Kurt, 2012).

Süperoksit dismutaz hücre içi ve dışında bulunan lipidlerin reaktif oksijen türlerinden biri olan süperoksit radikalının zararlı etkilerinden korunmada sorumlu olan önemli bir antioksidan enzimdir. SOD aktivitesindeki artış, hücresel oksidatif zarardan korunmaya karşı O_2^- radikallerini süpürmesinden dolayıdır. O_2^- radikalleri seviyesinin SOD tarafından kontrolü, hücresel oksidatif zarara karşı önemli bir koruma mekanizmasıdır. Aksi durumda O_2^- radikali peroksinitrit veya HO \cdot gibi daha sitotoksik veya daha yüksek reaktif maddelerin oluşumunda öncül rol alır (Halliwell ve Gutteridge, 1999). Bu nedenle, SOD oksidatif zarara karşı defans sisteminde ilk adım olarak düşünülmektedir (Devi et al., 1998).

Çizelge 4.10. Ağır metal uygulanan *Homalothecium sericeum* ve *Hypnum cupressiforme*' nin SOD enzim spesifik aktiviteleri (U mg⁻¹ protein, Ortalama \pm S.H, n=2)

Uygulamalar			
	Kontrol	Cu	Pb
<i>Homalothecium sericeum</i>	10.621 \pm 0.36 c	24.610 \pm 0.12 a	19.947 \pm 0.13 b
<i>Hypnum cupressiforme</i>	13.125 \pm 0.73 c	32.209 \pm 0.36 a	20.811 \pm 0.14 b

4.8. Katalaz (CAT EC 1.11.1.6.) Aktivitesi

Katalaz hidrojen peroksitin oksijen ve suya dismutasyonunu katalizleyen bir enzimdir. *Homalothecium sericeum* ve *Hypnum cupressiforme*' nin Cu uygulanmış örneklerde kontrole oranla sırası ile %35 ve %48 oranlarında azalma meydana gelirken, Pb uygulanmış örneklerde ise %102 ve %115 artma olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.11. Ağır metal uygulanan *Homalothecium sericeum* ve *Hypnum cupressiforme*' nin CAT enzim spesifik aktiviteleri (U mg⁻¹ protein, Ortalama ± S.H, n=2)

	Uygulamalar		
	Kontrol	Cu	Pb
<i>Homalothecium sericeum</i>	3.049±0.07 b	1.967±0.13 c	6.187±0.53 a
<i>Hypnum cupressiforme</i>	2.524±0.10 b	1.312±0.26 c	5.437±0.29 a

Ağır metal iyonları katalazın yarışmalı olmayan inhibitörleri gibi davranabildikleri bilinmektedir. Cu uygulanan örneklerimizde CAT aktivitesinde önemli derecede azalmalar meydana gelmiştir. Enzimin yapısı ve aktivitesini değiştiren bir metal olan Cu'nun CAT aktivitesinde azalışa neden olduğu başka araştırmalarda da rapor edilmiştir (Foyer vd., 1994; Mohan ve Hosetti, 1997). Cu uygulanan örneklerde meydana gelen yüksek oranda H₂O₂ birikimi de CAT aktivitesindeki azalmayı desteklemektedir.

4.9. Peroksidaz (POX EC 1.11.1.7.) Aktivitesi

H₂O₂'nin bir diğer yıkım yolu da peroksidazlardır. *Homalothecium sericeum* ve *Hypnum cupressiforme*' nin Cu uygulanmış örneklerinde kontrole oranla sırası ile %71 ve %129 artma belirlenirken; Pb uygulanmış örneklerde ise %33 ve %6 oranında artma olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.10).

POX aktivitesinde meydana gelen artışlar H₂O₂'nin detoksifikasyonunda etkin rol aldığına göstergesidir. Yapılan bir çalışmada Ni ve Pb'nin toksik konsantrasyonlarına karşı *Hypnum plumeaforme*, *Thuidium cymbifolium* ve *Brachyhecium piligerum* gibi türlerde de toksik olduğu belirtilmiştir (Sun vd., 2011). Peroksidazların bitkilerde stres enzimi olarak rolü yaygın olarak kabul edilmiştir ve bitkilerde potansiyel biyomarkır olarak kullanılabileceği belirtilmiştir.

Çizelge 4.12. Ağır metal uygulanan *Homalothecium sericeum* ve *Hypnum cupressiforme*' nin POX enzim spesifik aktiviteleri (U mg⁻¹ protein, Ortalama ± S.H, n=2)

Uygulamalar			
	Kontrol	Cu	Pb
<i>Homalothecium sericeum</i>	18.500±1.41 c	31.750±0.35 a	24.700±0.33 b
<i>Hypnum cupressiforme</i>	7.750±0.31 b	17.740±0.34 a	8.250±0.33 b

4.10. Askorbat Peroksidaz (APX EC 1.1.1.11.) Aktivitesi

Askorbat peroksidaz, H₂O₂'in askorbat ile suya indirgenmesini katalizlemekte ve H₂O₂'in detoksifikasyonunda önemli rol oynayan bir enzimdir (Del Rio vd., 2003). *Homalothecium sericeum* ve *Hypnum cupressiforme*'nin Cu uygulanmış örneklerinde kontrole oranla anlamlı bir değişim görülmezken *Homalothecium sericeum*'un Pb uygulanmış kontrole oranla örneklerinde %18 oranında artma belirlenmiştir. *Homalothecium sericeum*'un Pb uygulanan örneklerinde H₂O₂ birikiminin olmaması artan APX aktivitesi ile açıklanabilir.

Çizelge 4.13. Ağır metal uygulanan *Homalothecium sericeum* ve *Hypnum cupressiforme*' nin APEX enzim spesifik aktiviteleri (U mg⁻¹ protein, Ortalama ± S.H, n=2)

Uygulamalar			
	Kontrol	Cu	Pb
<i>Homalothecium sericeum</i>	0.279±0.008 b	0.264±0.005 b	0.330±0.001 a
<i>Hypnum cupressiforme</i>	0.261±0.007 a	0.271±0.002 a	0.276±0.004 a

4.11. Askorbat Miktarı

Oksidatif stresin neden olduğu hasarı, serbest radikalleri indirgeyerek hasarı en aza indiren önemli bir antioksidandır. *Homalothecium sericeum* ve *Hypnum cupressiforme*' nin Cu uygulanan örneklerinde sırayla kontrole oranla %212 ve %225 oranında artış, Pb uygulanan örneklerde ise %31 oranında azalma %169 oranında artma belirlenmiştir.

Stres durumunda bitkilerde serbest radikallerden süperoksit, SOD enzimi aracılığıyla yada kendiliğinden olan bir dizmutasyonla hidrojen peroksit dönüşmektedir (Asada, 1992). Oluşan hidrojen peroksit askorbat ya da askorbat peroksidaz enzimi aracılığıyla etkisiz hale getirilmektedir. Denemelerimizde askorbat peroksidaz enzimi miktarında görece fazla değişiklik olmadığından hidrojen peroksiti askorbattın detoksifiye ettiği söylenebilir. Askorbattın elverişsiz çevresel koşulların meydana getirdiği oksidatif strese toleransın artmasıyla ilişkili olduğunu bildiren çeşitli çalışmalar rapor edilmiştir (Iturbe-Ormaetxe vd., 1998; Ceretto vd., 2002). Benzer şekilde *Taxihelium napalense*'de 12 ve 24 saat Cr uygulanmasından sonra bitkilerde askorbat miktarında önemli artışlar meydana geldiği belirlenmiştir (Choundry ve Panda, 2005).

Çizelge 4.14. Ağır metal uygulanan *Homalothecium sericeum* ve *Hypnum cupressiforme*' nin Askorbat miktarları ($\mu\text{mol g}^{-1}$, Ortalama \pm S.H, n=2)

	Uygulamalar		
	Kontrol	Cu	Pb
<i>Homalothecium sericeum</i>	22.214 \pm 0.82 c	69.345 \pm 0.35 a	15.319 \pm 0.42 b
<i>Hypnum cupressiforme</i>	10.513 \pm 0.42 b	34.239 \pm 5.95 a	28.346 \pm 2.70 ab

4.12. Prolin Miktarı

Prolin stres cevap mekanizmasını etkileyen stres sinyal mekanizmasının bir parçası olabilmektedir (Ashraf, 2007). *Homalothecium sericeum* ve *Hypnum*

cupressiforme' nin Cu uygulanan örneklerinde kontrolle kıyaslandığında sırası ile %66 ve %42 oranında artma, Pb uygulanan örneklerinde ise sırası ile %50 ve %30 artma belirlenmiştir.

Bitkilerde prolinin yüksek sıcaklık, kuraklık, tuzluluk, ağır metal, patojen enfeksiyonu, besin kıtlığı, atmosferik kirlenme ve UV ışınım gibi stres durumlarında genellikle arttığı bildirilmiştir (Vernay vd., 2008). Her iki metal uygulamasında da bitkilerde prolin miktarında meydana gelen prolin artışı bu metallerin bitkideki detoksifikasyonları ile ilgilidir. Ağır metal stresine bağlı olarak prolin miktarının çeşitli bryofit türlerinde arttığı yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Sun vd., 2011).

Çizelge 4.15. Ağır metal uygulanan *Homalothecium sericeum* ve *Hypnum cupressiforme*' nin prolin miktarları ($\mu\text{M g}^{-1}$, Ortalama \pm S.H, n=2)

Uygulamalar			
	Kontrol	Cu	Pb
<i>Homalothecium sericeum</i>	12.534 \pm 0.40 b	20.681 \pm 1.44 a	18.636 \pm 0.16 ab
<i>Hypnum cupressiforme</i>	2.817 \pm 0.16 b	4.022 \pm 0.32 a	3.690 \pm 0.40 ab

5. SONUÇ

Biryofitler beklenen fizyolojik ihtiyaçlarından daha fazla seviyelerde metal biriktirebilme yeteneğine sahiptirler. Bu özellik kısmen bu bitkilerin iyon değişim mekanizmaları, ayrıca bitkinin pürüzlü yüzey yapısı ile partiküllerin tutulması ve alıkonulmasını sağlayabilmeleri ile açıklanmaktadır. Ayrıca biryofitler gelişmiş bitkilerin aksine; özellikle bitki içerisine çözünür minerallerin difüzyonunu azaltan iyi gelişmiş kutikul yapısına ve kendileri için gerekli olan su ve madensel tuzları alabilecekleri gelişmiş kök yapılarına sahip olmamaları sebebi ile, üzerlerine ıslak veya kuru olarak düşerek birikmiş metalleri kendi mineral besinleri ve su alımları sırasında yüksek oranda almaktadırlar. Tez çalışmamızda kullanmış olduğumuz türler üzerinde Cu ve Pb olmak üzere iki ağır metal uygulaması yapılmış ve uygulanan metalleri biryofitlerin bünyelerinde biriktirdikleri belirtilmiştir. *Homalothecium sericeum* bakır ağır metalini daha yüksek oranda biriktirirken *Hypnum cupressiforme* her iki metalde aynı oranlarda bünyesinde biriktirmiş olduğu belirlenmiştir. Yapılmış olan çalışmalar incelendiğinde biryofitlerin metalleri birikim mekanizması olarak partiküllerin yakalanması için ideal bir yüzeye sahip olmaları ve çeperinde metal iyonlarının bağlanabileceği iyon değişim bölgelerinin varolması ile olabildiği rapor edilmiştir.

Homalothecium sericeum'un Cu ve uygulanmış örneklerinde kuru ağırlıkta azalma meydana gelirken, Pb uygulanan örneklerinde ise kuru ağırlıkta artış meydana gelmiştir. Kuru ağırlıkta artış meydana gelmesi bitki bünye ve yüzeyine tutunmuş olan metal iyonları sayesinde olabileceği gibi ağır metalin bitki büyüme ve gelişmesine ket vuramamış olmasından da gerçekleşmiş olabilir. Kuru ağırlıkta meydana gelen azalmaların sebebi ise bitkinin fizyolojik gelişim sürecinin olumsuz etkilenmesi sebebiyle olabilir.

Reaktif oksijen türü olan H_2O_2 miktarında *Homalothecium sericeum*'un Pb uygulanmış örneklerinde kontrole oranla fazla olmayan bir artış gözlenmiştir. *Hypnum cupressiforme*'nin Pb uygulanmış örneklerinde ise kontrole oranla artış gözlenmiştir. Her iki türünde Cu uygulanmış örneklerinde kontrole oranla önemli bir artış gözlenmiştir. Katalaz, askorbat peroksidaz gibi enzimler H_2O_2 'nin hızla yıkımını sağlayarak hücrede birikimini önlemektedirler. *Homalothecium sericeum*'un Pb uygulanmış örneklerinde kontrole oranla olan artışın fazla olmamasının nedeni olarak H_2O_2 oranının artmış olması ve askorbat peroksidaz aktivitesinde yükselmesi H_2O_2 'nin detoksifiye olmasını sağlayan antioksidant

mekanizmanın etkin çalışmasından kaynaklanmış olabilir. Aynı zamanda her iki türde de Cu uygulanan örneklerde meydana gelen artışların sebebi olarak katalaz aktivitesinde meydana gelen azalmalardan kaynaklandığını söyleyebiliriz.

Lipid peroksidasyonunda reaktif oksijen türlerinin artışı da MDA miktarında artışlara neden olmaktadır. MDA miktarı *Hypnum cupressiforme*'nin Cu ve Pb uygulanmış örneklerinde *Homalothecium sericeum*'a oranla daha önemli artış olduğu belirlenmiştir. *Hypnum cupressiforme*'nin Cu ve Pb uygulanan örneklerde ise bu artışın daha fazla olduğu görülmüştür. MDA artışı ise oksidatif stresin fizyolojik bakımdan önemli bir göstergesi olarak kabul edilmektedir.

Stres faktörlerinin yarattığı etkileri belirleyebilmenin diğer bir yolu da klorofil içeriğinin belirlenmesidir. *Homalothecium sericeum* 'un fotosentetik pigment içerikleri Cu uygulanan örneklerde; klorofil *a* da azalma, klorofil *b* de artma, total klorofil de artma, klorofil *a/b* de azalma olduğu belirlenirken Pb uygulanmış örneklerinde ise klorofil *a* da azalma, klorofil *b* de artma, total klorofilde artma, klorofil *a/b* de azalma olduğu belirlenmiştir.

Hypnum cupressiforme'nin fotosentetik pigment içerikleri Cu uygulanan örneklerde; Klorofil *a* da azalma, Klorofil *b* de artma, Total klorofil de azalma, Klorofil *a/b* de azalma belirlenirken Pb uygulanmış örneklerde ise Klorofil *a* da azalma, Klorofil *b* de artma, Total klorofil de azalma, Klorofil *a/b* de azalma olduğu belirlenmiştir.

Klorofil *a* miktarında meydana gelen azalmalara klorofil biyosentez mekanizmasının bozulması, klorofil biyosentezinde görevli olan enzimlerin inhibe edilmesi ya da klorofil parçalanması nedeniyle olabilir. Klorofil *a* ve klorofil *a/b* oranında meydana gelen azalma ağır metal toksisitesinin bir göstergesi olabilir. Total klorofil miktarında görülen azalma ise lipid peroksidasyonu sonucu meydana gelen klorofil degradasyonu ile fotosentezin engellenmesidir.

Homalothecium sericeum Cu ve Pb uygulanmış örneklerinde β -karoten, lutein ve neoksantin miktarlarında önemli miktarda artmalar meydana gelirken, total karotenoid miktarında azalma gözlenmiştir.

Hypnum cupressiforme'nin Cu ve Pb uygulanmış örneklerinde total karotenoid, β -karoten, lutein ve neoksantin miktarlarında önemli miktarda azalmalar meydana

gelmiştir. Bu azalma tilakoidlerde meydana gelen singlet oksijendeki artışla yada ağır metal stresi ile ilgili olabilir.

Çözünebilir protein miktarı incelendiğinde *Homalothecium sericeum* ve *Hypnum cupressiforme*'nin protein miktarlarının arttığı belirlenmiştir. Protein miktarında meydana gelen artışların sebebi olarak stres sonucu oluşan savunma mekanizmasının bir sonucu olan antioksidan enzimler ve stres proteinlerin sentezinin artmasından nedeni olabilir.

Stres koşulları altında hücreleri korumak ve ROT düzeylerini kontrol altında tutabilmek için bitki dokuları ROT'ni ortadan kaldıran Süperoksit dismutaz, Katalaz, Peroksidaz, Askorbat Peroksidaz gibi çeşitli enzimler ve düşük moleküler ağırlığa sahip antioksidanları (Askorbat, Glutasyon vb.) içermektedirler.

Homalothecium sericeum'un Cu uygulanmış örneklerinde askorbat peroksidaz aktivitesinde anlamlı bir değişim görülmezken askorbat miktarı artmış, süperoksit dismutaz ve peroksidaz aktivitesinde görülen artış, katalaz aktivitesinde görülen azalma yüksek derecede H₂O₂'nin birikimini açıklamaktadır.

Homalothecium sericeum'un Pb uygulanmış örneklerinde askorbat miktarları azalırken, süperoksit dismutaz, katalaz ve askorbat peroksidaz aktivitesinde artmalar meydana gelmiştir. Askorbat miktarında meydana gelen azalma Askorbat peroksidaz enzim aktivitesindeki artış ile paralellik göstermektedir.

Hypnum cupressiforme'nin Cu uygulanmış örneklerinde süperoksit dismutaz, peroksidaz aktivitelerinde artışlar meydana gelirken askorbat miktarında anlamlı bir artış görülmüştür. Katalaz aktivitesinde meydana gelen azalmanın nedeni olarak bakır katyonları gibi ağır metal iyonlarının katalazın yararışlı olmayan inhibitörleri gibi davranıp enzim aktivitesini durdurmasındandır.

Hypnum cupressiforme'nin Pb uygulanmış örneklerinde Süperoksit dismutaz, katalaz ve askorbat miktarında artma meydana gelmiştir.

Homalothecium sericeum ve *Hypnum cupressiforme*'nin Cu ve Pb uygulanmış örneklerinde prolin miktarının kontrole göre arttığı belirlenmiştir. Prolin miktarında meydana gelen artışlar her iki türünde metal tolerans mekanizması ile ilgilidir.

Bu çalışmada *Homalothecium sericeum* ve *Hypnum cupressiforme* türlerine ilişkin bakır ve kurşun ağır metallerinin oluşturduğu kısa süreli fizyolojik ve biyomyasal tepkiler belirlenmiştir. Ancak konunun süperoksit, hidroksil gibi serbest radikaller ve diğer antioksidan enzim parametreleri açısından değerlendirilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H. S., Jain, S.K., Athar, M. 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus*) is a biomarker of paper mill effluent exposure. **Biochimica Biophysica Acta-General Subjects**, 1523: 37-48.
- Akkuş, İ. 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, Konya.
- Alscher, R.G., Ertürk, N., Heath, L.S. 2002. Role of superoxide dismutases in controlling oxidative stress in plants. **J. Exp. Bot.**, 53:1331-1341.
- Artan, R.O. 2007. Ağır Metal İçeren Atık Suların İleri Arıtımında Su Mercimeği (*Lemna sp.*) Bitkisinin Kullanılması. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana.
- Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase-hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiol. Plant.**, 85: 235-241.
- Asharf, M., Foolad, M. R. 2007. Roles of glycine betain and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environ. Exp. Bot.**, 59: 206-216.
- Baek, K.H., Skinner, D.Z. 2003. Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. **Plant Science**, 165 (6): 1221-1227.
- Basile, A., Sorbo, R., Aprile G., Conte, B., Castaldo, C., Cebianchi, R. 2008. Comparison of the heavy metal bioaccumulation capacity of an epiphytic moss and an epiphytic lichen. **Environ. Poll.**, 151(2):401-7.
- Bassi, M., Corradi, M. G. ve Realini, M. 1990. Effect of chromium (VI) on two freshwater plants, *Lemna minor* and *Pistia stratiotes*, 1 Morphological Observations. **Cytobios**, 62: 27.
- Bauchamp, C., Fridovich, A. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analy. Biochem.**, 44: 276-287.

- Bates, L. S. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, 39: 205-207.
- Bazzas, F. A., Carlson, R. W., Rolfe, G. L. 1974. The effect of heavy metals on plants. **Environ. Poll.**, 7: 241-246.
- Benavides, M.P., Gallego, S.M., Tomaro, M.L. 2005. Cadmium toxicity in plants, **Braz. J. Plant Physiol.**, 17(1): 21-34.
- Berg, T., Royset, O., Steinnes, E. 1995. Moss (*Hylocomium splendens*) used as biomonitor of atmospheric trace element deposition: estimation of uptake efficiencies. **Atmos. Environ.**, 29: 353-360.
- Bergmeyer, J., Garlb, M. 1983. Methods of Enzymatic Analysis. 190-302. Germany.
- Boswell, C., Sharma, N. C., Sahi, S. V. 2002. Copper tolerance and accumulation potential of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Bull. Environ. Contamin. Toxicol.**, 69:546-553.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analy. Biochem.**, 72: 248-254.
- Briggs, D. 1972. Population differentiation in *Marchantia polymorpha* L.'in various lead pollution levels. **Nature**, 238: 166-167.
- Brown, D.H, Wells, J.M. 1990. Physiological effects of heavy metals on the moss *Rhytidiadelphus squarrosus*. **Ann. Botany**, 66: 641-647.
- Brown, D.H. 1984. Uptake of Mineral Elements and Their Use in Pollution Monitoring. In *The Experimental Biology of Bryophytes*. Academic Press, New York.
- Brown, D.H., Buck, G.W. 1985. The cellular location of metals in two bryophytes and a lichen. **Cryptogamie: Bryologie et Lichenologie**, 6: 279-286.
- Burns I., Sutter, K., Menge, S., Neumann, D., Krauss, G.J. 2001. Cadmium lets increase the glutathione pool in bryophytes. **J. Plant Physiol.**, 158: 79-89.

- Burton, M.A.S., Peterson, P.J., 1979. Studies on Zn localization in aquatic bryophytes. **Bryologist**, 82: 594-598.
- Burton, G.W., Ingold, K.U. 1984. β -carotene: an unusual type of lipid antioxidant. **Science**, 224: 569-573.
- Burzynski, M., Grabowski, A. 1984, Influence of lead on NO_3^- uptake and reduction in cucumber seedlings, **Acta Soc. Bot. Pol.**, 53: 77-80.
- Cakmak, I., Horst, W.J. 1991. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiol. Plant.**, 83: 463-468.
- Carreras, H. A., Pignata, M. L. 2007. Effects of heavy metals Cu^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , and Zn^{2+} on some physiological parameters of the lichen *Usnea ambyloclada*. **Ecotoxicol. Environ. Safety**, 67: 59-66.
- Chettri, M.K., Cook, C. M., Vardaka, E., Sawidis, T., Lanaras T. 1998. The Effect of Cu, Zn and Pb on the chlorophyll content of the lichens *Cladonia convoluta* and *Cladonia rangiformis*. **Environ. Exp. Bot.**, 39: 1-10.
- Cho, U.H., Park, J.O. 2000. Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings. **Plant Science**, 156: 1-6.
- Choudhury, S., Panda, S.K. 2005. Toxic effects, oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium nepalense* (Schwaegr.) Borth under chromium and lead phytotoxicity. **Water Air Soil Pollution**, 167: 73-90.
- Clemens, S. 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. **Biochimie**, 88: 1707-1719.
- Conti, M. E., Cecchetti, G. 2001. Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment. **Environ. Poll.**, 114: 471-492.
- Corpas, F.J., Barrasso, J.B., Del Rio, L.A. 2001. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. **Trends Plant Science**, 6: 145-150.

- Dazy, M., Masfaraud, J.F. 2009. Induction of oxidative stress biomarkers associated with heavy metal stress in *Fontinalis antipyretica* Hedw. **Chemosphere**, 75: 297-302
- Del Rio, L.A., Standalio, L.M., Altomare, D. A., Zilinskas, B.A. 2003. Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. **J. Exp. Bot.**, 54: 923-933.
- Demireuska-Kepova, K., Simova-Stoilova, L., Stoyanova, Z., Holzer, R., Feller, U., 2004. Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. **Environ. Exp. Bot.**, 52: 253-266.
- Devi, S. R., Prasad, M.N.V. 1998. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (coontail), a free floating macrophyte: response of antioxidant enzymes and antioxidants. **Plant Science**, 138: 157-165.
- Didierjean, L., Frendo, P., Nasser, W., Genot, G., Marivet, J., Burkard, G. 1996. Heavy metal-responsive genes in maize: identification and comparison of their expression upon various forms of abiotic stress. **Planta**, 199: 1-8
- Fang, W.C., Kao, C.H. 2000. Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc. **Plant Science**, 158: 71-76.
- Folkesson, L., Andersson-Bringmark, E. 1988. Impoverishment of vegetation in a coniferous forest polluted by copper and zinc. **Can. J. Bot.**, 66: 417-428
- Foy, C.H., Halliwell, B. 1978. The physiology of metal toxicity in plants. **Ann. R. Plant Physiol.**, 29: 511-566.
- Foyer, C.H., Lelandais, M., Kunert, K.J. 1994. Photoxidative stress in plants. **Physiol. Plant.**, 92: 696-717.
- Garcia-Hernandez, M., Murphy, A., Taiz, L. 1998. Metallothioneins 1 and 2 have distinct but overlapping expression patterns in *Arabidopsis*. **Physiol. Plant.**, 118: 387-397.
- Garcia-Limones, C., Hervas, A., Navas-Cortes, J.A., Jimenez-Diaz, R.M., Tena, M. 2002. Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions

between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris*. **Physiol. and Mol. Plant Pathol.**, 61: 325-337.

Goldbold, D.L., Kettner, C. 1991. Lead influences root growth and mineral nutrition of *Picea abies* seedlings. **J. Plant Physiol.**, 13: 95-96.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1990. Role of free radicals and Catalytic metal ions in human disease: An overview. **In: Methods in Enzymology**, 186: 1-85.

Halliwell, B. 1994. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, 52(8): 253-265.

Halliwell, B., Clement, M.V., Long, L.H. 2000. Hydrogen peroxide in the human body. **FEBS Letter**, 486: 10-13.

Hartmut, K. L., Hak, R., Rinderle, U. 1990. The chlorophyll fluorescence ratio F690/F730 in leaves of different chlorophyll content. **Photosynthesis Research**, 25: 295-598.

Havaux, M., Klopstech, K. 2001. The protective functions of carotenoid and flavanoid pigments against excess visible radiation at chilling temperature investigated in *Arabidopsis* Npq and Tt mutants. **Planta**, 213: 953-966.

Heath, R. L. 1994. Possible mechanisms for the inhibition of photosynthesis by ozone. **Photosynthesis Research**, 39: 439- 451.

Hernandez, J.A., Ferrer, M.A., Jimenez, A., Barcelo, A.R., Sevilla, F. 2001. Antioxidant systems and O₂/H₂O₂ production in the apoplast of pea leaves.

Its relation with salt induced necrotic lesions in mirror veins. **Plant Physiol.**, 127: 817-831.

Herzog, V., Fahimi, H.D. 1973. A new sensitive colorimetric assay for peroxidase, using 3,3'- Diaminobenzidine as hydrogen donor. **Analy. Biochem.**, 55: 554-562.

- Iturbe-Ormaetxe, I., Escuredo, P. R., Arres-Igor, C., Becana, M. 1998. Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. **Plant Physiol.**, 116: 173-181.
- Iqbal, J., Mustaq, S. 1987. Effect of lead on germination, early seedling growth, soluble protein and acid phosphatase content in *Zea mays*. **Pak. J. Sci. Ind. Res.**, 30: 853-858.
- Jimenez, A., Hernandez, J.A., Del Rio, L.A., Sevilla, F. 1998. Evidence for the presence of ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. **Plant Physiol.**, 114: 275-284.
- Kaçkar, B., İnal, A. 2008. Bitki Analizleri. Nobel Yayıncılık, Yayın No=1241.
- Kampfenkel, K., Van Mountagu, M., Inzé, D. 1995. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. **Analy. Biochem.**, 225: 165-167.
- Kastori, R., Petrovic, M., Petrovic, N. 1992. Effects of excess lead, cadmium, copper and zinc on water relations in sunflower. **J. Plant Nutrit.**, 15: 2427-2439.
- Keleş, Y. 2000. Bazı Çevresel Streslerin Etkisinde Kalan Buğday (*Triticum aestivum* L. ve *Triticum durum* Desf.) Fidelerinde Çeşitli Fizyolojik ve Biyokimyasal Değişimlerin İncelenmesi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.
- Kennedy, C.D., Gonsalves, F.A.N. 1987. The action of divalent zinc, cadmium, mercury, copper and lead on the trans-root potential and efflux of excised roots. **J. Exp. Bot.**, 38: 800-817
- Kılınç, K. 1985. Oksijen radikalleri, üretilmeleri, fonksiyonları ve toksik etkileri. **Biyokimya Dergisi**, 10: 60-89.
- Kramer, U., Cotter-Howells, J.M., Charnock, J.M., Baker, A.J.M., Smith, A.C. 1996. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. **Nature**, 379: 635-638.

- Kurt, S. 2012. *Pleuruchaete squarrosa* ve *Timmiella barbuloides*'in Ağır Metal Stresine Verdiği Cevapların Araştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Lambers, H., Chapin F.S., Pons, T.L. 1998. Plant Physiological Ecology. Springer-Verlag, Berlin.
- Landberg, T., Greger, M. 2002. Differences in oxidative stress in heavy metal resistant and sensitive clones of *Salix viminalis*. **J. Exp. Bot.**, 159: 69-75.
- Larcher, W., 1995. Physiological Plant Ecology, Published by Springer, ISBN 0-387-09795-3, New York.
- Maxwell, D. P., Wang, Y., McIntosh, L. 1999. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 96: 8271-8276.
- Mazhoudi, S., Chaoui, A., Habil Ghorbal, M., El Ferjani, E. 1997. Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.). **Plant Science**, 127(2): 129-137.
- McKersie, D.B. 1996. Oxidative stress, www.agronomy.psu.edu/Courses/AGRO518/Oxygen.htm.
- Mohan B.S., Hosetti, B.B. 1997. Potential phytotoxicity of lead and cadmium to *Lemna minor* grown in the sewage stabilization ponds. **Environ. Poll.**, 2: 133-238.
- Monni, S., Uhling, C., Hansen, E., Magel, E. 2001. Ecophysiological responses of *Empetrum nigrum* to heavy metal pollution. **Environ. Poll.**, 112: 121-129.
- Moustakas, M., Lanaras, T., Symeonidis, L., Karataglis, S. 1994. Growth and some photosynthetic characteristics of field grown *Avena sativa* under copper and lead stress. **Photosynthetica**, 30: 389-392.
- Munne-Bosch, S., Penvelas, J. 2004. Drought-induced oxidative stress in strawberry tree (*Arbutus Unedo* L.) growing in mediterranean field conditions. **Plant Science**, 166: 1105-1110.

- Murray R., Grander D., Mayes P., Rodwel, V. 1996. Harper'ın Biyokimyası. 24. baskı, (Çev: Dikmen N., Özgünen T.), Barış Kitabevi, İstanbul.
- Nash, E.H. 1972. Effect of Effluents from a Zinc Smelter on Mosses. Rutgers University, Ph. D. Thesis, Nishio.
- Nieboer, E., Richardson, D.H.S., Tomassini, F.D. 1978. Mineral uptake and release by lichens: an overview. **Bryologist**, 81: 226-246.
- Nielsen, H.D., Brownlee, C., Coelho, S.M., Brown, M. 2003. Inter-population differences in inherited copper tolerance involve photosynthetic adaptation and exclusion mechanisms in *Fucus serratus*. **New Phytol.**, 160: 157-165.
- Nikookar, K., Moradshahi, A., Hosseini, L. 2005. Physiological responses of *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta* to copper toxicity. **Biomolecular Engineering**, 22(4): 141-146.
- Ohkawa, H., Ohishii N., Yagi, Y. 1979. Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. **Environ. Poll.**, 95:51-358.
- Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E. 2002. İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Öncel, I., Keleş, Y., Üstün, A.S. 2000. Interactive effects of temperature and heavy metal stres on the growth and some biochemical compaunds in wheath seedlings. **Environ. Poll.**, 107: 315-320.
- Öztürk, İ., Ubay, G., Samsunlu, A., Eroğlu, V. 1992. Türkiye'deki Belediyelerin Çevre Mühendisliği Altyapı Meselelerinin Boyutları. Türk Devletleri Arasında I. İlmi İşbirliği Konferansı Tebliğler Kitabı, Lefkoşe, KKTC.
- Panda, S.K., Choundhury, S. 2005. Changes in nitrate reductase activity and oxidative stress in the moss *Polytrichum commune* subjected to chromium, copper and zinc toxicity. **Bra. J. Plant Physiol.**, 17: 191-197.
- Patterson, B.D., Elspeth, A., Furguson, I.B. 1984. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV). **Environ. Poll.**, 139: 487-92.

- Prasad, K.V., Paradha-Saradhi, P., Sharmila, P. 1999. Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*. **Environ. Exp. Bot.**, 42: 1-10.
- Poskuta, J.W., Parys, E. ve Ramanowska, E. 1987. The effects of lead on the gaseous exchange and photosynthetic carbon metabolism of pea seedlings. **Acta Soc. Bot. Pol.**,56: 127-130.
- Rao, K.V.M., Stresty, T.V.S. 2000. Antioxidative parameters in seedings of pigeonpea (*Cajanus Cajan (L.) Millspaugh*) in response to Zn and Ni stresses. **Plant Science**, 157: 113-128.
- Romero-Putertas, M. C., McCarthy, I., Sandalio, L.M., Palma, J.M., Corpas, F.J., Gomez, M., Del Rio, L.A. 1999. Cadmium toxicity and oxidative metabolism of pea leaf peroxisomes. **Free Radical Research**, 31: 25-31.
- Satake, K., Soma, M., Seyama, H., Uehiro, T. 1983. Accumulation of mercury in the liverwort *Jungermannia vulcanicola* Steph. in an stream Kashiranashigawa in Japan. **Archive Fuér Hydrobiologie**, 99: 80-92.
- Satake, K., Miyasaka, K. 1984. Evidence of high mercury accumulation in the cell wall of the liverwort *Jungermannia vulcanicola* Steph. to form particles of a mercury-sulphur compound. **J. Bryol.**, 13: 101-105.
- Schickler, H., Caspi, H. 1999. Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stres in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*. **Physiol. Plant.**, 105(1): 39-44.
- Secenji, M., Bebes, A., Hideg, É. ve Györgyey, J. 2008. Transcriptional changes in ascorbate-glutathione cycle under drought conditions. **Acta Biologica Szegediensis**, 52(1): 93-94.
- Shakya K., Chettri M. K., Sawidis, T. 2008 Impact of heavy metals (copper, zinc and lead) on the chlorophyll content of some mosses. **Arch. Environ. Contamin. Toxicol.**, 54(3): 412-421.

- Shao, H-B., CHU, L-Y., Jaleel, C.A., Zhao, C-X. 2008. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. **Comptes Rendus Biologies**, 331(3): 215-225.
- Shen, Z.G., Zhang, F.Q., Zhang, F.S. 1998. Toxicity of copper and zinc in seedlings of mung bean and inducing accumulation of polyamine. **J. Plant. Nutr.**, 21: 1153–1162.
- Simola, L.K. 1977. Growth and ultrastructure of *Sphagnum fimbriatum* cultured with arsenate, fluoride, mercury and copper ions. **J. Hattori Bot. Lab.**, 43: 365-377.
- Sinha, S., Saxena, R. 2006. Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and non-enzymatic antioxidants and bacoside-a content in medicinal plant *Bacopa monnieri* L. **Chemosphere**, 62: 1340-1350.
- Siripornadulsil, S., Train, S., Verna, D.P.S., Sayre, R.T. 2002. Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. **Plant Cell**, 14: 2837-2847
- Smith, A.J.E. 2004. The Moss Flora of Britain and Ireland. Cambridge Univ., New York.
- Sossé, B. A., Genet, P., Dunand-Vinit, F., Toussaint, L. M., Epron, D., Badot, P. M. 2004. Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. **Plants Science**, 166: 1213-1218.
- Steinnes, E. 1995. A critical evaluation of the use of naturally growing moss to monitor the deposition of atmospheric metals. **Sci. Total. Environ.**, 160: 243-249.
- Stevenson, R., Bothwell, L., Lowe, L. 1996. Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems.
- Stresty, T.V.S., Madhava Rao, K.V. 1999. Ultrastructural alterations in response to zinc and nickel stress in the root cell of pigeonpea. **Environ. Exp. Bot.**, 41: 3-13.

- Sun, S.Q., He, M., Cao, T., Zhang, C.H. 2009. Response mechanisms of antioxidants in bryophyte (*Hypnum plumaeforme*) under the stress of single or combined Pb and/or Ni. **Environ. Mon. Assess.**, 149: 291-302.
- Sun, S.Q., Wang, G. X., He, M., Cao, T. 2011. Effects of Pb and Ni stress on oxidative stress parameters in three moss species. **Ecotoxicol. Environ. Safety.**, 74: 1630-1635.
- Taulavuori, E., Hellstrom, E., K., Taulavuori, K., Laine, K. 2001. Comparison of two methods used to analyse lipid peroxidation from *Vaccinium myrtillus* (L.) during snow removal, reacclimation and cold acclimation. **J. Exp. Bot.**, 52(365): 2375-2380.
- Tewari, R.K., Kumar, P., Sharma, P.N., Bisht, S.S. 2002. Modulation of oxidative stress responsive enzymes by excess cobalt. **Plant Science**, 162: 381-388.
- Thomas, W. 1983. Über die Verwendung von Pflanzen zur Analyse räumlicher Spurensubstanz-immissionsmuster. **Staub Reinhalt**, 43: 141-148.
- Turner, R.G., Marshall, C. 1971. The accumulation of Zn by root homogenates of Zn-tolerant and non-tolerant clones of *Agrotis tenuis* Simbth. **New Phytologist**, 70: 539-54.
- Tonguç, Ö. 1995. Flora of Turkey (Mosses). *Tübitak Journal of Science and Technology*, 327: 80-82.
- Tremper, A. H., Agneta, M., Burton, S., Higgs, D.E.B. 2004. Field and laboratory exposures of two moss species to low level metal pollution. **J. Atm. Chemistry**, 49(1-3): 111-120.
- Tyler, G. 1989. Uptake, retention and toxicity of heavy metals: A Literature Review. **The Botanical Journal of the Linnean Society**, 104: 231-333.
- Tyler, G. 1990. Bryophytes and heavy metals: A literature Review. **The Botanical Journal of the Linnean Society**, 104: 231-253.
- Vernay, P., Gauthier-Moussard, C., Jean, L., Bordas, F., Faure, O., Ledoigt, G., Hitmi, A. 2008. Effect of chromium species on phytochemical and physiological parameters in *Datura innoxia*. **Chemosphere**, 72: 763-771.

- Wellburn, A. R. 1994. The spectral determination of chlorophyll a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **J. Plant Physiol.**, 144: 307-313.
- Xiang, C., Oliver, D.J. 1998. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, 10: 1539-1550.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : İlknur Kuzu
Doğum Yeri ve Tarihi : Kadıköy, 25.11.1989

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Edebiyat
Fakültesi, Biyoloji Bölümü
2007-2011
Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi,
Fen Bilimleri Enstitüsü,
Biyoloji Anabilim Dalı
2012-2015
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

İŞ DENEYİMİ

	Yıl	Görev
Darıca Farabi Devlet Hastahanesi	2014-Halen	Biyolog
Uğur Dershaneleri Dershaneleri	2014	Biyoloji Öğretmeni

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

Bildiriler

1. Erdağ B, Emek Y. Bağdatlı M.N ve Kuzu İ. *Nepeta nuda subsp. nuda*'nın (*Lamiaceae*) *In vitro* Tohum Çimlenmesi ve Fide Gelişimi (Poster Bildiri). 21. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı) (Poster Bildiri). 3-7 Eylül 2012, İzmir, Türkiye.
2. Emek Y., Kuzu I, Bağdatlı M.N, Erdağ, B. *Nepeta cadmea* Boiss.' nin *in vitro* tohum çimlenmesi üzerine ışığın etkisi ve *in vitro* fide gelişimi (Poster Bildiri). Ekoloji 2013 Sempozyumu Bildiri Kitabı s.147, 2-4 Mayıs 2013, Tekirdağ, Türkiye.

3. Erdağ B., Emek Y., Kuzu I., Bağdatlı M.N. *Nepeta nuda* ssp. *albiflora*'nın *in vitro* tohum çimlenmesi ve aksiller sürgün çoğaltımı. Ekoloji 2013 Sempozyumu Bildiri Kitabı (Poster Bildiri). s.135, 2-4 Mayıs 2013, Tekirdağ, Türkiye.
4. Erdağ B., Bağdatlı M.N., Kuzu I., Emek Y. *Bryum capillare* Hedw. (*Bryaceae*) 'nin *in vitro* spor çimlenmesi ve protonema morfolojisi üzerine kurşunun etkisi (Poster Bildiri). Ekoloji 2013 Sempozyumu Bildiri Kitabı s.133, 2-4 Mayıs 2013, Tekirdağ, Türkiye.
5. Emek Y., Kuzu I., Bağdatlı M.N. Endemik *Nepeta cadmea* 'nın *in vitro* tohum çimlenmesi üzerine araştırmalar (Poster Bildiri). 22. Ulusal Biyoloji Kongresi Bildiri Kitabı, 23-27 Haziran 2014, Eskişehir, Türkiye.
6. Emek Y., Kuzu I., Bağdatlı M.N. Endemik *Nepeta viscida* fidelerinin gelişimi üzerine farklı *in vitro* besin ortamlarının etkisi (Poster Bildiri). 22. Ulusal Biyoloji Kongresi Bildiri Kitabı, 23-27 Haziran 2014, Eskişehir, Türkiye.
7. Emek Y., Bağdatlı M.N., Kuzu I. *Nepeta viscida*'nın *in vitro* tohum çimlenmesi üzerine farklı *in vitro* besin ortamlarının, ışığın ve giberellik asitin etkisi (Poster Bildiri). 22. Ulusal Biyoloji Kongresi Bildiri Kitabı, 23-27 Haziran 2014, Eskişehir, Türkiye.
8. Emek Y., Bağdatlı M.N., Kuzu I. Endemik *Nepeta cadmea*'nın (*Lamiaceae*) *in vitro* aksiller sürgün yoluyla çoğaltımı (Sözlü Bildiri). 22. Ulusal Biyoloji Kongresi Bildiri Kitabı, 23-27 Haziran 2014, Eskişehir, Türkiye.
9. Kuzu I., Emek Y., Bağdatlı M.N., Demir E. Farklı *In vitro* Besin Ortamlarında Yetiştirilen Endemik *Nepeta viscida* Fidelerinin Fotosentetik Pigment İçeriklerinin Belirlenmesi (Poster Bildiri). 22. Ulusal Biyoloji Kongresi Bildiri Kitabı, 23-27 Haziran 2014, Eskişehir, Türkiye.
10. Erdağ B., Bağdatlı M.N., Kuzu I., Erdağ A. *Homalothecium sericeum* (*Bryophyta*)'un *In vitro* Spor Çimlenmesi ve Protonema Gelişimi Üzerine Farklı Ağır Metallerin Etkisi (Poster Bildiri). 22. Ulusal Biyoloji Kongresi Bildiri Kitabı, 23-27 Haziran 2014, Eskişehir, Türkiye.
11. Erdağ B., Kuzu İ., Kaptan M.A., Aydın G. *Anacolia webbii* (*Bryophyta*) nin Fotosentetik Pigment İçeriği Üzerine Farklı Ağır Metallerin Etkisi

(Poster Bildiri). 22. Ulusal Biyoloji Kongresi Bildiri Kitabı, 23-27 Haziran 2014, Eskişehir, Türkiye.

Katıldığı Projeler

1. *Homalothecium sericeum* (Bryophyta) türünde *in vitro* koşullarda erken gelişim evrelerinin izlenmesi (BAP, FEF 13003, araştırmacı).
2. *Lamiaceae* familyasına ait *Nepeta* L. cinsinin bazı endemik türlerinin *in vitro* çimlenmesi ve fide gelişimi üzerine araştırmalar (BAP, FEF 12011, araştırmacı).

İLETİŞİM

E-posta Adresi : ilknur.kuzu@hotmail.com

Tarih :