

**LEMNA CİNSİNE AİT BAZI BİTKİ TÜRLERİNİN BOR (B)'A KARŞI  
OLUŞTURDUKLARI MORFOLOJİK VE ENZİMATİK TEPKİLERİNİN  
BELİRLENMESİ VE BİYOREMEDİASYON POTANSİYELLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

Nurcan GÜR

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Şubat-2016

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1402F049**

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Nurcan GÜR'ün "***Lemna* Cinsine Ait Bazı Bitki Türlerinin Bor (B)'a Karşı Oluşturdukları Morfolojik ve Enzimatik Tepkilerinin Belirlenmesi ve Biyoremediasyon Potansiyellerinin Araştırılması**" başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi ..... tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

**Adı-Soyadı**

**İmza**

**Üye (Tez Danışmanı) : Doç. Dr. Harun BÖCÜK**

**Üye : Prof. Dr. Cengiz TÜRE**

**Üye : Yrd. Doç. Dr. İsmail POYRAZ**

**Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun**  
..... tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### **LEMNA CİNSİNE AİT BAZI BİTKİ TÜRLERİNİN BOR (B)'A KARŞI OLUŞTURDUKLARI MORFOLOJİK VE ENZİMATİK TEPKİLERİNİN BELİRLENMESİ VE BİYOREMEDİASYON POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nurcan GÜR

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Harun BÖCÜK

2016, 60 sayfa

Bu çalışmada, 2, 4, 8, 16, 32, 64 ve 128 ppm B konsantrasyonuna sahip sulara maruz bırakılan *Lemna minor* L. ve *Lemna gibba* L. (Lemnaceae) bitkilerinin büyüme parametreleri, antioksidan enzim aktiviteleri ve biyoremediasyon potansiyelleri laboratuvar koşulları altında araştırılmıştır. Bu amaçla *L. gibba* ve *L. minor*, 7 günlük deney periyodu boyunca OECD, 2002 test protokolüne göre kültüre alınmış ve çeşitli B konsantrasyonlarında büyütülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre, her iki bitki türünün B birikimlerinin başlangıç konsantrasyonuna göre kademeli olarak arttığını göstermektedir. Bitkilerin kuru ağırlığının B konsantrasyonu *L. minor* ve *L. gibba* için en az (kontrol grubu) sırasıyla 700,6 ve 859,6 mg kg<sup>-1</sup> iken en yüksek değerler 128 ppm B deney setinde sırasıyla 4007,5 ve 5091,7 mg kg<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur. Ancak, nisbi büyüme oranları bu artışın tersine 16 ppm'den itibaren azalış göstermiştir. Bor'un remediasyon sonuçlarına göre su kaplarındaki en fazla azalış 16 ppm ve üzeri konsantrasyonlarda görülmüştür. Bu nedenle, sonuçlar 16 ppm B konsantrasyonlarındaki B ile kirletilmiş sulara bu bitkilerin kritik biyoindikatör seviyesinde hassas bir nokta olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Son olarak, özellikle B kirliliğinin bulunduğu alanlarda, B düzeylerinin biyolojik olarak izlenmesi veya temizlenmesi için yerel halkında kullanılabileceği basit, etkili ve çevre dostu bir model ortaya koymuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Fitoremediasyon, toksisite, *Lemna gibba*, *Lemna minor*, ekolojik indikatör, ekolojik monitör

## ABSTRACT

Master of Science Thesis

### INVESTIGATION OF MORPHOLOGICAL AND ENZYMATIC REACTIONS OF SOME *LEMNA* SPECIES AGAINST BORON (B) AND THEIR BIOREMEDIATION POTENTIALS

Nurcan GÜR

Anadolu University

Graduate School of Sciences

Biology Program

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Harun BÖCÜK

2016, 60 pages

In this study, growth parameters, antioxidant enzyme activities and bioremediation potentials of *Lemna minor* L. and *Lemna gibba* L. (Lemnaceae) exposed to waters with 2, 4, 8, 16, 32, 64 and 128 ppm boron (B) concentrations were investigated under laboratory conditions. To reach this aim, both the plant species were cultured and grown in various B concentrations according to OECD, 2002 test protocol during 7-day test period. Results showed that B accumulation of both plants gradually increased when compared with their B concentration before starting the experiments. Minimum B concentration in dry weight of *L. gibba* and *L. minor* were determined in control group as 700.6 and 859.6 mg kg<sup>-1</sup> respectively and maximum values were 4007.5 and 5091.7 mg kg<sup>-1</sup> in the experiment set with 128 ppm B concentration respectively. However, relative growth rates decreased since the experiment set with 16 ppm B concentration. Results demonstrated that 16 ppm B concentration in water seemed to be a susceptible endpoint for both plant species that could be used as a critical bioindicator level of B contaminated water. As a result, this study demonstrated an effective and environmentally friendly model for the areas with B pollution to monitor useful B levels in the environment.

**Keywords:** Phytoremediation, toxicity, *Lemna gibba*, *Lemna minor*, ecological indicator, ecological monitor

## TEŞEKKÜR

Danışmanım Doç. Dr. Harun BÖCÜK'e tez boyunca yaptığı katkılardan dolayı teşekkür ederim.

Çalışma boyunca bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren Arş. Gör. Dr. Onur Can TÜRKER, Prof. Dr. Cengiz TÜRE, Yrd. Doç. Dr. Volkan KILIÇ, Doç. Dr. Gözde AYDOĞAN KILIÇ ve Doç. Dr. Emel SÖZEN'e müteşekkirim.

Tezin laboratuvar çalışmaları aşamasında yardımcı olan ve imkan sağlayan Uzman Erdoğan ÇAKIR, Teknisyen Mustafa KARAKAŞ'a, Arş. Gör. Nilgün POYRAZ ile Arş. Gör. Dr. Gülçin IŞIK'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Biyoloji Bölümü öğrencilerinden Erhan İLTER, Anıl YAKAR, Şeyda UÇARCAN ve Murat KAYA'ya teşekkür ederim.

Her konuda maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme ve Eray BELER'e desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ. ....	ix
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERYAL VE METOT</b>	<b>6</b>
2.1. Araştırma Yeri ve Biyoiklimsel Sentez.....	6
2.1.1. Araştırma yeri .....	6
2.2.2. Biyoiklimsel sentez.....	7
2.2. Kültür Şartları.....	8
2.2.1. Ön kültüre alma işlemi .....	8
2.2.2. Kültüre alma işlemi .....	9
2.3. Kültür Solüsyonu ve Kullanılan Malzemeler .....	10
2.4. Toksikite Deneyi.....	11
2.5. Deney Rapor Düzeni ve Deneyin Gözlemlenmesi.....	12
2.6. Klorofil Analizi .....	13
2.7. Enzim Deneyleri.....	13
2.7.1. <i>L. minor</i> ve <i>L. gibba</i> bitkilerinin enzim deneylerine hazırlanma aşaması.....	13
2.7.2. Askorbat peroksidaz enzim aktivitesinin belirlenmesi (APX) .....	14

2.7.2.1 Potasyum fosfat tamponu.....	14
2.7.3. APX enzim aktivitesi.....	14
2.7.4. Katalaz enzim aktivitesi (CAT).....	15
2.7.5. Guaiakol peroksidaz aktivitesi (GPX).....	15
2.7.6. Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi (SOD).....	16
2.7.7. Glutasyon redüktaz enzim aktivitesi (GR).....	16
2.8. Protein Miktarının Belirlenmesi.....	16
2.9. İstatistiksel Analiz.....	17
2.10. Kullanılan Cihazlar.....	17
<b>3. BULGULAR</b>	<b>18</b>
3.1. Toksikite Deneyleri.....	18
3.1.1. Yaprak sayısı.....	19
3.1.2. Nispi gelişme oranları (Relative growth rate).....	24
3.1.3. Klorofil miktarı.....	26
3.1.4. Biyomas sonuçları.....	27
3.2. Biyoremediasyon Deneyleri.....	28
3.2.1. Su analiz sonuçları.....	29
3.2.2. Biyoremediasyon deneyi pH ve iletkenlik.....	32
3.2.3. Bitkilerin B akümüasyonu.....	33
3.3. Enzim Deneyleri.....	35
<b>4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>38</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>49</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1. Çalışma Alanına (Eskişehir) ait iklim diyagramı.....	6
2.2. Ön kültüre alma periyodu ve bitkilerin yetiştirilmesi .....	9
2.3. Kültür periyoduna alınan <i>Lemna minor</i> (a) ve <i>Lemna gibba</i> (b) türleri .....	10
3.1. Ön kültür periyodu sonunda Lemna türlerinde oluşan yosunlanmanın tespit edilmesi (a) ve ortamdaki yosunlanmanın giderilmesi için yetiştirildiği yeni ortam konsantrasyonu (b) .....	18
3.2. <i>Lemna minor</i> bitkisinin 7 günlük toksisite deneyi boyunca yaprak sayısının değişimi.....	19
3.3. Toksikite deney süresi içerisinde 4 gün boyunca 2 ppm-kontrol (a), 4 ppm (b), 8 ppm (c), 16 ppm (d), 32 ppm (e), 64 ppm (f) ve 128 ppm (g) bor konsantrasyonlarına maruz bırakılan <i>Lemna minor</i> bitkilerinin genel durumları.....	20
3.4. <i>Lemna gibba</i> 'nın 7 günlük toksisite deneyi boyunca yaprak sayısı değişimi	21
3.5. Toksikite deney süresi içerisinde 4 gün boyunca 2 ppm-kontrol (a), 4 ppm (b), 8 ppm (c), 16 ppm (d), 32 ppm (e), 64 ppm (f) ve 128 ppm (g) bor konsantrasyonlarına maruz bırakılan <i>Lemna gibba</i> bitkilerinin genel durumları.....	22
3.6. <i>Lemna minor</i> bitkisinin toksisite deneyi süresince RGR sonuçları .....	24
3.7. <i>Lemna gibba</i> bitkisinin toksisite deneyi süresince RGR sonuçları.....	25
3.8. <i>Lemna minor</i> 'ün klorofil a, klorofil b ve klorofil a+b analiz sonuçları .....	26
3.9. <i>Lemna gibba</i> 'nın klorofil a, klorofil b ve klorofil a+b analiz sonuçları .....	27
3.10. Araştırma sonunda çalışılan konsantrasyon setlerinden toplanan <i>L. minor</i> ve <i>L. gibba</i> türlerinin biyomas ağırlıkları.....	28
3.11. <i>Lemna minor</i> bitkisinin bulunduğu deney setlerinden elde edilen su örneklerinin günlere göre değişimleri. [Hata çubukları, standart sapma (n=3)'yı temsil etmektedir].....	30



3.12. <i>Lemna gibba</i> bitkisinin bulunduğu deney setlerinden elde edilen su örneklerinin günlere göre değişimleri. [Hata çubukları, standart sapma (n=3)'yı temsil etmektedir].....	31
3.13. <i>L. minor</i> ve <i>L. gibba</i> 'nın 7 günlük deney periyodu sonrasında içerdikleri B miktarları.....	33
3.14. B'a maruz bırakılan <i>L. minor</i> ve <i>L. gibba</i> bitkilerinin APX, GPX, CAT, SOD ve GR antioksidan enzimlerinin aktiviteleri. [Hata çubukları, standart sapma (n=3)'yı temsil etmektedir].....	36

## ÇİZELGELER DİZİNİ

2.1. Araştırma alanının biyoiklim katı .....	8
2.2. SIS solüsyonu.....	11
2.3. Potasyum fosfat tamponu .....	14
3.1. <i>L. minor</i> ve <i>L. gibba</i> bitkilerinde toksisite deneyi boyunca gözlemlenen klorozis, nekrosis ve ayrılan yaprak sayıları.....	23
3.2. Biyoremediasyon deneyi süresince deney setlerinden alınan su numunelerinin pH ve elektriksel iletkenlik değerleri.....	34

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

%	:	Yüzde
µg	:	Mikrogram
µm	:	Mikrometre
µM	:	Mikromolar
µs/ cm	:	İletkenlik ölçü birimi
APX	:	Askobat Peroksidaz
C	:	Konsantrasyon (derişim)
CAT	:	Katalaz
Chl a, b, a+b	:	Klorofil a, b, a+b
cm	:	Santimetre
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
E	:	Enzim substratı için belirlenmiş katsayı
g	:	Santrifüj birimi (yer çekimi)
GPX	:	Guaiakol Peroksidaz
GR	:	Glutasyon Redüktaz
gr	:	Gram
ICP	:	Inductively Coupled Plasma
kg	:	Kilogram
L	:	Litre
m	:	Metre
M	:	Molar
mg	:	Miligram
ml	:	Mililitre
mm	:	Milimetre
mM	:	Milimolar
nm	:	Nanometre
°C	:	Santigrat derece
OECD	:	Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü
ppm	:	Milyonda bir kısım
RGR	:	Relative Growth Rate (Nisbi büyüme oranı)

ROS	:	Reaktif oksijen türleri
SOD	:	Süperoksit Dismutaz
SPSS	:	İstatistik Programı
UV	:	Ultra Viyole
UV	:	Ultra viyole
W	:	Watt
Ramp	:	Basınç değeri

### **KULLANILAN KİMYASALLAR**

B	:	Bor
BO <sub>3</sub>	:	Borat
BSA	:	Bovine Serum Albumin
CaCl <sub>2</sub> .7H <sub>2</sub> O	:	Kalsiyum klorid hepdahidrat
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	:	Bakır sülfat pentahidrat
FeCl <sub>3</sub> . 6H <sub>2</sub> O	:	Demir (III) klorür hegzahidrat
GSH	:	Glutasyon
GSSG	:	Okside glutasyon
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	:	Hidrojen peroksit
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	:	Borik asit
HCl	:	Hidroklorik asit
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	:	Potasyum fosfatdibazik
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	:	Potasyum fosfatmonobazik

$\text{KNO}_3$	:	Potasyum nitrat
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	:	Magnezyum sülfat hepdahidrat
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	:	Mangan (II) klorid tetrahidrat
$\text{Na}(\text{NO}_3)$	:	Sodyum nitrat
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	:	Sodyum karbonat
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	:	Sodyum mobildat dihidrat
$\text{Na}_3\text{B}_7\text{O}_7$	:	Boraks
$\text{NaClO}$	:	Sodyum Hipoklorit
$\text{NADPH}$	:	Nikotinamid adenin dinükleotit
$\text{Na-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	:	Sodyum-Etilendiamin tetraasetik asit dihidrat
$\text{NBT}$	:	Nitroblue tetrazolium
$\text{PVP}$	:	Polivinil prolidon
$\text{SIS}$	:	Modifiye İsveç Solüsyonu
$\text{Tris-HCl}$	:	Tris-Hidroklorik asit
$\text{Zn}$	:	Çinko
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	:	Çinko sülfat hepdahidrat

## 1. GİRİŞ

Sanayi devrimiyle birlikte, dünya genelinde hayat standartlarının batı ülkelerinden başlayarak yükselmesi beraberinde kentlerde yoğun bir nüfus artışı ve kaynak talebini meydana getirmiş, bunun sonucunda ekolojik bileşenler içerisinde kirlilik etmenleri oluşmaya başlamıştır (Wei ve Yang 2010; Capello ve ark. 2013; Wakelin ve ark. 2014; Li ve ark. 2014; Katırcıoğlu 2014). Fabrikasyon faaliyetleri sonucunda oluşan atık özellikli yan ürünler, bırakıldıkları ekosistemlerde bir takım dengesizlikler meydana getirerek doğal habitatların ekolojik dengesinin bozulmasına, aynı zamanda bu dengeyi oluşturan biyotik ve abiyotik unsurlarda olumsuzluklara yol açmıştır (Mkandawire ve Dudel 2005; Yılmaz ve Parlak 2011; Pan ve Zhou 2013; Pinedo ve ark. 2013; Rodriguez ve ark. 2014; Al-Ghanim ve ark. 2015; Dai ve ark. 2015; Maier ve ark. 2015). Özellikle 20. yüzyıldan itibaren ekosistemlerdeki konsantrasyonları gün geçtikçe artan organik ve inorganik bileşikler hem ekosistemin kendi sağlığını hem de bu sistemden beslenen ekolojik bileşenleri tehdit eder duruma gelmiş ve çevresel kirliliğin oluşturduğu olumsuz kümülatif etkiler tartışılmaya başlanmıştır (Latu ve ark. 2014; Skevas ve ark. 2014; De Dominicis ve ark. 2015; Vallner ve ark. 2015; Voelker ve ark. 2015). Bu nedenle, dünya genelinde çevre kirliliği sürecinin yönetilmesi amacıyla çevre ve doğal kaynakların kirlenmeye karşı korunması fikri ortaya konulmuş aynı zamanda kirlenmiş alanların temizlenmesi ve mevcut kirlilik zincirinin önlenmesi büyük öneme sahip politik konular arasına girmiştir (Bergek ve Berggren 2014; Bilotta ve ark. 2014; Criscuolo ve Menon 2015).

Potansiyel kirlilik etmenlerinden biri olarak görülen madencilik faaliyetleri sonucunda oluşan atıkların çevresel etkileri küresel toplumda endişe uyandırmakta ve sucul ekosistemlerin bu atıklardan olumsuz etkileneceği üzerine günümüzde yaygın bir kanı bulunmaktadır (Lesley ve ark. 2008; Antunes ve ark. 2011; Frouz ve ark. 2011; Kapusta ve ark. 2011; Cerqueira ve ark. 2012; Ribeiro ve ark. 2013). Çünkü madencilik faaliyetleri ile uzun vadede çevrede tehlikeli unsurların kalıcılığı artarak çevresel bozulmalara sebep olmakta ve bunun yanı sıra, su ve toprağın kirlenmesine yol açarak biyolojik çeşitliliğin azalmasına neden olabilmektedir (Bhattacharya ve ark. 2006; Luptakova ve ark. 2012; Coller-Myburgh ve ark. 2014; Garcia-Gomez ve ark. 2014). Bu nedenle, maden ekolojik

sistemlerinde su, toprak ya da sediment, hava ve biyolojik çeşitlilik gibi abiyotik ve biyotik kaynakların maden faaliyetleri sonucu nasıl etkilenebileceğine dayalı daha etkin maden yönetim stratejileri belirlenmesi gerekmektedir (Rasilainen ve ark. 2010).

Doğa ve insanoğlu arasındaki ilişkilerin sürdürülebilirliğinin artırılması odaklı faydalanılan sucul ekosistemlerde, çevresel olguların izlenmesi ve su kalitesinin iyileştirilmesi gibi konular kritik önem taşımaktadır (Costanza ve ark. 1997; Tang ve ark. 2009; Barot ve ark. 2011; Radic ve ark. 2011). Bu ekosistem hizmetleri arasında, su mercimeği odaklı olanlar dünya çapında kirleticilerin fitotoksitesini ölçmek için ekolojik ve erken uyarı göstergeleri olarak kullanılmaktadır (Demirezen ve ark. 2007; Appenroth ve ark. 2010; Henke ve ark. 2011). *Lemna gibba* L., *Lemna minor* L. ve *Spirodela polyrriza* L. (Lemnaceae) gibi bazı su mercimeği türleri; çok hızlı üreme oranları, kolay yayılma ve sudan ağır metaller ve metaloidler gibi belirli kirleticileri temizleme potansiyelleri nedeniyle sucul ekosistemlerde çok önemli bir yere sahiptirler (Davis ve ark. 2002; Megateli ve ark. 2009; Şaşmaz ve Öbek 2009; Stout ve ark. 2010; Dirilgen 2011).

Fitoremediasyon teknikleri yerli, ticari, madencilik ve endüstriyel atık su kirleticileri uzaklaştırmak için kullanılan ucuz, çevre dostu ve alternatif bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır (Doran 2009; Sarma 2011; Tatar ve Öbek 2014). Fitoremediasyon, çevreden kirleticilerin birikimi ve kaldırılması için bitkilerin kullanılmasındır (Doran 2009; Sarma 2011; Ramila ve ark. 2015). Bu yöntem, kirletilmiş toprak, su ve sedimentteki kirliliğin indirgenmesi ya da bitkiler aracılığı ile kirliliğin azaltılması, transferi ve stabilitesini kapsamaktadır. Sucul, yüksek ve batık bitkiler olmak üzere üç farklı bitki grubu, fitoremediasyon arıtma sistemi tesislerinde kullanılmaktadır (Misbahuddin ve Farduddin 2002; Mohan ve ark. 2006; Dana 2014; Alade ve Ojoawo 2009; Aremu ve ark. 2012; Ojoawo ve ark. 2015). Bu tür sistemlerde kirleticiyi tutma süresi, atık uzaklaştırma mekanizması dikkate alınarak ayarlanmalı ve hasat bitkiyi canlı ve taze tutmak için periyodik olarak yapılmaktadır (Zimmo 2003; Tatar ve Öbek 2014). Sucul ekosistemlerin fitoremediasyon sürecinin oranı ve etkinliği; bitkilerin doğal biyoakümüülasyon yetenekleri ve belirli bir toksinin kimyasal türleşmesi, pH,

organik şelatlar, metaller ve ametaller, diğer organik maddeler, tuzluluk, iyonik kuvvet, sıcaklık, ışık yoğunluğu ve oksijen seviyeleri gibi çeşitli çevresel faktörlere bağlıdır (Prasad 2007; Holtra ve ark. 2010). Son zamanlarda, bazı su makrofitlerin ve köklerinin biyokütleleri ile yapılan çalışmalarda, atık sulardaki organik ve inorganik kirleticileri bünyelerinde biriktirdikleri ve atık su kalitesinin iyileştirilmesinde kullanılabilir oldukları bildirilmiştir (Reddy ve De Busk 1987; Vajpayee ve ark. 1995; Sinha ve ark. 1996; Matagi ve ark. 1998; Rahmani ve Sternberg 1999; Körner ve Vermaat 1998; Zayed ve ark. 1998; Körner ve ark. 1998; Hasar ve Öbek 2001; Wang ve ark. 2002; Misbahuddin ve Farduddin 2002; Rai ve ark. 2002; Axtell ve ark. 2003; Kamal ve ark. 2004; Miretzky ve ark. 2004; Brix ve Arias 2005; Oporto ve ark. 2006; Mohan ve ark. 2006; Upadhyay ve ark. 2007; Şaşmaz ve Öbek 2009; Khan ve ark. 2009; Alade ve Ojoawo 2009; Öbek 2009; Dordio ve ark. 2010; Aremu ve ark. 2012; Dana 2014; Ojoawo ve ark. 2015). Bununla birlikte bazı su mercimeği türlerinin de iyi Bor (B) akümülatörlerinden olduğu bilinmektedir (Glandon and McNabb 1978; Frick 1985).

B bir metaloid olup genellikle deniz suyunda  $4,5 \text{ mg l}^{-1}$  tatlı sularda  $0,1 \text{ mg l}^{-1}$  ve toprakta  $2-200 \text{ mg kg}^{-1}$  gibi miktarlarda düşük konsantrasyonlarda bulunur, ancak madencilik gibi antropojenik faaliyetler doğada B konsantrasyonları yükseltebilir (Nable ve ark. 1997; Wyness ve ark. 2003; Türe ve Bell 2004; Camacho-Cristobal ve ark. 2008; Böcük 2010; Dilla ve ark. 2015 ). Türkiye 803 milyon ton ile Dünyadaki toplam B rezervlerinin yaklaşık %70'ine sahiptir ve B madenciliği konusunda önde gelen ülkelerden biridir (Türker ve ark. 2011; Böcük ve ark. 2013). Türkiye'nin bilinen B rezervleri kuzeybatı Anadolu'da bulunur ve ana rezervleri Kırka (Eskişehir), Kestelek (Bursa), Emet (Kütahya), Sultançayırı ve Bigadiç (Balıkesir)'te yer almaktadır (Kistler ve Helvacı 1994; Böcük 2010, Türker ve ark. 2013). Doğada B; boraks, boroksit, borat, borik asit, kolemanit, kernit gibi çok sayıda bileşikler halinde bulunur. Boraks ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ), maden sisteminde B madeninin baskın formu olup suda çözündüğünde Borik asit ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) ve Borat ( $\text{BO}_3$ ) iyonları formundadır ve boraksın çözünmüş formları çevreye kolayca nüfus edebilir (Kistler ve Helvacı 1994; Göncü 1998; Tanaka ve Fujiwara 2008).



Ekosistem bileşenleri içerisinde potansiyel risk oluşturan B'un sulardan arındırılması için konvansiyel arıtma teknolojilerinin kullanıldığı birçok arıtma metodu bulunmaktadır. Ters osmoz, iyon değişimi, çökelti-koagülasyon, membran filtrasyon ve adsorpsiyon gibi çeşitli teknikler sulardan B'un arındırılması için kullanılan en yaygın tekniklerdir (Simonnot ve ark. 2000; Ferreira ve ark. 2006; Dionisiou ve ark. 2006; Öztürk ve Köse 2008; Önderkova ve ark. 2009; Dominguez-Tagle ve ark. 2011). Bu gibi teknolojiler deşarj atık su standartlarını karşılamasına rağmen, genellikle pahalı ve ikincil atık üretilmelerine ilaveten yüksek bakım ve onarım maliyetlerini ve kimyasalların kullanımını gerektirmektedir (Marin ve Oron 2007; Allende ve ark. 2011, Tatar ve Öbek 2014). Öte yandan, bazı güncel çalışmalar sucul ortamdan kirleticilerin uzaklaştırılması için bu kimyasal teknolojilerin genellikle etkili olmadığını göstermiştir (Allende ve ark. 2012). Bunun bir sonucu olarak, hem B'un atık sulardan uzaklaştırılması hem de ekolojik bileşenlerde B'un olumsuz etkilerinin izlenmesi için uygun maliyetli, sürdürülebilir ve çevre dostu alternatif stratejiler ihtiyaç haline gelmiştir (Şaşmaz ve Öbek 2009; Türker ve ark. 2013; Böcük ve Türe 2014; Ramila ve ark. 2015).

Bu yüzden, bu tez çalışmasının temel amacını: (I) laboratuvar ortamında farklı B konsantrasyonlarına maruz bırakılan *L. minor* ve *L. gibba* bitkilerinin B'a karşı oluşturdukları morfolojik ve enzimatik cevapların belirlenmesi, (II) bu bitkilerden hangisinin, hangi konsantrasyonda atık su içerisinde bulunan B'u, biyolojik olarak daha iyi temizlediği karşılaştırmalı olarak araştırılması ve (III) bu bitkilerin B için biyoremediasyon potansiyelleri belirlenmesi konuları oluşturmaktadır. Başka bir ifadeyle, bu tez çalışması kapsamında birçok konu başlığının tek çatı altında, birbirleriyle ilişkili şekilde çalışılması hedeflenmektedir. Amaçlarımız özetlenecek olursa:

- *L. minor* ve *L. gibba* bitkilerinin laboratuvar ortamında kültürlerini kurmak,
- B'un *L. minor* ve *L. gibba* bitkileri üzerindeki morfolojik ve enzimatik etkilerini saptamak,
- 7 farklı B konsantrasyonuna [2 ppm (kontrol grubu), 4 ppm, 8 ppm, 16 ppm, 32 ppm, 64 ppm, 128 ppm] maruz bırakılacak *L. minor* ve *L. gibba*

bitkilerinin, B'a karşı oluşturdukları morfolojik cevapları, toksisite parametrelerini (nekrotik, klorotik ve ölü bitki) belirlemek; enzimatik cevaplar için ise antioksidan enzimlerin (Katalaz, Süperoksit dismutaz, Glutasyon redüktaz, Askorbat Peroksidaz, Guaikol peroksidaz) aktivitelerini tespit etmek,

- *L. minor* ve *L. gibba* bitkilerinin B için biyoremediasyonda kullanılabilir olup olmadığını araştırmak,
- *L. minor* ve *L. gibba* bitkilerinin 7 farklı B konsantrasyonu için biyoremediasyon kapasitelerini belirlemek,
- B için *L. minor* ve *L. gibba* bitkilerinin biyoremediasyon kapasitelerini karşılaştırmak,
- 7 farklı B konsantrasyonu için *L. minor* ve *L. gibba* bitkilerinin klorofil miktarlarını tayin etmek.

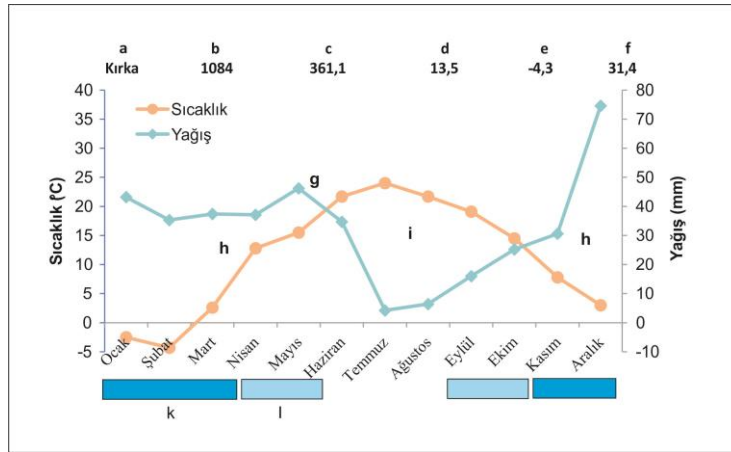
## 2. MATERYAL VE METOT

Bu çalışma; toksisite deneyi ile morfolojik değişimlerinin incelenmesi, enzimatik tepkilerin belirlenmesi ve biyoremediasyon deneyi olmak üzere 3 aşamada gerçekleştirilmiştir.

### 2.1. Araştırma Yeri ve Biyoiklimsel Sentez

#### 2.1.1. Araştırma yeri

Bu çalışma, Mayıs 2014-Mayıs 2015 tarihleri arasında Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Bitki Ekolojisi Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Araştırmanın yapıldığı Eskişehir iline ait iklimsel veriler, T.C. Meteoroloji Genel Müdürlüğü (Ankara)'nden temin edilerek iklim diyagramı hazırlanmıştır (Şekil 2.1). Eskişehir'in 22 yıllık rasat verilerine göre yıllık ortalama sıcaklığı 13,5 °C'dir. Ortalama sıcaklığın en yüksek olduğu dönem 24 °C ile Temmuz ayıdır. Ortalama sıcaklığın en düşük olduğu dönem -4,3 °C ile Şubat ayına aittir. Ortalama yüksek sıcaklık en yüksek değerine 28,6 °C ile Temmuz ayında, en düşük değerine ise 3 °C ile Şubat ayında ulaşmaktadır. Yıllık ortalama yüksek sıcaklık 11,2 °C'dir. Eskişehir ilinin yıllık ortalama toplam yağış miktarı 361,1 mm olup, en fazla aylık ortalama yağış miktarı 74,6 mm ile Aralık ayında, en düşük ise 4,2 mm ile Temmuz ayında gerçekleşmiştir.



**a:** İstasyonun adı, **b:** İstasyonun denizden yüksekliği (m), **c:** Yıllık toplam yağış miktarı (mm), **d:** Yıllık ortalama sıcaklık (°C), **e:** En soğuk ayın minimum sıcaklık ortalaması (°C), **f:** En sıcak ayın maksimum sıcaklık ortalaması (°C), **h:** Yağışlı Periyot, **g:** Aylık ortalama sıcaklık eğrisi, **i:** Kurak periyot, **k:** Ortalama minimum sıcaklığın 0°C'nin altında olan aylar, **l:** Mutlak minimum sıcaklığın 0°C'nin altında olan aylar.

Şekil 2.1. Çalışma Alanına (Eskişehir) ait iklim diyagramı

### 2.2.2. Biyoiklimsel sentez

Emberger (1952), Akdeniz iklim katlarının ve genel kuraklık derecesinin tayini için şu denklemini (2.1) önermiştir.

$$Q = \frac{2000 \cdot P}{(M+m+546,4)(M-m)} \quad (2.1)$$

(**Q**: Yağış-Sıcaklık emsali, **P**: Yıllık yağış miktarı, **M**: En sıcak ayın maksimum sıcaklık ortalaması ( $^{\circ}\text{C}$ ), **m**: En soğuk ayın minimum sıcaklık ortalaması ( $^{\circ}\text{C}$ )).

İklimsel verilere dayanarak yapılan hesaplamalar sonucunda ortaya çıkan Q değeri;

$Q < 20$ ;  $P < 300$  mm ise; Çok Kurak Akdeniz İklimi

$Q = 20-32$ ;  $P = 300-400$  mm ise; Kurak Akdeniz İklimi

$Q = 32-63$ ;  $P = 400-600$  mm ise; Yarı Kurak Akdeniz İklimi

$Q = 63-98$ ;  $P = 600-800$  mm ise; Az Yağışlı Akdeniz İklimi

$Q > 98$ ;  $P > 1000$  mm ise; Yağışlı Akdeniz İklimi'ni ifade

etmektedir. Bu iklim katlarının her biri özel bir vejetasyon tipine karşılıktır.

“m” donlu dönemlerin süresinin ifadesidir ve m değeri küçüldükçe soğuk dönem o kadar uzun olur. “m” değerinin 0'dan büyük veya küçük olmasına göre Akdeniz biyoiklim tipleri;

$m > 0$   $^{\circ}\text{C}$  ise;

$m > 10$   $^{\circ}\text{C}$  ise; Çok Sıcak Akdeniz İklimi

$10$   $^{\circ}\text{C} < m < 7$   $^{\circ}\text{C}$  ise; Sıcak Akdeniz İklimi

$4,5$   $^{\circ}\text{C} < m < 3$   $^{\circ}\text{C}$  ise; Yumuşak Akdeniz İklimi

$3$   $^{\circ}\text{C} < m < 0$   $^{\circ}\text{C}$  ise; Serin Akdeniz İklimi

$m < 0$   $^{\circ}\text{C}$  ise;

$m > -10$   $^{\circ}\text{C}$  ise; Kış Buzlu

$-10$   $^{\circ}\text{C} < m < -7$   $^{\circ}\text{C}$  ise; Kış Son Derece Soğuk

$-7$   $^{\circ}\text{C} < m < -3$   $^{\circ}\text{C}$  ise; Kış Çok Soğuk

$-3$   $^{\circ}\text{C} < m < 0$   $^{\circ}\text{C}$  ise; Kış Soğuk'tur.

Kurak devre ise Emberger'e göre **S**:  $PE / M$  formülü ile belirlenebilmektedir. S değerine göre istasyon  $S < 5$  ise Akdenizli,  $5 < S < 7$  ise

Yarı Akdenizli,  $S > 7$  ise Akdenizli değildir (**PE**: Yaz yağışı ortalaması, **M**: En sıcak ayın maksimum sıcaklık ortalaması), (Akman 1990).

Araştırma bölgesinin Emberger (1952) yöntemine göre hesaplanmış biyoiklim katı Çizelge 2.1’de verilmektedir.

**Çizelge 2.1.** Araştırma alanının biyoiklim katı

İstasyon	Yükseklik	P	PE	M	m	S	Q	Biyoiklim katı
Eskişehir	788	361,1	15,01	31,4	-4,3	0,47	35,27	Yarı Kurak Akdeniz İklimi

Yukarıdaki verilere göre, Eskişehir ( $Q=35,27$ ) ile Yarı Kurak Akdeniz İklimi biyoiklim katında yer almaktadır. En soğuk ayın minimum sıcaklık ortalaması olan  $m$  değeri dikkate alındığında ise, Eskişehir  $-4.3$  °C değeri ile kışı çok soğuk Akdeniz iklimini, karakterize etmektedir (Çizelge 2.1).

## 2.2. Kültür Şartları

### 2.2.1. Ön kültüre alma işlemi

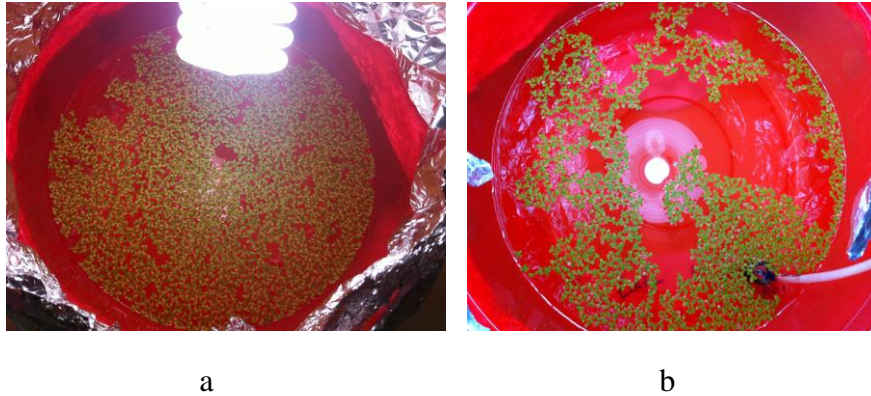
*L. gibba* ve *L. minor*’ ün kültür şartları OECD prosedürüne uygun olarak hazırlanmıştır (Anonim 2002). Su mercimekleri, Porsuk Çayından her birinden yaklaşık 50 gr toplanmış ve Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Ekoloji Laboratuvarında kültüre alınmıştır. Laboratuvara getirilen su mercimekleri öncelikle içerisindeki alg, gastropod ve diğer istenmeyen organizmalar uzaklaştırılmıştır. Alglerin uzaklaştırılması için bitkiler % 0,5’lik sodyum hipoklorit ( $NaClO$ ) çözeltisi ile yıkanmıştır.

Ön kültüre alma işlemi yarı kontrollü olarak gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için SIS solüsyonu Çizelge 2.2’deki gibi hazırlanıp otoklavda steril edilmiştir. Nitrik asitle steril edilmiş olan 5 L’lik plastik kap içerisine SIS solüsyonu koyulmuştur. Belirli üretim koşullarında elde edilmiş su mercimeklerinden 27 adet *L. minor* ve *L. gibba* yaprağı her bir kolonisi 2 ya da 3 yapraklı olmasına dikkat edilerek deney için seçilmiştir. Bir yapraklıların çoğu, çevresel stresin, besin limitinin bir göstergesi olduğundan ve test için kullanımı uygun olmadığından tercih edilmemiştir (Anonymous 2002). Deney süresince bitkilerin dış etkenli herhangi bir organizma ile kontamine olması engellenmiştir. 5 W aydınlatma gücü olan masa lambaları kültür kaplarının aydınlatılması için kullanılmıştır. Işığın etrafa yayılmaması için kap ve masa lambasının etrafı

alüminyum folyo ile kapatılmıştır. Bu deney düzeneği, iklim kabinindeki deney düzeneği ile birlikte eş zamanlı olarak laboratuvar ortamında gerçekleştirilmiştir.

Kültür ortamı solüsyonu OECD (2002) standartlarına uygun hazırlanmıştır. Kültür için 5 kg'lık steril plastik kaplar kullanılmıştır. *L. gibba* ve *L. minor* bitkileri 8 haftalık bir periyot ile kültür solüsyonuna alışması sağlanmıştır. Bu periyot boyunca bitkilerin kök gelişimi ile yaprak sayılarının değerlendirilmesi yapılmış ve deney aşamasında sağlanacak koşullarda bitki örneklerinin ne kadar zamanda çoğalabileceği tespit edilmiştir. Deney düzeneği ışık kaynağı ve doğal ısı değişimi altında hazırlanmış ve sıcaklık değeri 15-30 °C arasında değişiklik göstermiştir.

Bu işlemler her iki Lemnaceae türü içinde aynı şekilde kullanılmıştır (Şekil 2.2). Kültüre alma işlemlerinde yosunlanmayı önlemek amacıyla 4 günde bir bitkiler % 0,5'lik sodyum hipoklorit (NaClO) çözeltisi ile yıkanmış ve taze hazırlanmış SIS solüsyonuna alınmıştır.



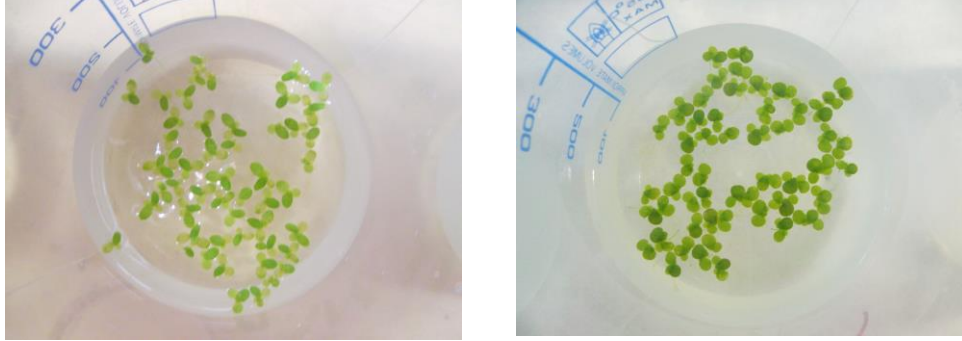
Şekil 2.2. Ön kültüre alma periyodu ve bitkilerin yetiştirilmesi

### 2.2.2. Kültüre alma işlemi

Deney periyodu öncesinde su mercimekleri 7 gün boyunca deney şartlarına alıştırmak için kültüre alınmıştır. Bu işlem, aseptik şartlarda gerçekleştirilmiş olup su mercimekleri deney solüsyonu içeren steril 250 ml' lik plastik kaplara alınmıştır.

Her bir beher için daha önceden kültür ortamına alıştırılan bitkilerden en az 2 yada 3 yapraklı, sağlıklı ve yeşil su mercimeği kolonilerinden 27 yaprak olacak şekilde aseptik şartlarda eklenmiştir. Beherlerin üzeri kontaminasyonu engellemek

amacıyla steril cam petrilerle kapatılmıştır. Kültür setleri  $22 \pm 2$  °C, full ışık (6000- 10000 lüx) ayarlı iklim kabininde 7 gün takip edilmiştir.



a

b

Şekil 2.3. Kültür periyoduna alınan *Lemna minor* (a) ve *Lemna gibba* (b) türleri

### 2.3. Kültür Solüsyonu ve Kullanılan Malzemeler

Test ortamında diğer tepkimeye girmeyen plastik ya da cam ekipmanlar kullanılmıştır. Ekipmanlar deney sonunda yapraklar birbirine çıkmayacak genişlikte ve derinliği bitkilerin gelişimini engellemeyecek şekilde seçilmiştir. Aynı zamanda çözelti hacmi ile kap hacmi oranının 2:5 olması tavsiye edilmektedir (Anonymous 1996). Bu nedenle deneyde; her birinin içinde 100 ml test çözeltisi olacak şekilde 250 ml'lik plastik beherler kullanılmıştır. Test kaplarının üstü ise, evaporasyonu (buharlaşıma) ve kazara kontaminasyonları önlemek için kapatılmıştır (Anonymous 2002). Cam petri kapları güneş ışığını geçirebildikleri için kapak olarak kullanılmıştır. Hacim ölçümü ve bitkilerin taşınımı için kullanılan malzemeler önce NaClO ile iyice temizlenmiştir. Sonra en az üç kez saf su ile durulandıktan sonra otoklavda steril edilmiştir. Test ortamında su mercimeklerinin koyulduğu plastik kaplar % 65'lik nitrik asitte 1 gece bekletilip saf su ile durulandıktan sonra kullanılmıştır. Analitik saflıktaki reaktiflerin bilinen miktarları, saf suda çözülmüştür. Hazırlanan seyreltme suyunun pH'sının  $6.0 \pm 0.2$  olmasına dikkat edilmiştir (Anonymous 2002). Kültür solüsyonu olarak SIS Çözeltisi kullanılmıştır. SIS solüsyonu pH 6.0 'da hazırlanmıştır (Çizelge 2.2).

**Çizelge 2.2.** SIS solüsyonu

Stok Solüsyon No	Kimyasal Madde	Stok solüsyon Konsantrasyonu (g l <sup>-1</sup> )	Alınacak Miktar (ml)
I	NaNO <sub>3</sub>	8.50	10
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.34	
II	MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	15	5
III	CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	7.2	5
IV	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	4.00	5
V	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.0	1
	MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	0.20	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.010	
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.050	
	CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0.0050	
	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.010	
VI	FeCl <sub>3</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0.17	5
	Na <sub>2</sub> -EDTA.2H <sub>2</sub> O	0.28	

#### 2.4. Toksikite Deneyi

Toksikite deneyi *L. minor* ve *L. gibba* için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Biyodenedeyde toksik madde olarak borik asit (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) kullanılmıştır. Daha önce Kırka Bor rezerv alanı içerisinde yapılan çalışmalarda rezerv alanı etrafındaki sulak alanlarda B konsantrasyonunun 2 ile 150 mg l<sup>-1</sup> arasında değiştiği tespit edilmiştir (Böcük ve ark. 2013). Bu nedenle çalışılan B konsantrasyonları literatürdeki çalışmalara uygun seçilmiştir.

Toksikite deneyinde 250 ml'lik plastik beherler, cam petri kapları, 1000 ml'lik balon jojeler ve 1000 ml hacimli erlenmayerler kullanılmıştır. Bor konsantrasyonlarının hazırlığında kullanılan cam malzemeler deterjanlı su ile yıkanıp saf su ile 3 kez durulandıktan sonra otoklavda steril edilmiştir. Plastik malzemeler ise konsantre nitrik asitle 1 gece muamele edilip bol saf su ile 3 kez yıkanmıştır.

Test konsantrasyonları olarak 2 (Kontrol grubu), 4, 8, 16, 32, 64 ve 128 ppm B konsantrasyonu kullanılmıştır. Deneyde doğal ortamı simüle etmek için SIS solüsyonuna borik asit eklenerek test konsantrasyonları hazırlanmıştır. 1 L SIS solüsyonuna 5,749 gr H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> eklenerek 1000 ppm Bor konsantrasyonu elde edilmiş ve bu stok olarak kullanılmıştır. 2 ppm B konsantrasyonunu hazırlamak



için 1000 ppm Bor stoğundan 2 ml alınıp üzeri 1 litreye steril edilmiş SIS solüsyonuyla tamamlanmıştır. Diğer konsantrasyonlar da buna benzer şekilde hazırlanmıştır.

Hem *L. minor* hem de *L. gibba* için belirtilen 7 farklı konsantrasyon, her bir konsantrasyon 3 tekrarlı olacak şekilde hazırlanmıştır. B konsantrasyonları hazırlandıktan sonra deney setleri oluşturulmuştur. Öncelikle beherler isimlendirilmiş ve tarih atılmıştır. 2 ppm konsantrasyonundan 3 adet plastik behere aseptik şartlarda 100 ml aktarılmıştır. Sonra 7 gün kültürde kalan *L. minor* popülasyonundan koloniler seçilip 3 behere de eklenmiştir. Beherlerin üzerileri steril petri kaplarıyla kapatılıp kontaminasyonu önlemek amacıyla etrafi parafilmlelenmiştir. Aynı işlem her iki bitki türünün tüm konsantrasyonları için gerçekleştirilmiştir. Test süresi 7 gün olup her gün rapor tutulmuştur.

## **2.5. Deney Rapor Düzeni ve Deneyin Gözlemlenmesi**

Deney raporu; test no, test materyali, test tarihi, test durumu, test süresi, test solüsyonu, test organizması, kullanılan yaprak sayısı, tekrar sayısı, sıcaklık, pH, ışık kaynağı, ışık şiddeti ve deney süresi boyunca her tekrar grubu için toplam yaprak sayısı, klorozise uğramış yaprak sayısı, nekrozise uğramış yaprak sayısı, ayrılan yaprak sayısı, pH, iletkenlik, nisbi toplam büyüme oranı, kök uzunluğu, yaş biyomas ağırlığı, kuru biyomas ağırlığı, doubling zamanı parametrelerini içermektedir.

Gözlemlene aşamasında, öncelikle her gün aynı saatte bitkilerin toplam yaprak sayısı, klorozise uğramış yaprak sayısı, nekrozise uğramış yaprak sayısı ve ayrılan yaprak sayısı büyüteçle sayılıp rapora not edilmiştir. İkinci olarak biyoremediasyon deneyi için 10 ml'lik cam pipetlerle tüm konsantrasyonların tekrar gruplarından 10 ml su örneği alınıp 50 ml'lik plastik falkon tüplerine örnek alınmıştır. Örneklerin pH ve iletkenlik değerleri ölçülüp rapora not edilmiştir. Falkonlara alınan örneklerin ICP okutulması öncesi bozulmaması için 1-2 damla % 50'lik nitrik asit damlatılmıştır. Yaş biyomas ağırlıkları analitik terazi ile tartılmış ve 65 °C'de 1 gece bekletilip kuru biyomas ağırlıkları ölçülmüştür.

Biyoremediasyon deneyi için alınan su örneklerinin ve toksisite deneyi için kurutulmuş bitkilerin B analizi ICP (Inductively Coupled Plasma) cihazında

yapılmıştır. Su örnekleri % 50'lik nitrik asitle muamele edilerek analiz için hazırlanmıştır. Toksikite deneyi için kurutulmuş bitkilere 10 ml konsantre nitrik asit eklenerek 150 °C'de, 1200 w güçte, 100 ramp başıncıta 10 dakika mikrodalga fırınında çözümleri sağlanmıştır. Çözünen bitkiler plastik balon jodelere alınarak 25 ml ultrasaf su ile tamamlanıp ICP cihazında okutulmuştur.

## 2.6. Klorofil Analizi

Farklı Bor konsantrasyonlarına maruz bırakılan *L. minor* ve *L. gibba* bitkilerinin klorofil analizleri yapılmıştır. Analiz için 0,25 gr fazla suyu alınmış yaş ve sağlıklı bitki örneği sıvı azotla toz haline getirilmiştir. 5 ml % 80'lik aseton çözeltisiyle muamele edilmiştir. 2 ml hacimli santrifüj tüpüne konulan ekstrakt 1500 g' de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Ekstraktın süpernatant kısmı klorofil analizi için kullanılmıştır (Yang ve ark. 1998). Klorofil a için 663.6 nm ve klorofil b için 646.6 nm dalga boylarında UV spektrofotometrede süpernatant kısım okutulmuştur. Klorofil a, klorofil b ve klorofil a+b miktarları Porra ve ark. (1989) ve Holm (1954) tarafından hazırlanan formülle (2.2) hesaplanmıştır:

$$\text{Chl a} = 12.25A_{663.6} - 2.55A_{646.6} (\mu\text{g/ml})$$

$$\text{Chl b} = 20.31A_{646.6} - 4.91A_{663.6} (\mu\text{g/ml})$$

$$\text{Chl a+b} = 17.76A_{646.6} + 7.34A_{663.6} (\mu\text{g/ml}) \quad (2.2)$$

## 2.7. Enzim Deneyleri

*L. minor* ve *L. gibba* bitkilerinin Askorbat peroksidaz (APX), Katalaz (CAT), Guaiakol peroksidaz (GPX), Sürepoksit dismutaz (SOD) ve Glutasyon redüktaz (GR) enzim aktiviteleri ölçülmüştür.

### 2.7.1. *L. minor* ve *L. gibba* bitkilerinin enzim deneylerine hazırlanma aşaması

Yedi günlük deney süresi sonunda deney konsantrasyonlarından fazla suyu alınan 0,5 gr örnek tartılmıştır. Örnekler enzim aktivitesinin belirlenmesi süresince enzimlerinin bozulmaması için tartıldıktan hemen sonra sıvı azota batırılıp - 80 °C'de muhafaza edilmiştir. Deney uygulanırken örnekler buz içerisinde muhafaza edilmiştir.

### 2.7.2. Askorbat peroksidaz enzim aktivitesinin belirlenmesi (APX)

Askorbat peroksidaz enzim aktivitesinin belirlenmesinde potasyum fosfat tamponu ve ekstraksiyon tamponu olmak üzere iki tampon kullanılmıştır.

#### 2.7.2.1. Potasyum fosfat tamponu

Potasyum fosfat tamponu 50 mM ve pH 7.0 olarak hazırlanmıştır. Tampon için 0.1 M  $KH_2PO_4$  ve 0.1 M  $K_2HPO_4$  kullanılmıştır. 100 ml potasyum fosfat tamponu içerisinde 1 mM EDTA olacak şekilde hazırlanır (Razingen ve ark. 2006) (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Potasyum fosfat tamponu

<i>pH</i>	<i>0.1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	<i>0.1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>
7.0	39 ml	61 ml
7.8	8.5 ml	91.5 ml

Bu tampon katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon redüktaz ve guaiakol peroksidaz enzimlerinin aktivitelerinin belirlenmesinde de kullanılmıştır.

Ekstraksiyon tamponu için 1mM EDTA içeren 50 mM potasyum fosfat tamponundan 5 ml alınmıştır. Üzerine 5 mM askorbik asit ve %1'lik PVP ilave edilmiştir (Babic ve ark. 2009). Havan içerisinde 0.5 gr dondurulmuş taze bitki örneği sıvı azotla toz haline getirildikten sonra 5ml ekstraksiyon tamponu ilave edilerek homojenize edilmiştir. 20000 g'de 20 dakika +4 °C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı enzim aktivitesi için kullanılmış olup – 20 °C'de maksimum 1 hafta saklanmıştır.

#### 2.7.3. APX enzim aktivitesi

1 ml reaksiyon karışımında 50 mM potasyum fosfat tamponu, 250 µM askorbik asit, 5 mM  $H_2O_2$  ve enzim ekstresi olacak şekilde hazırlanmıştır. Reaksiyon 290 nm'de 3 dakikada boyunca absorbansta azalış prensibine uygun olarak takip edilmiştir (Nakano and Asada 1981). Spektrofotometre enzim içermeyen kör ile sıfırlanmıştır. Enzim ekstresi içeren karışım konarak reaksiyon

takip edilmiştir. Reaksiyon başladığı anda ilk absorbans değeri ve bittiği andaki absorbans değeri not edilmiştir ( $E=2.8 \text{ mM cm}^{-1}$ ).

#### **2.7.4. Katalaz enzim aktivitesi (CAT)**

1 ml reaksiyon karışımı 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0), 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  içerir (Aebi 1984). Enzim ekstraktı, kuru bitki örnekleri sıvı azotla toz haline getirildikten sonra 1 mM EDTA ve %1'lik PVP içeren 5 ml 50 mM potasyum fosfat tamponuyla homojenize edilip 20000 g'de 20 dakika + 4 °C'de santrifüj sonrasında süpernatant kısımdan elde edilmiştir. Enzim ekstraktı içermeyen kör ile spektrofotometre sıfırlandıktan sonra örnek spektrofotometrede okutulmuştur. Reaksiyonun başlaması için kuvarsa en son  $\text{H}_2\text{O}_2$  eklenmiştir. 240 nm dalga boyunda 3 dakika boyunca absorbansta azalış kaydedilmiştir ( $E=39,4 \text{ mM cm}^{-1}$ ).

#### **2.7.5. Guaiakol peroksidaz aktivitesi (GPX)**

GPX aktivitesinin belirlenmesi için sodyum asetat-HCl tamponu ve ekstraksiyon tamponu olmak üzere iki tampon kullanılmıştır.

100 ml 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0) 1 mM EDTA ve %1'lik PVP içerecek şekilde GPX ekstraksiyon tamponu hazırlanmıştır. Yaş bitki örnekleri havanda sıvı azotla toz haline getirilip 5 ml ekstraksiyon tamponuyla homojenize edilmiştir. 20000 g'de 20 dakika + 4 °C'de santrifüj sonrasında süpernatant kısım enzim ekstraktı olarak kullanılmıştır.

25 mM sodyum asetat tamponu 25 mM HCl tamponuyla pH 5.0 olacak şekilde hazırlanmıştır. 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve 10 mM guaiakol stokları sodyum asetat tamponuyla hazırlanır. 1 ml reaksiyon karışımı 25 mM sodyum asetat-HCl tamponu, 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve 10 mM guaiakol içermektedir (Razinger ve ark., 2006).

Enzim ekstraktı bulunmayan kör ile spektrofotometre sıfırlandıktan sonra örnek, en son guaiakol ve  $\text{H}_2\text{O}_2$  'nin eklenmesiyle reaksiyon başlatılmıştır. 470 nm'de 3 dakika absorbansta artış takip edilmiştir ( $E=26.6 \text{ mM cm}^{-1}$ ).

### **2.7.6. Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi (SOD)**

SOD aktivitesinin belirlenmesinde GPX ve CAT enzim aktivitelerinde olduğu gibi aynı işlemlerle enzim ekstraktı hazırlanmıştır. Reaksiyon tamponu olarak 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.8) kullanılmıştır.

3 ml reaksiyon ortamı 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.8), 13 mM metiyonin, 75 µM NBT (Nitroblue tetrazolium), 0,1 mM EDTA ve 2 µM riboflavin içermektedir. Riboflavin dışındaki tüm malzemeler tamponla birlikte hazırlanırken riboflavin ayrıca saf su ile hazırlanmıştır. Reaksiyonun başlaması için karışıma en son riboflavin eklenmiştir. Reaksiyon için numuneler, içerisine 25 watt ışık veren alüminyum folyo ile kaplı kutuya yerleştirilmiş ve 10 dakika bekletilmiştir. 560 nm’de örneklerin absorbansları ölçülmüştür (Beauchamp and Fridovich 1971).

### **2.7.7. Glutasyon redüktaz enzim aktivitesi (GR)**

1 ml reaksiyon ortamı 50 mM Tris-HCl (pH 6.0), 1 mM GSSG, 0.25 mM NADPH, 0.5 mM EDTA içerecek şekilde hazırlanmıştır. Ekstraksiyon tamponu olarak SOD, CAT ve GPX enzim aktivitelerinde kullanılan potasyum fosfat tamponuyla bitki ekstraktı elde edilmiştir. Kör ile sıfırladıktan sonra spektrofotometrede 340 nm’de 3 dakika boyunca absorbansta azalış takip edilmiştir (Sgherri 1994).

## **2.8. Protein Miktarının Belirlenmesi**

Protein miktar tayininde Bradford yöntemi kullanılmıştır (Bradford, 1976). Bu yöntem için gerekli kalibrasyon eğrisinin çizilmesi için standart olarak saf BSA (Bovine Serum Albumin) kullanılmıştır (Koldemir ve Tükel, 2012). 50 ml protein ekstraktı, 450 ml saf su ve 500 ml Bradford Coomassie Brilliant Blue Protein karıştırılmış ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Örneklerin 595 nm dalga boyunda absorbansı ölçülerek BSA standart eğrisinden yararlanılarak protein miktarı belirlenmiştir.

## **2.9. İstatistiksel Analiz**

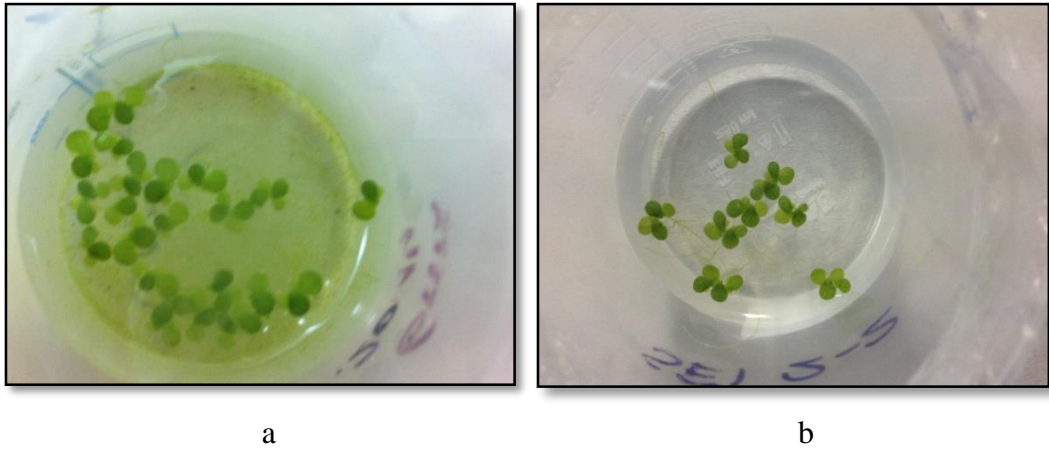
Çalışma sonucunda elde edilen veriler, SPSS 20.0 programı kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. One-way ANOVA testi (Tukey testi) uygulanmıştır.

## **2.10. Kullanılan Cihazlar**

Deneyde kullanılan kimyasal malzemelerin tartımında OHAUS Analytical Plus terazi, kültür ortamı olarak Sanyo Growth Cabinet iklim kabini, pH ölçümlerinde Hach- HQd Field Case pHmetre, sterilizasyon için Nüve Incübatör EN 120 ve Hırayama- Hıclave HV-50 otoklav, çalışma ortamı olarak Clanlaf VFR 1206 steril kabin, enzim deneyleri için Beckman Coulter™ Microfuge 22 R Centrifuge ve Shimadzu UV- 2101 PC UV-VIS spektrofotometre, örneklerin saklanması için Thermo elektron corporation Forma -86 ÜLT Freezer ve Ariston Nofrost buzdolabı, örneklerin bor analizleri için Perkin Elmer Optical Emission Spectrometer Optima 4300 DV cihazları kullanılmıştır.

### 3. BULGULAR

Araştırmaların ilk aşamasını oluşturan ön kùltür periyodu sonunda sağlıklı *Lemna* bitkileri seçilerek ikincil kùltür periyodu aşamasına geçilmiştir. Kùltür periyodu içerisinde bazı haftalarda bitki kùklerinde yosun oluşumuna rastlanmıştır. Bu durumun engellenmesi için dùrt gùnde bir bitkiler yeni kùltür solüsyonuna alınmıştır. Bu sayede kùltürlerde oluşan yosun oluşumunun engellendiği tespit edilmiştir. Yosun oluşumunun önlenmesi ile birlikte tez çalışmamızın ilk basamağı olan toksisite çalışmalarına geçilmiştir (şekil 3.1).



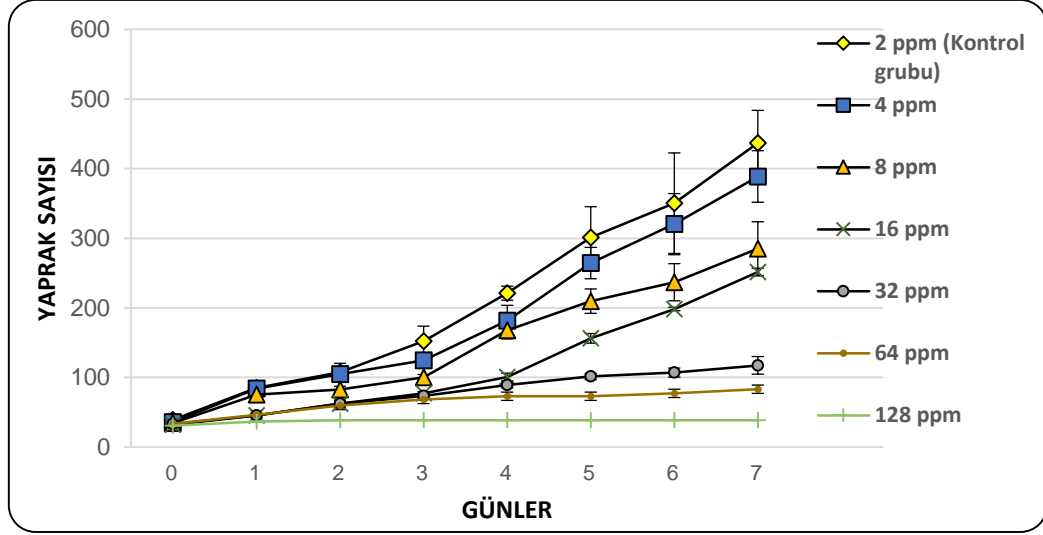
şekil 3.1. Ön kùltür periyodu sonunda *Lemna* türlerinde oluşan yosunlaşma (a) ve ortamdaki yosunlanmanın giderilmesi için yetiştirildiği yeni ortam (b)

#### 3.1. Toksisite Deneyleri

Toksisite deneyleri kapsamında çalışılan B konsantrasyonuna maruz bırakılan *L. minor* ve *L. gibba* bitkilerinin yaprak sayıları (şekil 3.2 ve şekil 3.4), nispi gelişme oranları (şekil 3.6 ve şekil 3.7), klorofil miktarları (şekil 3.8 ve şekil 3.9) ve biyomas miktarları (şekil 3.10) ölç÷lmüştür. Ayrıca bitki türlerinin B'a karşı oluşturdukları morfolojik tepkiler ve semptomlar izlenerek bitkilerde gözlemlenen klorozis, nekrosis ve ayrılan yaprak sayıları toksisite deneyleri süresince kaydedilmiştir (izelge 3.1, şekil 3.3 ve şekil 3.5). Yapılan toksisite deneylerinin geçerli olduğunu kontrol edebilmek için de, OECD test protokolünde önerilen form÷l kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, kontrol grubu olarak belirlenen test konsantrasyonunda kullanılan bitkilerin 48 saat sonunda gelişimini 2 katına çıkardığı süre (doubling time) 2,5'in altında tespit edildiği için yapılan toksisite testlerinin geçerli olduğu tespit edilmiştir.

### 3.1.1. Yaprak sayısı

Araştırma periyodu boyunca çalışılan farklı B konsantrasyonuna maruz bırakılan *L. minor* bitkisine ait toplam yaprak sayıları Şekil 3.2’de gösterilmektedir.

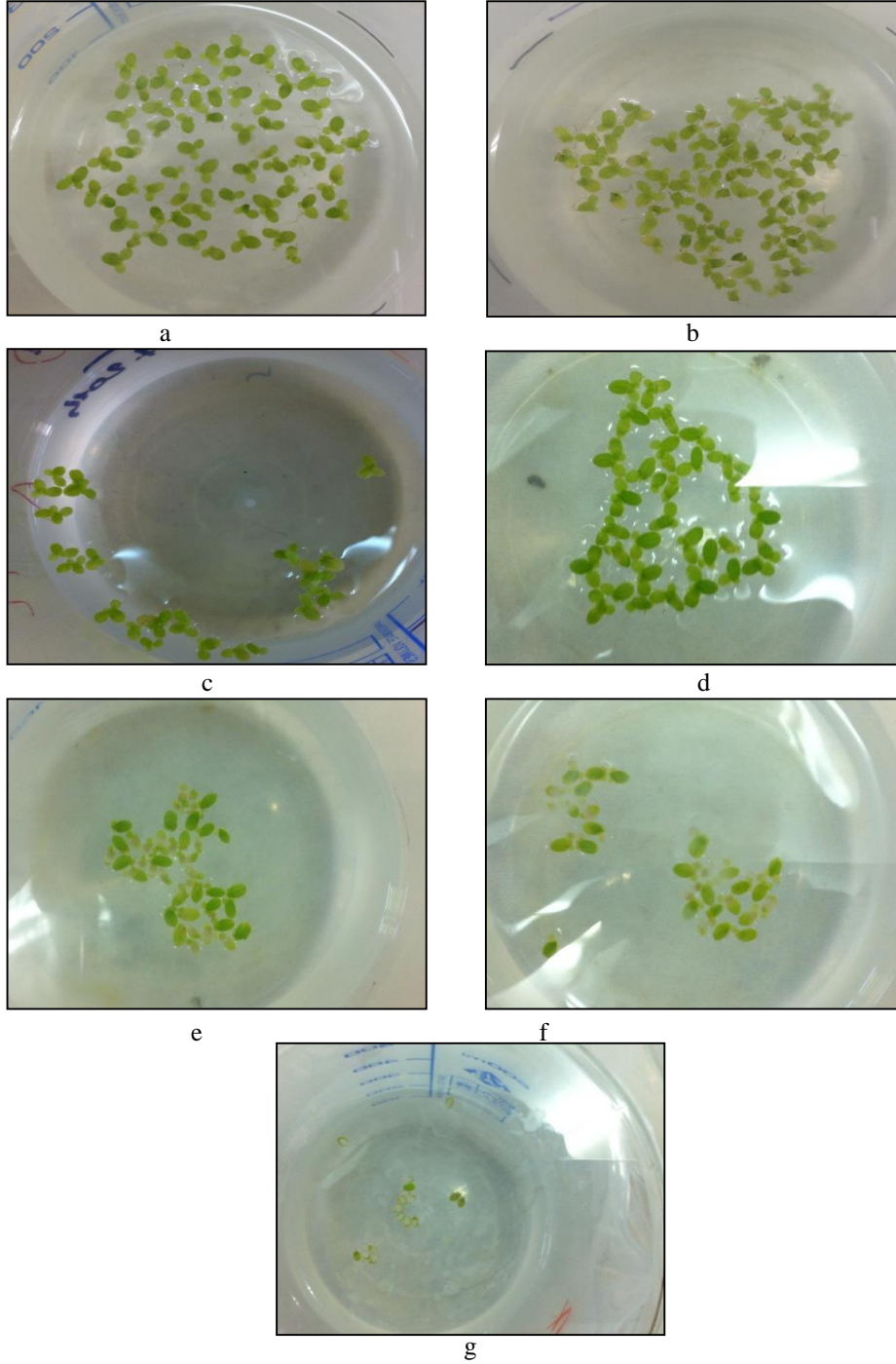


Şekil 3.2. *Lemna minor* bitkisinin 7 günlük toksisite deneyi boyunca yaprak sayısının değişimi

Elde edilen sonuçlara göre, 7 gün boyunca B'a maruz bırakılan bitkilerden 7. gün sonunda en yüksek toplam yaprak sayısı 437 ile 2 ppm (kontrol grubu) B'a maruz bırakılan bitkilerde tespit edilmiştir. En düşük toplam yaprak sayısı ise 128 ppm B konsantrasyonuna maruz bırakılan bitkilerde bulunmuştur. 2 ppm (kontrol grubu) B konsantrasyonuna maruz bırakılan bitkilerde, deney süresince yaprak sayısındaki artış miktarı bir önceki güne nispeten daha yüksek oranda olmuştur. 4, 8 ve 16 ppm B setlerindeki yaprak sayısının artışı kontrol grubuna paralel bir eğri göstermiş olup B miktarı arttıkça yaprak sayısı artış oranında bir azalma olduğu görülmektedir (Şekil 3.3). Bununla birlikte çalışılan konsantrasyon setlerinde 4. günden itibaren 32 ppm B'a maruz bırakılan bitkilerde toplam yaprak sayılarının artışında ani bir azalma tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra 64 ve 128 ppm B konsantrasyonlarına maruz bırakılan bitkilerde 4. günden itibaren yaprak sayılarındaki artış miktarının 32 ppm B setindeki azalıştan daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç, atık su içerisindeki B konsantrasyonunun artması ile toplam yaprak sayılarının da düştüğünü göstermektedir. Yapılan One-Way ANOVA istatistiksel analizlerinde, 2 ppm (kontrol grubu) B'a maruz bırakılan bitkiler ile 16, 32, 64 ve 128 ppm B'a maruz bırakılan bitkilerde arasında istatistiksel bir farklılık

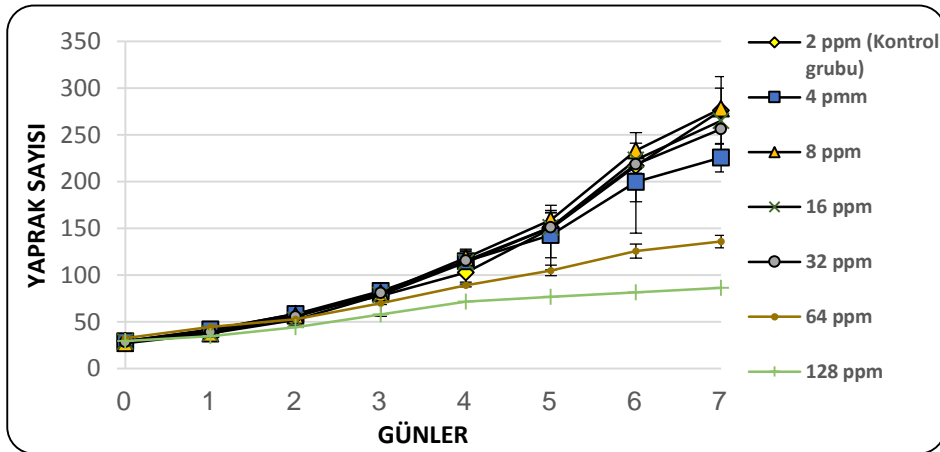


bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Ancak 4 ve 8 ppm B'a maruz bırakılan bitkiler ile kontrol grubu bitkileri yaprak sayıları arasında ise istatistiksel bir farklılık tespit edilememiştir. Bu durum, 4 ppm ve 8 ppm içerisinde bulunan bitkilere, ortamda bulunan B konsantrasyonunun herhangi bir etkisinin olmadığını göstermektedir.



**Şekil 3.3.** Toksikite deney süresi içerisinde 4 gün boyunca 2 ppm-kontrol (a), 4 ppm (b), 8 ppm (c), 16 ppm (d), 32 ppm (e), 64 ppm (f) ve 128 ppm (g) bor konsantrasyonlarına maruz bırakılan *Lemna minor* bitkilerinin genel durumları

*L. gibba* bitkisi için 7 günlük çalışma süresi boyunca toplam yaprak sayısı değişimi Şekil 3.4'te verilmiştir. 7 gün sonunda en yüksek miktarda yaprak sayısı 8 ppm B'a maruz bırakılan bitkilerde gözlenmiş ve toplam yaprak sayısı 278 olarak belirlenmiştir. 128 ppm B'a maruz bırakılan bitkilerde ise toplam 86 yaprak sayısı ile en az miktarda yaprak sayısı tespit edilmiştir. 4 ve 8 ppm B konsantrasyonuna maruz bırakılan bitkilerde 7 gün boyunca yaprak sayısındaki değişimin, kontrol grubuna yakın olduğu görülmüştür. 4. günden itibaren 64 ve 128 ppm B konsantrasyonlarına maruz kalan bitkilerin yaprak sayısında, ortamdaki fazla B nedeniyle ani düşüşler gözlenmiştir (Şekil 3.5). Yapılan One-Way ANOVA istatistiksel analizlerinde *L. minor* türünde de tespit edildiği gibi, 2 ppm (kontrol grubu) B'a maruz bırakılan bitkiler ile 16, 32, 64 ve 128 ppm B'a maruz bırakılan bitkiler arasında istatistiksel bir farklılık belirlenmiştir ( $p < 0.05$ ). Ancak 4 ve 8 ppm B'a maruz bırakılan bitkiler ile kontrol grubu bitkilerinin yaprak sayıları arasında ise istatistiksel bir farklılık tespit edilememiştir ( $p > 0.05$ ). Bu durum, 4 ppm ve 8 ppm içerisinde bulunan bitkilerin ortamda bulunan B konsantrasyonunun herhangi bir etkisinin olmadığını göstermektedir.



Şekil 3.4. *Lemna gibba*'nın 7 günlük toksisite deneyi boyunca yaprak sayısı değişimi

Toksisite deneyleri boyunca yapılan ölçümlerde farklı izlenme günlerinde ve farklı konsantrasyonlarda B'a maruz bırakılan bitkilerden *L. minor* türünün *L. gibba* türüne göre daha yüksek miktarda yaprak ürettiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, her iki bitki türünün de 64 ppm B'a maruz bırakılması ile birlikte, yaprak sayılarının aniden 100 civarına düştüğü tespit edilmiştir.



a



b



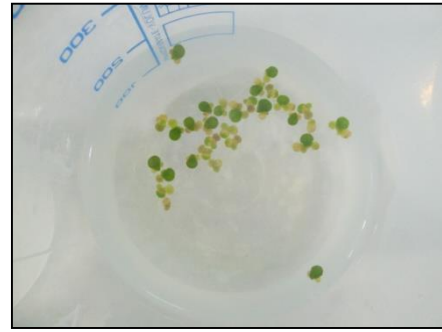
c



d



e



f



g

**Şekil 3.5.** Toksikite deney süresi içerisinde 4 gün boyunca 2 ppm-kontrol (a), 4 ppm (b), 8 ppm (c), 16 ppm (d), 32 ppm (e), 64 ppm (f) ve 128 ppm (g) bor konsantrasyonlarına maruz bırakılan *Lemna gibba* bitkilerinin genel durumları

**Çizelge 3.1. *Lenina minor* ve *Lenina gibba* bitkilerinde toksisite deneyi boyunca gözlemlenen klorozis, nekrosis ve ayrılan yaprak sayıları**

	<i>L. minor</i>										<i>L. gibba</i>						
	2ppm (Kontrol)	4 ppm	8 ppm	16 ppm	32 ppm	64 ppm	128 ppm	2ppm (Kontrol)	4 ppm	8 ppm	16 ppm	32 ppm	64 ppm	12 ppm			
<b>Klorozis</b>	1. Gün	0	0	3,667	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	2. Gün	0	0	3,667	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	3. Gün	0	0,333	2,667	0	0	0	0,333	0	0,333	0	8,6667	7,333	0			
	4. Gün	0,667	1,333	2,667	0	0	21	0,333	0,333	0,333	0	12,667	15	3,333			
	5. Gün	1	2,333	6,667	0,333	0	21	0,667	0,333	0,333	6,667	19,333	39	20,33			
	6. Gün	1,333	2,667	8	0,667	2	21	0,667	0,333	0,333	6,667	33,333	45,33	38			
	7. Gün	4,667	6	12	1	3,667	21	1	0,667	1,333	9,667	51,333	58	43,67			
<b>Nekrosis</b>	1. Gün	1,333	2,667	6,333	1,333	0	4,333	0	0	0	0	0	0	0,333			
	2. Gün	2,667	2,333	2	2,333	4,667	12	0	0	0	0	2,333	0	0,333			
	3. Gün	5,667	11,33	15,67	4,667	12	22,67	0	0	0	2	11,667	8	8			
	4. Gün	11,67	15,67	22	12,67	25,33	34,67	0,333	0	0	3,333	23,333	12	14			
	5. Gün	19,33	19,67	28	21,67	37,67	37,67	0,333	0	0	9,667	43	26,33	26			
	6. Gün	23,33	23	33,67	32	46,67	38	0,333	0	0	14,67	56,333	32,33	36,33			
	7. Gün	27,33	24,33	35,67	36,33	48,33	38,67	0,333	0	1,333	21,33	70	37,33	53			
<b>Ayrılan Yaprak Sayısı</b>	1. Gün	0,667	2,667	3,333	9,333	7,667	26,33	0	0	0	0,667	1,333	6	29			
	2. Gün	0,667	1	1	4,333	6,667	30,33	0	0	0	3	5,333	10	28,33			
	3. Gün	4	6	6,667	2	15	36,67	0	0	0	2	3,333	6	28,67			
	4. Gün	6,667	6	6,333	4,333	26,33	36,67	0	0	0	2,667	3	4,333	25,33			
	5. Gün	7,667	12,67	7,667	6,667	44,67	38,33	0	0	0	1,333	22,333	12,67	32,33			
	6. Gün	16,33	17,67	9,667	3	62,33	38,33	0	0	0	1	34	16,33	34,67			
	7. Gün	24	32,67	26,67	4,333	80,67	38,67	0	0,667	0	3,333	66,333	30,33	46,67			

### 3.1.2. Nispi Gelişme Oranları (Relative Growth Rate)

Toksisite deneyleri boyunca *L. minor* ve *L. gibba* bitkilerinin maruz bırakıldığı B konsantrasyonuna bağlı olarak günlük nispi büyüme oranları OECD (2002) test protokolüne göre (3.1) hesaplanmıştır:

$$\mu_i - j = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t_j - t_i} \quad (3.1)$$

Formülde,

$\mu_i - j$ : i ve j zaman aralığında ortalama nispi büyüme oranı

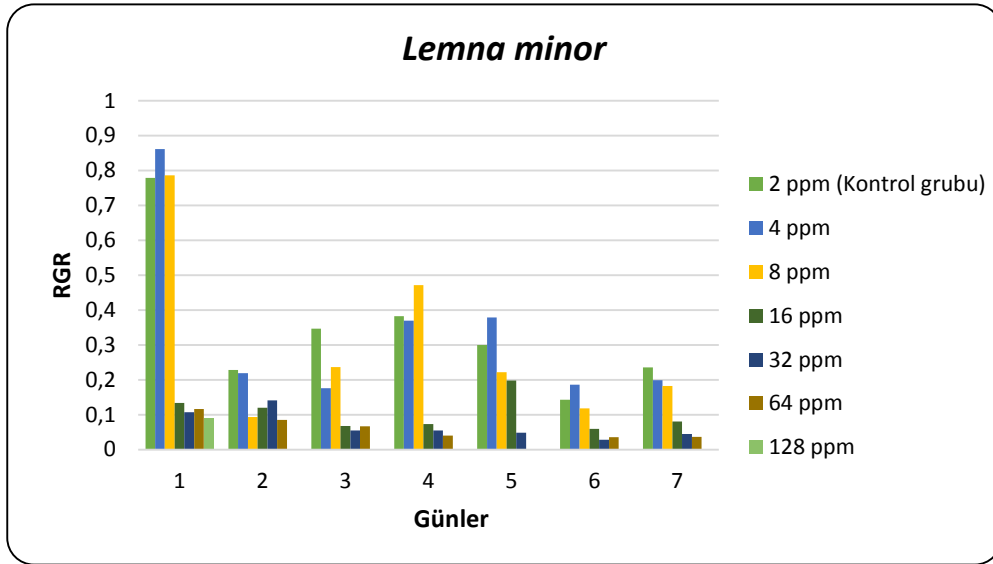
$N_i$  : i zamanında kontrol yada test grubunda gözlenen yaprak sayısı

$N_j$  : j zamanında kontrol yada test grubunda gözlenen yaprak sayısı

$t_i$  : deneyin başlama zamanı (gün)

$t_j$  : deneyin bitiş zamanı (gün)

Araştırma süresince 7 farklı B konsantrasyonuna maruz bırakılan *L. minor* bitkisinin nispi gelişme oranlarına (relative growth rate - RGR) ait sonuçlar Şekil 3.6'da gösterilmektedir. Görüldüğü gibi bitkilerin en yüksek nispi gelişmeyi ilk 3 günlük test periyodunda gösterdiği ve sonrasında nispi gelişmenin hızlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir.

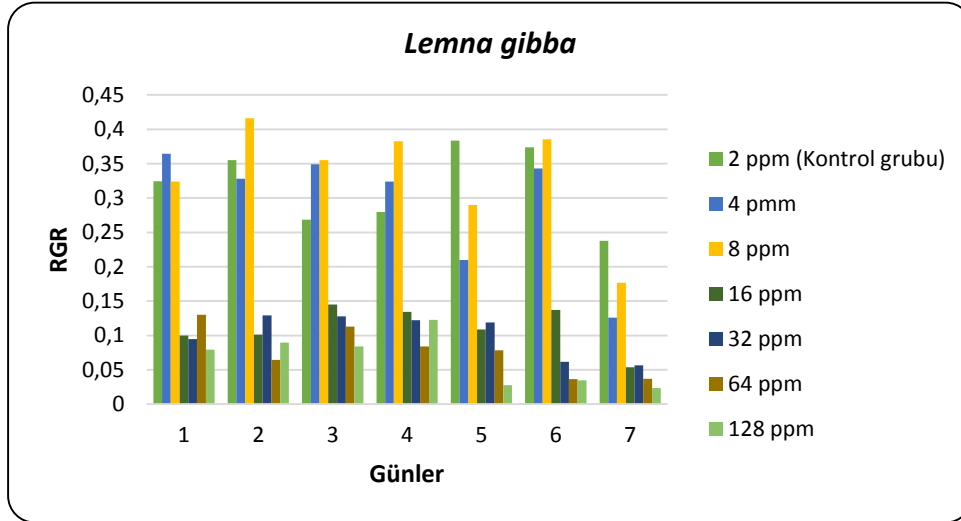


Şekil 3.6. *Lemna minor* bitkisinin toksisite deneyi süresince RGR sonuçları

Bununla birlikte, beklendiği gibi en yüksek nispi gelişme oranı 2 ppm B'a maruz bırakılan bitkilerde tespit edilmişken, en düşük nispi gelişmenin ise 128 ppm B'a maruz bırakılan bitkilerde olduğu belirlenmiştir. Bu kapsamda, deney bitiminde

en büyük büyüme oranının (0,23494) 2 ppm (kontrol grubu) B'a maruz bırakılan bitkilerde olduğu hesaplanmıştır. 4 ve 8 ppm B konsantrasyonuna maruz bırakılan bitkilerin nispi büyüme oranlarının da, kontrol grubunda olduğu gibi ilk gün en yüksek değere ulaştığı belirlenmiştir. Sonraki 2 gün boyunca nispi büyüme oranları azalmış ve 4. gün artış gözlenmiştir. 4. günden sonra bu deney setlerinin nispi büyüme oranlarında azalış gözlenmiştir. Bu değişimler, B'un bitkilerde stres oluşturması kadar B'u bünyelerinde biriktirmeleri ve stres anında gelişimlerini yavaşlatmaları ile açıklanabilir. 128 ppm B konsantrasyonu *L. minor* deney bitkileri için aşırı toksisite oluşturduğundan 2. günden sonra yapraklar gelişme göstermemiş ve bu yüzden RGR oranı 0 olarak sonuçlanmıştır.

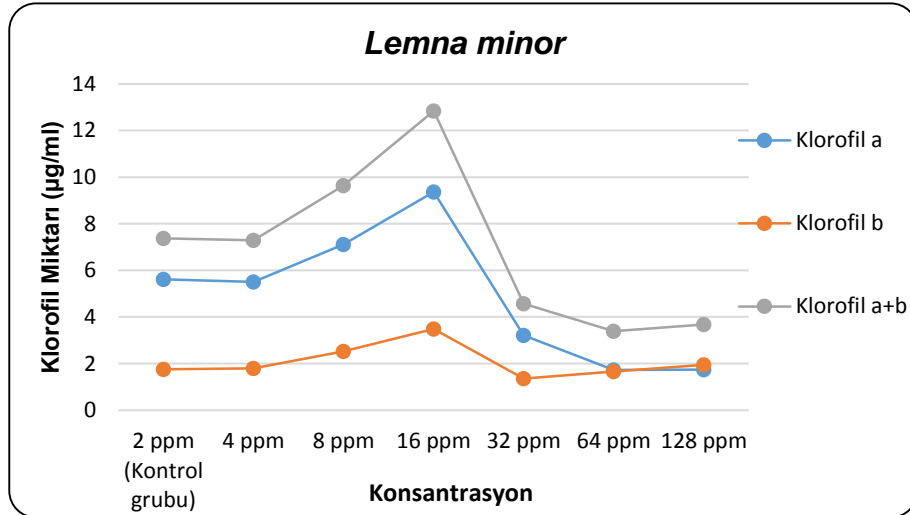
Toksisite deneyi boyunca *L. gibba*'nın nispi gelişme oranlarına (RGR) ait sonuçlar Şekil 3.7'de gösterilmektedir. Buna göre en yüksek büyüme oranı 0,23795 RGR ile 2 ppm (kontrol grubu) B'a maruz bırakılan bitkilerde gözlenirken, en düşük büyüme oranı 0,02359 RGR ile 128 ppm B'a maruz bırakılan bitkilerde gözlenmiştir. Tüm deney setlerinde en az nispi büyüme oranı 7. gün gözlenmiştir. B konsantrasyonu arttıkça RGR oranlarının azaldığı gözlenmiştir. Her test konsantrasyonunda B stresine bağlı olarak deney süresince RGR oranlarında dalgalanmalar tespit edilmiştir.



Şekil 3.6. *Lemna gibba* bitkisinin toksisite deneyi süresince RGR sonuçları

### 3.1.3. Klorofil miktarı

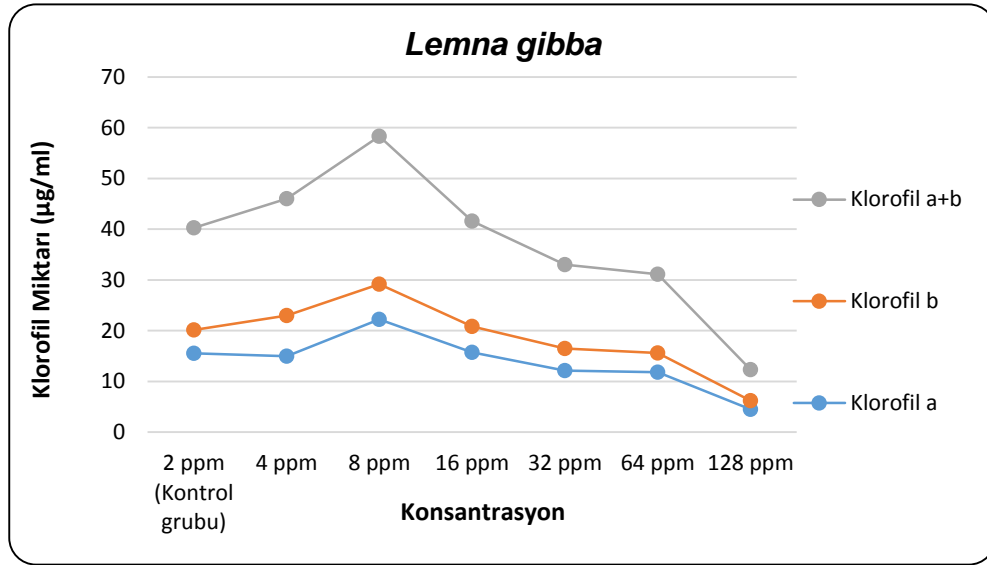
Toksisite deneyi bitiminde farklı B konsantrasyonlarına maruz bırakılan deney bitkilerinin klorofil a, klorofil b ve klorofil a+b miktarları ölçülmüştür. *L. minor* bitkisinin toksisite sonucu klorofil miktarları Şekil 3.8’de gösterilmiştir. Buna göre *L. minor*’ün klorofil a miktarı, en yüksek 9,35825 µg/ml ile 16 ppm B konsantrasyonunda iken, en düşük 1,7224 µg/ml ile 64 ppm B konsantrasyonundadır. Klorofil b miktarları en yüksek 3,48203 µg/ml ile 16 ppm B konsantrasyonunda, en düşük 1,35366 µg/ml ile 32 ppm B konsantrasyonunda belirlenmiştir. En yüksek ve en düşük klorofil a+b miktarları sırasıyla 32 ppm B konsantrasyonunda 12,84028 µg/ml ve 64 ppm B konsantrasyonunda 3,38516 µg/ml olarak ölçülmüştür. 2, 4 ve 8 ppm B konsantrasyonları için *L. minor* klorofil miktarları birbirine çok yakın değerlerde çıkmıştır. Bunun sebebinin 8 ppm B konsantrasyonuna kadar bitkinin strese girmediği, dolayısıyla gelişiminde B’un olumsuz etkisinin az olduğu söylenilebilir. 32 ppm B konsantrasyonuna kadar klorofil miktarları artış gösterirken daha sonra keskin bir azalış eğrisi görülmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda *L. minor*’ün klorofil a miktarı, klorofil b miktarına paralel bir eğri göstermiş olup, klorofil b miktarından daha fazla bulunmaktadır.



Şekil 3.8. *Lemna minor*’ün klorofil a, klorofil b ve klorofil a+b analiz sonuçları

Araştırma sonunda elde edilen *L. gibba*’nın klorofil miktarları Şekil 3.9’da verilmiştir. 8 ppm B konsantrasyonuna kadar klorofil a, klorofil b ve klorofil a+b

miktarları artış gösterirken, 8 ppm B konsantrasyonunda *L. gibba* maksimum gelişim gösterdiği için klorofil miktarları da buna paralel olarak en yüksek seviyeye ulaşmıştır. 16 ppm B konsantrasyonundan sonra klorofil miktarları azalma eğilimi göstermiştir. En düşük klorofil miktarları ise 128 ppm B'a maruz bırakılan bitkilerde gözlenmiştir. Buna göre, en yüksek ve en düşük klorofil miktarları; klorofil a için 8 ppm B konsantrasyonunda 22,2472 µg/ml ve 128 ppm B konsantrasyonunda 4,50225 µg/ml, klorofil b için 4 ppm B konsantrasyonunda 8,05407 µg/ml ve 128 ppm B konsantrasyonunda 1,66725 µg/ml, klorofil a+b için ise 8 ppm B konsantrasyonunda 29,16554 µg/ml ve 128 ppm B konsantrasyonunda 6,1695 µg/ml olarak ölçülmüştür.



Şekil 3.9. *Lemna gibba*'nın klorofil a, klorofil b ve klorofil a+b analiz sonuçları

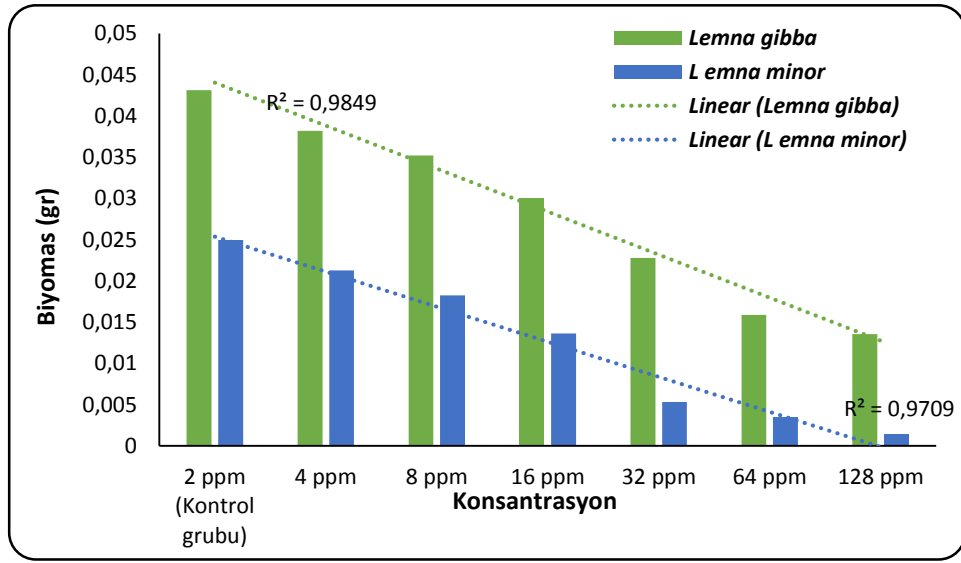
*L. minor* bitkisinde 16 ppm B konsantrasyonuna kadar klorofil miktarları artış gösterirken *L. gibba*'da 8 ppm B konsantrasyonuna kadar artış göstermiştir. *L. gibba* için toksisite deneyi sonrası klorofil b miktarı *L. minor*'ün aksine klorofil a miktarına göre yüksek olduğu görülmektedir.

### 3.1.4. Biyomas sonuçları

Toksisite deneyi sonrasında tüm B konsantrasyonlarındaki *L. minor* ve *L. gibba* bitkileri kurutulup tartılarak kuru biyomasları tespit edilmiştir (Şekil 3.10). *L. minor* türünün kuru biyomas ağırlıklarına bakıldığında artan B konsantrasyonu



ile birlikte biyomas üretiminin de düştüğü tespit edilmiştir. Bununla birlikte en yüksek biyomas değeri 2 ppm (Kontrol grubu) B konsantrasyonunda büyütülen bitkilerden 0,02498 g değeri ile elde edilmiştir. En düşük biyomas ise (0,0014566 gr )128 ppm B'a maruz bırakılan bitkilerden elde edilmiştir. *L. gibba* türünden elde edilen kuru biyomas ağırlıkları *L. minor*'e göre daha yüksek olup, bu tür için de en yüksek biyomas ağırlığının 0,043123 gr ile 2 ppm B'a maruz bırakılan bitkilerden elde edilmiştir. En düşük biyomas eldesi ise 128 ppm B içeren deney setlerinde bulunan bitkilerden elde edilmiştir.



Şekil 3.10. Araştırma sonunda çalışılan konsantrasyon setlerinden toplanan *L. minor* ve *L. gibba* türlerinin biyomas ağırlıkları

### 3.2. Biyoremediasyon Deneyleri

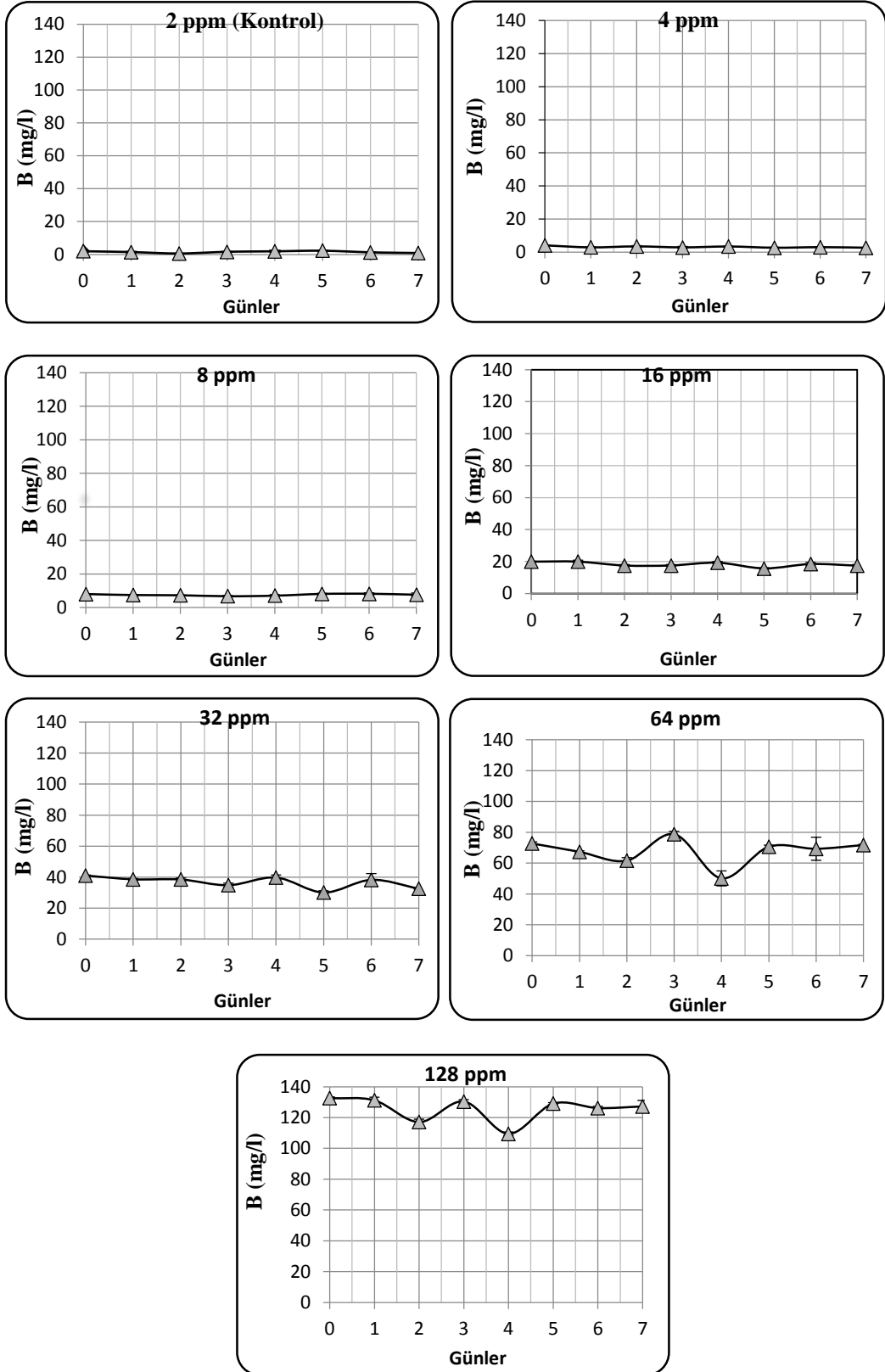
Bu tez çalışması kapsamındaki araştırmaların ikinci aşamasını *L. minor* ve *L. gibba* bitkilerinin kullanıldığı B üzerinde biyoremediasyon aşaması oluşturmuştur. Bu kapsamda 7 günlük biyoremediasyon deneyi boyunca çalışılan konsantrasyon setlerinden günlük olarak su örnekleri alınmış ve bu örneklerin pH, EC, sıcaklık gibi fiziko-kimyasal analizleri ve içerisinde bulunan B miktarları belirlenmiştir. Ayrıca, 7 günlük araştırma periyodu sonunda konsantrasyon setlerindeki bitkiler toplanarak bu bitkilerin bünyesine biriktirdikleri B miktarları tespit edilmiştir.

### 3.2.1. Su analiz sonuçları

Biyoremediasyon deneyi boyunca, bitkilerin bünyelerine B alımına bağlı olarak kültür solüsyonundaki B miktarının deney süresince değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. *L. minor* türünün oluşturduğu B konsantrasyon setlerinden örneklenen çıkış sularına ait sonuçlar Şekil 3.11’de gösterilmektedir. Elde edilen sonuçlara göre, 7 günlük biyoremediasyon deneyi boyunca setlerdeki B konsantrasyonu azalış değerinin sabit olmayıp daha çok dalgalı bir eğilim gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, yüksek B konsantrasyon setlerinde azalış miktarının düşük B konsantrasyon setlerine göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 7 günlük çalışma periyodu içerisinde ilk 3 günlük sürede B azalış miktarının en yüksek olduğu bulunmuştur.

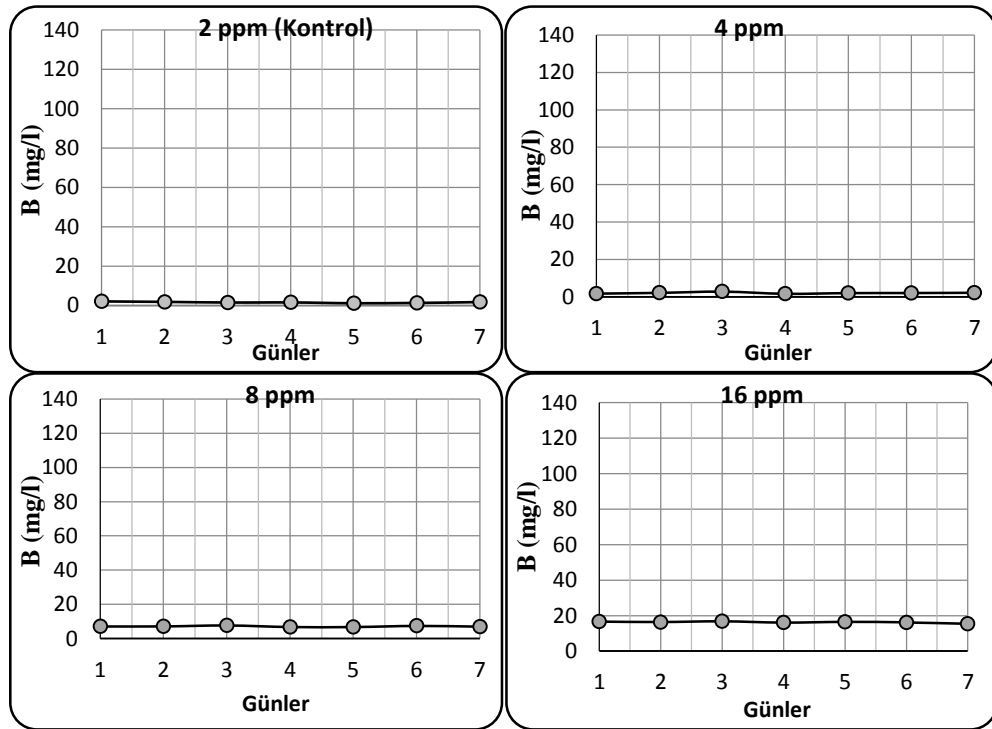
*L. minor* bitkisinin 2 ppm B konsantrasyon (kontrol grubu) seti su analizi sonuçlarına göre, en az B miktarı 0,5545 ml/L olup, bu değer 3. günde belirlenmiş, en yüksek 2,326 ml/L olup, 5. günde tespit edilmiştir. Günden güne B miktarlarındaki değişimin kontrol grubuna göre artmaya başladığı deney seti 16 ppm B konsantrasyon setidir. İlk gün bu konsantrasyonda 19,953 ml/L B bulunurken, bu değer, 3. gün 17,49 ml/L’ye düşmüştür. Sonuçlar, en fazla B miktarındaki değişimin 128 ppm B konsantrasyonunda gerçekleştiğini göstermektedir. İlk gün 132,6 ml/L B ölçülmüş olup bu değer 4. gün 109,496 ml/L olarak ölçülmüştür.

Biyoremediasyon deneyi boyunca, *L. gibba* türünün oluşturduğu B konsantrasyon setlerinden örneklenen çıkış sularına ait sonuçlar Şekil 3.12’de gösterilmektedir. Elde edilen sonuçlara göre *L. minor* bitkisinin bulunduğu bitkilerde olduğu gibi 7 günlük biyoremediasyon deneyi boyunca setlerdeki B konsantrasyonu azalış değerinin sabit olmayıp daha çok dalgalı bir eğilim gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, yüksek B konsantrasyon setlerinde azalış miktarının düşük B konsantrasyon setlerine göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 7 günlük çalışma periyodu içerisinde ilk 3 günlük sürede B azalış miktarının en yüksek olduğu belirlenmiştir.

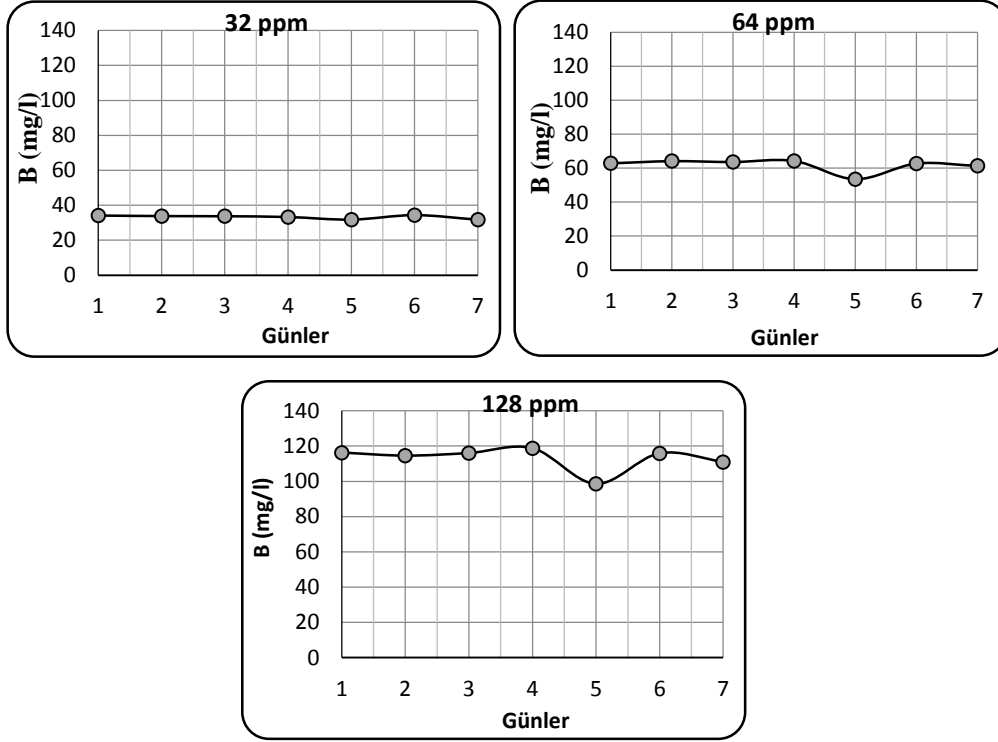


**Şekil 3.11.** *Lemna minor* bitkisinin bulunduğu deney setlerinden elde edilen su örneklerindeki B konsantrasyonlarının günlere göre değişimleri [Hata çubukları, standart sapma (n=3)'yı temsil etmektedir].

Biyoremediasyon deneyleri süresince, *L. gibba*'nın *L. minor*'e göre B'dan daha az etkilendiği görülmüştür. Kontrol grubunda B değişimi en fazla yaklaşık 0,9 ml/L kadar olmuştur. Kontrol grubuna göre en fazla B miktarındaki değişim 64 ppm B konsantrasyonunda görülmüştür. Bu değer devam eden günlerde azalmış ve 5. gün 53,43 ml/L olarak ölçülmüştür. *L. gibba* için en fazla değişim 128 ppm B konsantrasyonunda görülmüştür. Deney başlangıcındaki B miktarı 116,3 ppm iken 5. güne kadar azalıp artan bir eğilim göstermiş ve 5. gün B miktarı 98,5 ppm ile en düşük seviyeye inmiştir. Deneyin takip eden son iki gününde de B miktarında değişim gözlenmiş ve son gün B miktarı 111,06 ppm olarak ölçülmüştür. *L. gibba* setlerinin su analizlerinde 4 ppm ve 8 ppm B konsantrasyonlarındaki B miktar değişimleri kontrol grubuna yakın miktarlarda olup fazla bir değişim görülmemektedir. En az B değişimi 8 ppm B konsantrasyonunda gözlenmiştir. Deneyin ilk günü kültür solüsyonunda 7,13 ppm B ölçülmüştür. 5. güne kadar kültür solüsyonundaki B miktarında çok az değişiklikler olmuş ve 5. gün en düşük seviyeye inmiştir.



**Şekil 3.12.** *Lemma gibba* bitkisinin bulunduğu deney setlerinden elde edilen su örneklerindeki B konsantrasyonlarının günlere göre değişimleri [Hata çubukları, standart sapma (n=3)'yı temsil etmektedir].



**Şekil 3.12. (Devamı)** *Lemna gibba* bitkisinin bulunduğu deney setlerinden elde edilen su örneklerindeki B konsantrasyonlarının günlere göre değişimleri [Hata çubukları, standart sapma (n=3)'yı temsil etmektedir].

### 3.2.2. Biyoremediasyon deneyi pH ve iletkenlik

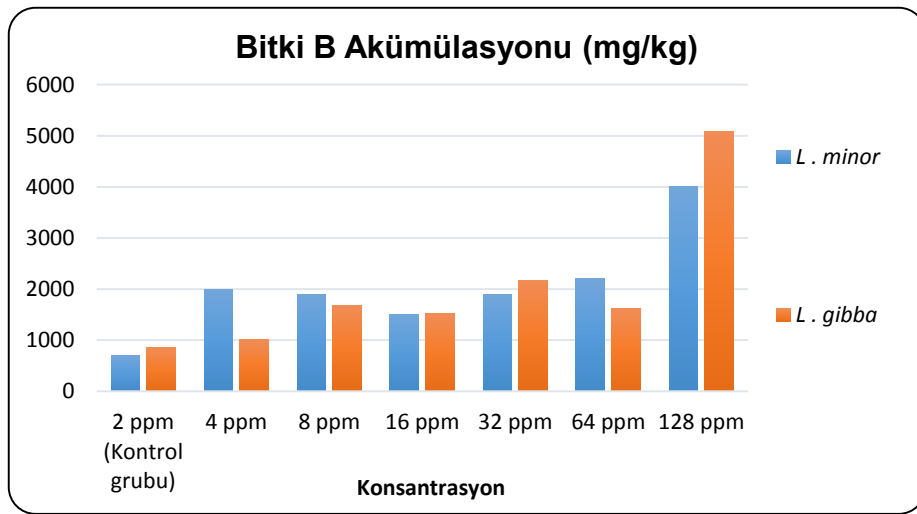
7 günlük biyoremediasyon deneyi süresince deney setlerinden alınan su numunelerinin fiziko-kimyasal parametrelerinden olan pH ve elektriksel iletkenlik değerleri Çizelge 3.2'de gösterilmektedir.

Elde edilen sonuçlara göre sulardaki B konsantrasyon oranı arttıkça pH ve elektriksel iletkenlik değerlerinin arttığı belirlenmiştir. Ayrıca, araştırma periyodu boyunca pH ve elektriksel iletkenlik değerlerinde dalgalanmalar olduğu görülmekte ve pH artışına bağlı olarak iletkenliğin azaldığı tespit edilmiştir. Araştırma sonunda, *L. minor* bitki türünün bulunduğu deney setlerinin iletkenlik ortalamaları şu şekilde bulunmuştur: 2 ppm B 994,8  $\mu\text{S/cm}$ , 4 ppm B 982,7  $\mu\text{S/cm}$ , 8 ppm B 915  $\mu\text{S/cm}$ , 16 ppm B 1146  $\mu\text{S/cm}$ , 32 ppm B 1186,2  $\mu\text{S/cm}$ , 64 ppm B 1096,2  $\mu\text{S/cm}$  ve 128 ppm B 1114,4  $\mu\text{S/cm}$ 'dir. İletkenlikle aynı anda ölçülen pH değerleri ortalamaları ise 2 ppm B 6,96; 4 ppm B 6,96; 8 ppm B 6,80; 16 ppm B 6,62; 32 ppm B 6,54; 64 ppm B 6,56 ve 128 ppm B 6,37'dir.

*L. gibba* bitkilerinin bulunduğu konsantrasyon setlerinden elde edilen sulardaki pH ve elektriksel iletkenlik ortalamaları ise şu şekilde bulunmuştur: 2 ppm B 7,05 ve 1016,1  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , 4 ppm B 6,95 ve 1010,2  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , 8 ppm B 6,93 ve 1062,5  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , 16 ppm B 6,88 ve 1046,7  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , 32 ppm B 6,85 ve 1065  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , 64 ppm B 6,72 ve 993,9  $\mu\text{S}/\text{cm}$  ve 128 ppm B 6,63 ve 946,1  $\mu\text{S}/\text{cm}$ 'dir.

### 3.2.3. Bitkilerin B akümülyasyonu

Biyoremediasyon deneyi boyunca bitkilerin bünyelerinde biriktirdikleri B miktarları Şekil 3.13'te gösterilmiştir.



Şekil 3.13. *L. minor* ve *L. gibba*'nın 7 günlük deney periyodu sonrasında içerdikleri B miktarları

7 günlük deney periyodu sonrasında *L. minor* bitkisi 4 ve 8 ppm B'a maruz kaldığında, kontrol grubuna göre bünyesinde daha yüksek miktarlarda B biriktirmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, 4 ppm B deney setindeki bitkilerde 1999,1 mg/kg B ve 8 ppm'de ise 1889,7 mg/kg B ölçülmüştür. Artan B konsantrasyonu ile bitkilerdeki B miktarında dalgalanmalar görülse de, kontrol grubuna göre bir artış söz konusudur ve en yüksek miktar 4007,5 mg/kg B ile 128 ppm'lik sette görülmüştür. *L. gibba* kontrol grubu bitkilerinin bu deneyde B akümülyasyonu 859,6 mg/kg B olarak ölçülmüştür. *L. minor*'de olduğu gibi bu türde de artan B konsantrasyonu ile B akümülyasyonunda artış görülmüş ve en yüksek değer 5091,7 mg/kg B ile 128 ppm'de ölçülmüştür. Sonuç olarak *L. minor* düşük konsantrasyonlarda nispeten daha yüksek B biriktirme eğilimi gösterirken *L. gibba* yüksek konsantrasyonlarda nispeten daha yüksek B çekebildiği görülmüştür.

**Çizelge 3.2.** Biyoremediasyon deneyi süresince deney setlerinden alınan su numunelerinin pH ve elektriksel iletkenlik değerleri

	<i>Lemna minor</i>										<i>Lemna gibba</i>						
	2ppm (Kontrol)	4 ppm	8 ppm	16 ppm	32 ppm	64 ppm	128 ppm	2ppm (Kontrol)	4 ppm	8 ppm	16 ppm	32 ppm	64 ppm	128 ppm			
<b>pH</b>	1. Gün	6,84	6,84	6,747	5,24	5,54	6,16	4,71	6,49	6,56	6,64	6,63	6,62	6,64			
	2. Gün	6,91	6,91	6,767	6,74	6,52	6,47	6,46	6,58	6,49	6,46	6,53	6,62	6,56			
	3. Gün	6,87	6,87	6,717	6,93	6,73	6,66	6,6	6,63	6,59	6,53	6,56	6,56	6,57			
	4. Gün	7,09	7,09	6,77	6,77	6,71	6,66	6,69	6,60	6,62	6,65	6,60	6,66	6,58			
	5. Gün	7,22	7,22	7,03	6,85	6,84	6,73	6,75	7,62	7,58	7,39	7,26	7,20	7,01			
	6. Gün	7,22	7,22	7,04	7,19	6,93	6,86	6,87	8,40	7,88	7,85	7,62	7,52	7,18			
	7. Gün	7,56	7,56	7,32	7,25	7,06	6,97	6,93	8,21	7,84	7,95	7,93	7,73	7,25			
<b>İletkenlik (µS/cm)</b>	1. Gün	1076	1045	949,7	1074,6	1133	1063,3	1410,3	1040	1075,6	1047	1058,6	985,6	941,3			
	2. Gün	1045,6	929,6	924	1139,3	1128,6	1045,3	996	1054,6	1083,6	1088,3	1167,6	1006	968,3			
	3. Gün	854,6	938,3	885,7	1220,6	1144	1201,3	1084,3	1051	1101	1066,6	1058,6	1021	959,3			
	4. Gün	1075,6	994,3	880,7	878	1113,3	820,6	918	1022	1077	1052	1058,6	1009,6	945,3			
	5. Gün	1033	1021,3	913	1202,3	1607	1170,6	1109,6	990,3	1041,6	1029	1042	979,3	926,3			
	6. Gün	774,3	930,3	898,7	1120	942,6	1034	1102,3	979	1032	1033,6	1044,3	984,3	952,6			
	7. Gün	1007	963,3	911,7	1222,3	1193	1217	1153,3	935	1026,6	1010,6	1025	971,3	930			

### 3.3. Enzim Deneyleri

Araştırma kapsamında farklı B konsantrasyonlarına maruz bırakılan *L. minor* ve *L. gibba* bitkilerindeki antioksidan enzimlerden olan APX, GPX, CAT, SOD ve GR aktiviteleri belirlenmiştir (Şekil 3.14).

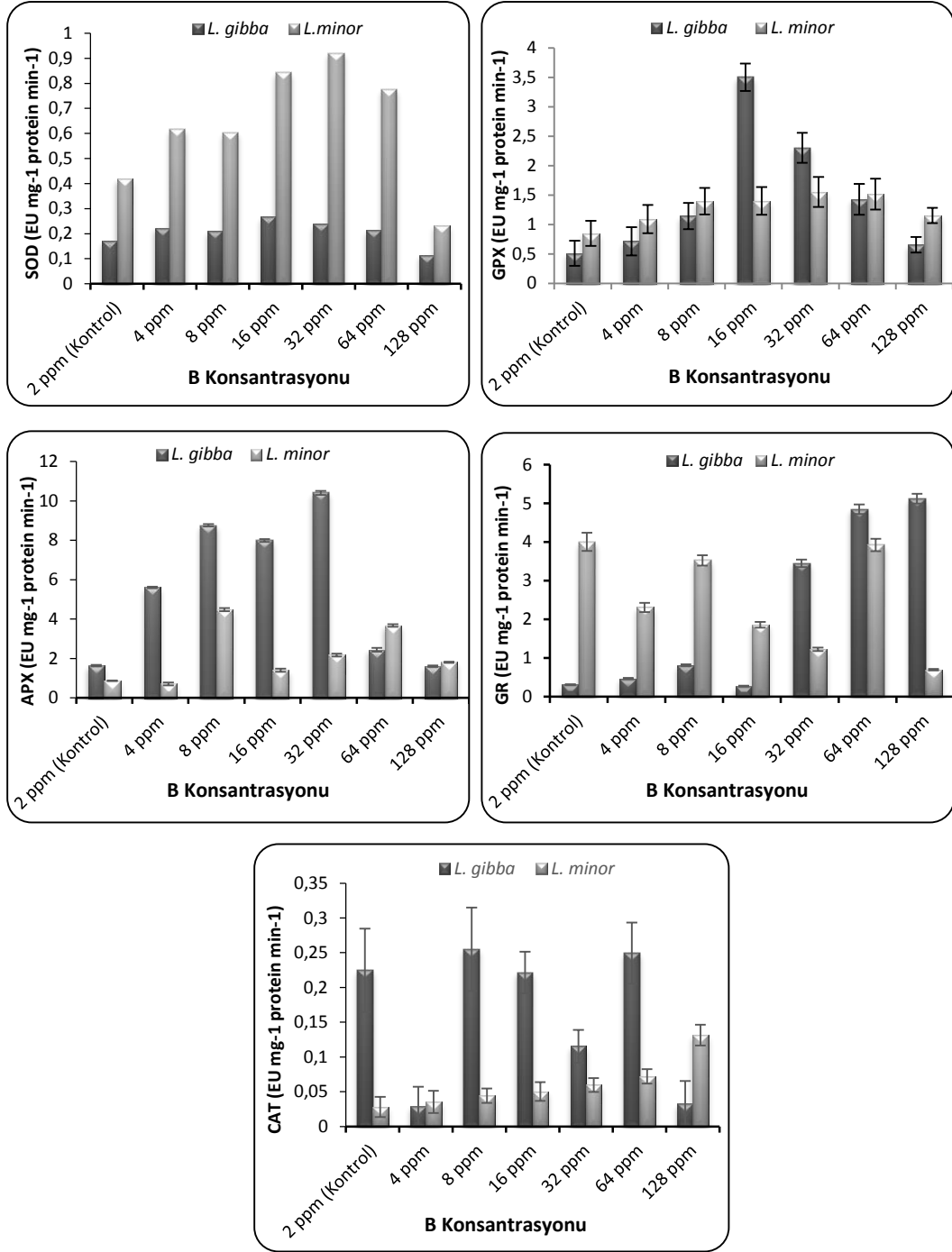
Elde edilen sonuçlara göre, APX enzim aktivitesi *L. gibba*'da *L. minor*'e göre daha yüksek çıkmıştır. *L. gibba* 32 ppm B'a maruz kaldığında en yüksek aktivite göstermiş ve APX aktivitesi  $10,4 \text{ mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$ , 128 ppm B'a maruz kaldığında ise en düşük aktivite göstermiş ve  $1,6 \text{ mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. *L. gibba*'nın aksine *L. minor* en yüksek APX aktivitesi 8 ppm B'a maruz kaldığında göstermiştir. En düşük APX aktivitesi ise 4 ppm B konsantrasyonunda  $0,7 \text{ mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$ 'dir.

*L. gibba*'nın enzim aktivitesinin belirlenmesi deneyinde 16 ppm B'a maruz kaldığında  $3,5 \text{ mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$  ile en yüksek GPX aktivitesi olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubuna göre en az GPX aktivitesi ise,  $0,65 \text{ mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$  ile 128 ppm B konsantrasyonuna maruz kaldığında göstermiştir. *L. minor* için, en yüksek GPX aktivitesi 32 ppm B'a maruz bırakıldığında  $1,55 \text{ mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$  olarak ve en düşük değer ise 4 ppm B'a maruz bırakıldığında  $1,09 \text{ mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$  olarak ölçülmüştür.

SOD enzim aktivitesi *L. minor* bitkisinde daha yüksek çıkmıştır. *L. gibba*'nın en yüksek ve en düşük SOD aktiviteleri sırasıyla 16 ppm B konsantrasyonunda  $0,26 \text{ mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$  ve 128 ppm B konsantrasyonunda  $0,11 \text{ mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$  değerleri ölçülmüştür. *L. minor* için en yüksek SOD aktivitesi 32 ppm B konsantrasyonunda  $0,92 \text{ mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$  olarak belirlenmiştir. En düşük SOD aktivitesi ise 128 ppm B konsantrasyonunda  $0,23 \text{ mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$  olduğu gözlenmiştir.

*L. gibba*'nın CAT enzim miktarı 8 ppm B konsantrasyonunda  $0,25 \text{ mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$  maksimum değerde iken 4 ppm B konsantrasyonunda  $0,02 \text{ mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$  minimum değerdedir. *L. minor*'ün CAT miktarı *L. gibba*'ya oranla daha düşük olduğu görülmüştür. 128 ppm B'a maruz bırakıldığında *L. minor*'de en yüksek miktarda  $0,131 \text{ mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$ , 4 ppm B'a maruz bırakıldığında en düşük miktarda  $0,035 \text{ mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$  CAT aktivitesi ölçülmüştür.





**Şekil 3.14.** B'a maruz bırakılan *L. minor* ve *L. gibba* bitkilerinin APX, GPX, CAT, SOD ve GR antioksidan enzimlerinin aktiviteleri. [Hata çubukları, standart sapma (n=3)'yı temsil etmektedir]

Son olarak GR enzim aktivitesine bakılmıştır. Buna göre, *L. gibba* 128 ppm B konsantrasyonunda 5,11 mg<sup>-1</sup> protein min<sup>-1</sup> ile maksimum aktivite göstermiştir. 16 ppm B konsantrasyonunda 0,27 mg<sup>-1</sup> protein min<sup>-1</sup> ölçülmüştür ve minimum aktivite bu konsantrasyonda görülmüştür. *L. minor*'ün GR aktivitesi 64 ppm B konsantrasyonunda 3,92 mg<sup>-1</sup> protein min<sup>-1</sup> miktarı ile en yüksek seviyededir. 64 ppm B konsantrasyonuna kadar kontrol grubuna göre GR enzim aktivitesinde azalış gözlenirken 64 ppm'de tekrar artış göstermiştir. 128 ppm B konsantrasyonunda 0,69 mg<sup>-1</sup> protein min<sup>-1</sup> miktarı ölçülmüş ve GR aktivitesi minimum seviyeye inmiştir.

*Lemna* cinsine ait türlerin antioksidan enzim aktivitelerindeki dalgalanmaların, B'a karşı bitkilerin oluşturduğu stresle paralellik gösterdiği düşünülmektedir. Bitkinin B stresine girdiği durumlarda bünyesine B almayı yavaşlattığı ya da durdurduğu için antioksidan enzim miktarları da azalmış ya da sabit kalmıştır.

#### 4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Bitki büyümesini ve gelişmesini merkeze alan parametre yaklaşımları, bitkilerde hem B'un hemde diğer elementlerin inhibitör etkilerini değerlendirmek için sıklıkla kullanılan teknikler arasında gösterilmektedir (Appenroth ve ark. 2010; Henke ve ark 2011). Bununla birlikte, bitkilerin bir stres faktörüne karşı tolerans tepkisi bitkilerin hayatta kalabilme yeteneği olarak tanımlanabilmektedir. Bu çalışmada; 4, 8, 16, 32, 64 ve 128 ppm B konsantrasyonlarına maruz bırakılan *L. minor* ve *L. gibba* bitkilerinin 7 günlük test periyodu boyunca büyüme parametreleri izlenmiştir. Bu sayede B elementinin bu bitkilerde oluşturabileceği morfolojik ve enzimatik değişimler incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara ve yapılan One-way ANOVA istatistiksel analizlerine göre 16, 32, 64 ve 128 ppm B'a maruz bırakılan bitkilerin RGR ve biyomasları ile kontrol grubu bitkilerinin sahip olduğu RGR ve biyomasları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ), (Şekil 3.6, Şekil 3.7 ve Şekil 3.10). Bu durum B'un bu konsantrasyonlarda bitkiler üzerinde bir inhibitör etkisi oluşturduğunu göstermektedir. Dahası *L. gibba* için 32 ppm, *L. minor* için de 16 ppm B konsantrasyonundan itibaren bitkilerin biyomaslarında azalma görülmüştür (Şekil 3.2 ve Şekil 3.4). Ancak 4 ve 8 ppm B konsantrasyonuna maruz bırakılan bitki türlerinin büyüme parametreleri ile kontrol grubunun değerleri arasında herhangi bir istatistiksel fark bulunamamıştır ( $p > 0,05$ ). Bu sonuç ise, 4 ve 8 ppm B konsantrasyonuna maruz kalan bitkiler ile kontrol grubunda bulunan bitkiler arasında büyüme parametreleri açısından bir farklılığın bulunmadığını ve bu konsantrasyona maruz bırakılan bitkilerin detoksifikasyon mekanizmalarının, deney süresi içerisinde B toksisitesinin üstesinden gelmeyi başardığını belirtmektedir. Ancak elde edilen sonuçlara göre yüksek B konsantrasyonlarına (16, 32, 64 ve 128 ppm) maruz bırakılan bitkilerde ise bu tolerans stratejisinin geçerli olmadığı bulunmuştur. Çalışma için kullanılan Lemna türlerinin B'a karşı hayatta kalma stratejileri köklerin çevresindeki serbest B'u azaltan rizosferde bulunan B-şelatlayıcı bileşiklerin salgılanmasıyla (Mkandawire ve Dudel 2007) ve bakteriyel aktivite (Stout ve ark. 2010) ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde, bitkilerin tolerans ve tepki mekanizmaları ortamda bulunan ya da kurulan deney setlerine yüklenen B konsantrasyonuna bağlı

olduğunu ve büyüme parametrelerinin de ortamda bulunan B konsantrasyonlarına göre değişiklik gösterebileceğini bulunmuştur. Literatür incelendiğinde, benzer sonuçların çeşitli araştırmacılar tarafından, öncü çalışmalar çerçevesinde rapor edildiği görülmektedir. Örneğin Bökük ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada yedi günlük deney periyodu içerisinde çeşitli B konsantrasyonlarına maruz bırakılan bitkilerin uygulanan B dozajlarına göre farklı büyüme özelliği gösterdiği belirlenmiştir. Aynı çalışmada 50, 100 ve 150 mg l<sup>-1</sup> gibi yüksek B konsantrasyonlarına maruz bırakılan *L. gibba* bitkilerinin detoksifikasyon mekanizması üzerinde inhibe edici ve toksik etkisi olduğunu bulmuşlardır. Bununla birlikte, Marin ve Oron (2007) yaptıkları çalışmada ortamdaki B konsantrasyonunun 10 mg l<sup>-1</sup>'in üzerine çıkmasıyla birlikte bitkide B toksisite etkilerinin gözlenmeye başladığı tespit edilmiştir.

Bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlara göre, *L. gibba* ve *L. minor*'ün RGR değerlerinin birbirine çok yakın olduğu bulunmuştur (Şekil 3.6 ve Şekil 3.7). Bu kapsamda *L. minor* türünün 16 ppm B konsantrasyonuna maruz bırakılmasıyla 2. günden itibaren RGR değerinde ani bir düşüş görülmüştür. Bununla birlikte aynı türün en yüksek B konsantrasyon olan 128 ppm B'a maruz bırakılan bireylerinde ise deneyin 2. gününden itibaren hiçbir artış gözlenmemiştir. *L. gibba* türüne bakıldığında ise bitkilerin ortamda artan B konsantrasyonları ile birlikte RGR değerlerinde de kademeli olarak düşüş trendi belirlenmiştir. Bu sonuçlar, aynı familyaya ait bitki türlerinin bu çalışmada kullanıldığı düşünüldüğünde beklenen bir sonuçtur.

Biyomonitör tür, araştırmacıların spektrometre ve fotometre aracılığıyla kimyasal maddeler, enzim aktiviteleri ya da diğer ekosistem ile ilgili parametreleri izlediği, çevre kalitesinin niceliksel yönleri hakkında bilgi içerir (Horvat ve ark. 2007; Naumann ve ark. 2007; Appenroth ve ark. 2010; Henke ve ark. 2011). Öte yandan, biyoindikatör tür ise araştırmacılara ekosistemin bozulduğunu ya da çevre kalitesinin düşüşü hakkında bilgi vermektedir (Turnhout ve ark. 2007; Chang ve ark. 2009; Peresa ve ark. 2011; Bökük ve ark. 2013). Bu çalışmanın sonuçlarına göre, *L. gibba* ve *L. minor*'ün RGR değişimleri 4 ve 8 ppm B konsantrasyonlarında nispeten değişmeden kalmış ve sudaki 8 ppm ve altındaki B konsantrasyonlarını bu bitkiler tolere edebilmişlerdir. Bu durum, *L. gibba* ve *L. minor*'ün belirlenen RGR

değerleriyle sulak biyota da bulunan B'nin varlığını izleyebilmek için biyomonitör tür olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, tespit edilen istatistiksel bulgular sayesinde *L. gibba* ve *L. minor*'ün 16, 32, 64 ve 128 ppm B konsantrasyonlarında RGR'lerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşmesi ve bu konsantrasyonlarda büyüme inhibisyonunun maksimum seviyeye ulaşması, bu bitkilerin belirtilen B konsantrasyonları için uygun biyoindikatör tür olduğunu ortaya koymaktadır. Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre *L. gibba* ve *L. minor* türleri B ile kirlenmiş sulcul ekosistemlerin ekotoksikolojik risk değerlendirmesi için uygun türler olduğunu göstermektedir.

Bitkilerin aşırı çoğalması ve tür içi rekabet, doğal büyüme ortamlarında su mercimeklerinin büyümelerinin sınırlandırılmasına neden olan önemli faktörlerin başında gelmektedir (Driever ve ark. 2005; Frederic ve ark. 2006). Ayrıca ortamda bitki yoğunluğunun artmasıyla bitkilerin RGR'sinde düşüşler görülebilir (Demirezen ve ark. 2007). Normal ekolojik koşullar altında ve çevre şartlarında, *L. minor* ve *L. gibba* bitkileri hızlı bir şekilde kolonileşip bulunduğu alanı işgal edip hızlıca dominant hale gelebilir (Kadlec ve Bevis 2009). Ancak fiziksel alanları sınırlandığında, sayıca aşırı artışı ve tür içi rekabet, türlerin bireyleri arasında oluşabilir (Njambuya ve ark. 2011). Bu yüzden bu türlere ait bireyler arasındaki rekabet özellikle göletler, hendekler ve kanallar gibi doğal sulcul ortamlarda daha yaygındır (Szabo et al. 2003; Njambuya et al. 2011). Tüm bu nedenlerden dolayı, araştırmacıların kendi deney setlerini kurarlarken bitkilerin aşırı çoğalma mekanizmasında göz önünde bulundurmaları gerekmektedir.

Bu çalışma kapsamında tespit edilen klorofil miktarlarına bakıldığında, *L. minor* bitkisinin klorofil a, b ve a+b değerlerinin 16 ppm B konsantrasyonuna kadar nispeten yükseliş trendine sahip olduğu ancak bu konsantrasyon değerinden sonra ani bir düşüş olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, *L. gibba* türü için ölçülen klorofil miktarı incelendiğinde ise 8 ppm B konsantrasyonuna kadar bir yükseliş değeri, sonrasında ise kademeli bir azalış tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, ortamdaki B konsantrasyonunun artması ile bitki dokularındaki fotosentetik pigmentlerinde belirli bir B dozuna kadar attığını belirtmektedir. Bu durum ise, klorofil a ve b gibi fotosentetik pigmentlerin bitkilerin ortamda bulunan B'a karşı oluşturdukları bir adaptasyon mekanizmasının bir sonucu olduğu düşünülmektedir.

Ayrıca Şekil 3.7 ve Şekil 3.8’de gösterildiği gibi *L. minor* türü için 32, 64 ve 128 ppm ve *L. gibba* türlerinin 16, 32, 64 ve 128 ppm B konsantrasyonuna maruz bırakılan bireylerinde fotosentetik pigmentlerin ani bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Bu da muhtemelen ortamda bulunan B’un tetiklemesiyle, dokuda yayılan reaktif oksijen türleri ile kloroplast yapısında özellikle de tilakoit zarda meydana gelen zararlar ile ilişkilidir (Landi ve ark. 2013). Bununla birlikte, bitkilerde meydana gelen bu azalışta B’un fotosentetik pigmentlerin biyosentezine katılan enzimler üzerindeki inhibitör etkisi ve yaşlanmadan kaynaklı faktörlerinde etkisi olduğu düşünülmektedir (Qian et al. 2009; Singh ve Prasad 2014). Sonuç olarak, B’un klorofil miktarlarında azaltıcı etkisi olduğunu gösteren diğer çalışmalarda bu çalışmanın sonuçlarını destekler niteliktedir (Papadakis ve ark. 2004 a, b; Eraslan ve ark. 2007; Han ve ark. 2009; Wang ve ark. 2011; Singh ve Prasad 2014 ).

Bitkilerde stres, büyüme ve gelişmeyi negatif yönde etkilemekte ve çok sayıda makromolekül ve hücreyel yapıların zarar görmesine neden olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini teşvik etmektedir (Blasco ve ark. 2015). Bu kapsamda; kuraklık, ağır metal, tuz stresi, hava kirliliği, UV ışınları, ozon ve SO<sub>2</sub> gibi çevresel stres altındayken ROS üretimi artmaktadır. Daha fazla ROS temizlemek ve detoksifikasyonda rol oynamak için de antioksidan enzimler aktive edilir (Parlak ve Yılmaz 2012). Süperoksit radikalleri, hidroksil radikalleri, singlet oksijen ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumunun sonucu olarak oksidatif stres oluşmaktadır (Bouzai ve ark. 2010). ROS; bitkilerin membran yağlarına, proteinlerine, pigmentlerine ve nükleik asitlerine zarar verebilir. Hücrelerin oksidatif streslerinin yan etkilerini önlemek için antioksidan savunma sistemleri bulunmaktadır (Briat 2002). Bitkilerdeki antioksidan seviyeleri enzimatik (süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon redüktaz) ve enzimatik olmayan (glutatyon, askorbik asit, prolin, karotenoidler, tokofenoller vb.) düşük molekül ağırlıklı antioksidanların oluşturduğu antioksidan sistemi tarafından kontrol edilir.

Bir metaloenzim olan süperoksit düsmutaz (SOD), detoksifikasyon sürecinde ilk enzim olup süperoksit radikallerini H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’ye çok hızlı oranda katalizleyen antioksidan enzim savunma sisteminin bir parçasıdır (Hou ve ark. 2007; Babic ve ark. 2009). Dolayısıyla yapılan çalışmada B toksisitesi karşısında ilk savunucu

enzim olan SOD aktivitesine bağı olarak hücre içerisindeki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> artması beklenmiştir. Sharma and Dubey (2007) yaptıkları çalışmada su mercimeklerini Al ve Zn'ye maruz bıraktıklarında SOD aktivitesinden dolayı hücre içerisinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' in biriktiğini savunmuşlardır. SOD aktivitesi arttıkça hücrelerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikimi artar ve bu katalaz-glutasyon redüktaz enzim aktiviteleriyle önlenir. Bu yüzden SOD bitkilerin oksidatif stresle savaşmasında önemli bir rol oynamaktadır (Fridovich 1986; Shalini ve Dubey 2003; Sharma ve Dubey 2007; Gill ve Tuteja 2010).

Bu çalışmada SOD aktivitesi, *L. minor* deney organizması için artan B konsantrasyonu ile kontrol grubuna göre artış göstermiş ve en yüksek değer 0,92 EU mg<sup>-1</sup> protein min<sup>-1</sup> ile 32 ppm B konsantrasyonunda belirlenmiştir. Daha önceki çalışmalarda artan metal konsantrasyonu SOD enzim aktivitesinde paralel bir şekilde arttığı belirtilmiştir. Saygıdeğer ve Parlak (2012), yaptıkları çalışmada Lemnaceae familyasına ait olan *L. gibba*, *L. minor* ve *S. polyrrhiza* türlerini 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 ve 1.5 mg L<sup>-1</sup> konsantrasyonlarında Çinko (Zn)'ya dört gün maruz bırakmışlar ve APX, GPX, SOD ve CAT enzim aktivitelerini ölçmüşlerdir. Deney bitiminde artan Zn konsantrasyonu SOD aktivitesinin de arttığını bulmuşlardır. Güneş ve ark. (2006), 20 ve 30 mg kg<sup>-1</sup> B'a maruz bıraktıkları *Vitis vinifera L.* bitkisinin SOD aktivitesinin kontrole göre arttığını tartışmışlardır. Hou ve ark. (2007), *L. minor*'ü yüksek Cu ve Cd konsantrasyonlarına maruz bıraktıklarında kontrol grubuna göre SOD aktivitesinin daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. SOD aktivitesindeki bu artış muhtemelen hem doğrudan B iyonlarının etkisinden hem de süperoksit radikal seviyelerinde bir artışın dolaylı etkisinden kaynaklanabilir (Prasad ve ark. 1999).

Şekil 3.12'de görüldüğü gibi, *L. gibba* türü için 16 ppm B konsantrasyonuna kadar SOD aktivitesi artmış ve 128 ppm'e kadar düşük oranda azalma görülmüştür. En yüksek SOD aktivitesi ise 16 ppm B konsantrasyonuna maruz kalmış bitkilerde ölçülmüştür. Literatür incelendiğinde, SOD enziminin diğer antioksidan enzimlerden farklı olarak tipik iki fazlı tepki gösterdiği görülmektedir (Babic ve ark. 2009). Bu göre, ilk fazda enzimler, genellikle kendi aktivitelerini artırır ve artan ROS konsantrasyonu ile başa çıkan yeni bitki hücreleri üretirler. İkinci aşamada ise, antioksidan enzim kapasitesi azalır ve bitkilerdeki biyomoleküllerin, yapıların ve süreçlerin geri dönüşümü olmayacak şekilde bozulmalarıyla sonuçlanır

(Babic ve ark. 2009). Bu nedenle *L. gibba* 16 ppm B konsantrasyonuna kadar SOD enzim aktivitesi açısından birinci fazda olduğu düşünülmektedir. 16 ppm B konsantrasyonunda bitki maksimum strese girerek yaşamsal fonksiyonlarını devam ettirebilmek için SOD enzim aktivitesini azaltma eğilimine girmiştir. Aynı zamanda kültür ortamının deney süresince günlük alınan örneklerinin B analizleri sonuçlarına dayanarak bünyelerinde biriken fazla B'ü bırakarak ve B alımını azaltarak sözü edilen bu durumu sağladıkları düşünülmektedir. Sonuç olarak, bu çalışmanın SOD aktivite sonuçlarına göre; *L. minor*'ün enzim aktivitesinin *L. gibba*'ya oranla daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu da *L. minor*'ün yüksek B stresıyla *L. gibba* türü ile karşılaştırıldığında daha iyi başa çıkabileceği ile ilgili güçlü kanıtlar sunmaktadır.

Antioksidan enzimler arasında bulunan CAT enzimi,  $H_2O_2$ 'i su ve oksijene parçalayarak hücreleri oksidatif strese karşı korumada hayati bir öneme sahiptir. CAT sadece peroksizomlarda bulunur, ancak aşırı seviyede ROS üretildiği zaman stres esnasında ROS detoksifikasyonu için gereklidir (Parlak ve Yılmaz 2012). CAT bitkilerde bulunan asıl  $H_2O_2$  temizleyici enzimdir ve  $H_2O_2$  için hücresel lavabo olarak düşünülmektedir. Ancak düşük substrat afinitesinden dolayı CAT sadece yüksek oksidatif stres altındayken harekete geçer (Mittler 2002). Bu çalışmada, uygulanan B dozajları arasında CAT aktivitelerinde önemli bir artışın olduğunu göstermektedir. Elde edilen sonuçlara göre, bitkilerdeki CAT aktivitesinin 7 gün boyunca B'a maruz bırakılmasıyla bir birlikte arttığı gözlenmiştir. *L. minor* bitkisinde CAT enzim aktivitesi çalışma süresi boyunca dalgalı bir trend izlemiştir. En yüksek CAT aktivitesi 128 ppm B konsantrasyonuna maruz bırakılan bitki bireylerinde belirlenmiş olup, aktivite de kontrol grubuna göre yaklaşık olarak %129 oranında artışın olduğu gözlenmiştir. Bu durumda, 128 ppm B konsantrasyonuna kadar *L. minor*'ün B toksisitesine karşı maksimum savunma gösterdiğini daha sonra artan B konsantrasyonuyla antioksidan enzim sistemde çöküşten kaynaklı olarak CAT aktivitesinin azaldığı düşünülmektedir. CAT aktivitesindeki bu azalışa  $H_2O_2$  birikimi ve buna müteakip lipitler, proteinler ve DNA'da oluşan oksidatif hasar eşlik etmiştir.



*L. gibba*'da ise; artan B konsantrasyonu ile deney setlerinde CAT aktivite miktarlarında çeşitli dalgalanmalar görülmüştür. Sunulan çalışmanın en yüksek CAT aktivitesi 8 ppm B konsantrasyonunda ölçülmüştür. *L. gibba* bitkisinde 8 ppm deney setinden sonra azalan trend gözlenmiştir. Bu durumun, antioksidan enzim sisteminde bozulmadan kaynaklanabileceği gibi enzim sentez inhibisyonundan yada B toksisitesi altında enzim alt ünitelerinin birleşiminde olan değişikliklerden kaynaklanabiliyor olduğu düşünülmektedir (Hou et al. 2007). CAT aktivitesinin benzer bir inhibisyonu ağır metale maruz bırakılmış Lemnaceae familyasına ait çeşitli türlerinde de bildirilmiştir (Mohan and Hosetti 1997; Hou et al. 2007). Ayrıca, sunulan çalışmada B toksisitesine karşı CAT aktivitesi açısından *L. gibba* maksimum 8 ppm B konsantrasyonuna kadar dayanabilirken *L. minor*'ün 128 ppm B konsantrasyonuna dayanabildiği görülmüştür. Fakat CAT enzim aktivite değeri *L. gibba*'da *L. minor*'ün yaklaşık 3 katı kadardır. Bu fark ise, yüksek B toksisitesine karşı oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *L. gibba* tarafından daha yüksek oranda parçalandığının göstergesi olabilir. Literatür incelendiğinde, Shanker ve ark. (2005), artan Cd konsantrasyonu ile CAT seviyelerinin azaldığını rapor etmişlerdir. Willekens ve ark. (1997), aşırı ROS üretiminin CAT'ın inaktive edebileceğini tartışmışlardır. Boscolo ve ark. (2003), ayrıca mısır bitkisinde Al toksisitesi altında CAT aktivitesinde herhangi bir değişimin olmadığını fasulye ve pirinç bitkileriyle yaptığı çalışmalarda CAT aktivitesinde düşüş yada artışın olduğunu bulmuşlardır. CAT aktivitesindeki bu uyumsuz sonuçlar; çalışılan bitki organlarındaki farklılıklar, kullanılan metalin yada metallerin konsantrasyonu ve uygulanma süresi ile araştırılan bitki türlerinden kaynaklanıyor olabilmektedir (Radic ve ark. 2010). Çeşitli çalışmalar, çevresel stres durumlarında yüksek APX aktivitesine genellikle SOD ve CAT aktivitelerinde bir artışın eşlik ettiğini göstermiştir (Rioset ve ark. 2009). APX; hücre duvarı (Mehlhorn ve ark. 1996), sitosol, kloroplast, mitokondri ve peroksisomlarda bulunur (Foyer ve Noctor 2003). Genellikle APX aktivitesi askorbik asitin kaybolma hızıyla değerlendirilir (Doorn ve Ketsa 2014). Hücrelerin antioksidan kapasiteleri, APX aktivitelerinin ölçülmesiyle tahmin edilebilir (Chaoui ve ark. 2004). Erarslan ve ark. (2007), B toksisitesi ile artan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin detoksifikasyonunda APX'in CAT'tan daha önemli bir rolü olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, *L. gibba* ve *L. minor*'ün artan SOD ve CAT aktivitesiyle bu

bitkilerin antioksidan savunma sistemini geliştirerek B toksisitesine uyum kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. Stres toleransı iyileştirilmesi genellikle antioksidan enzimlerin aktivitesinde bir artışa bağlıdır (Murgia ve ark. 2004; Lee ve ark.2007).

Bu çalışmanın sonuçlarına göre; *L. minor*' ün APX aktivitesi artan B konsantrasyonuyla artmış ve maksimum değeri 8 ppm B konsantrasyonuna maruz bırakılan bitkilerde görülmüştür. 8 ppm ve üzeri B'a maruz bırakılan bitkilerde APX aktivitelerinde azalma tespit edilmiştir. CAT enzimin aksine APX, daha özel yerlerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> küçük miktarlarda temizlenmesine izin veren H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> için daha yüksek bir afiniteye sahiptir (Asada 1992). *L. gibba* için ise kontrol grubuna göre en yüksek APX aktivitesi 32 ppm deney setinde gözlenmiştir. Artan B konsantrasyonuyla APX aktivitesinde doğrusal bir artış olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar, B toksisitesi altında aşırı peroksidaz aktivitesinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in sürekli detoksifikasyonu ile ilişkili olduğuna işaret etmektedir.

Glutasyon ile askorbat, bitki hücre antioksidatif savunma ağ içinde en önemli bileşenlerden biridir (Razinger ve ark. 2008). GSH, çok sayıda radikal proseslerini söndürücü olarak bilinen önemli bir antioksidan metabolitidir (Allen ve ark. 1997; Dixon ve ark. 1998; May ve ark. 1998; Asada 1999). Glutasyon, çevresel stres ve adaptasyon tepkisi arasında bir bağlantı görevi gören bir çok önemli bir sinyal molekülü olarak kabul edilir ve bu GR aktivitesi ile GSH'den rejenere edilir (Navari-Izzo et al. 1997). GR, okside glutasyonu GSH formuna dönüştürür. Bitki GSH'ları, indirgenmiş glutasyon ile farklı elektrofilik substratların konjugasyonunu katalizleyen ve bu şekilde ksenobiyotik ajanların detoksifikasyonunda rol oynayan anahtar bir enzimdir (Sing ve Prasad 2014). *P. vittata*, As maruz bırakıldığında yapraklarında GSH konsantrasyonunun arttırdığı rapor edilmiştir (Cao ve ark. 2004; Singh ve ark. 2006; Wei ve ark. 2010). Bu çalışma sonuçlarına göre *L. gibba*' da B konsantrasyonu arttıkça GR aktiviteside kontrol grubuna göre artmıştır. B artışı ile GR aktivitesinin artması makromoleküllerin daha fazla oksidatif hasarı ile ilişkili olabilir. Lipitler ve proteinlerin biriken zehirli ve reaktif yıkım ürünleri daha da serbest radikal zincir reaksiyonunu başlatabilir (Marrs 1996). Bu durumu belli ölçüde önlemek için, GR aktivitesi artarak bu reaktif yıkım ürünlerinin ve GSH arasındaki konjugasyon reaksiyonu muhtemelen hızlandırmış ve bu nedenle

deksenobiyotik etkileri zayıflatılmıştır (Sing ve Prasad 2014). Bu çalışmanın sonuçları, artan antioksidan enzim aktiviteleri ve ardından ROS temizleme işlemlerinin B toksisitesini hafifletici etkisi diğer çalışmalarla desteklenmiştir ( Al-Hakimi 2007; Gangwar ve ark. 2010; Hayat ve ark. 2012; Ahammed ve ark. 2013). *L. gibba*'nın aksine *L. minor* bitkisinde artan B konsantrasyonuna karşın GR aktivitesinde azalış görülmüştür. 32 ppm deney setinden sonra ise GR aktivitesinde dalgalanmalar görülmüştür. Bu azalışın B miktarı arttıkça ROS türevlerinin zehirli etkisi ya da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin aşırı üretiminin zararlı etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

GR ile birlikte diğer önemli H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> temizleyici GPX'tir. Artan GPX aktivitesi oksidatif strese karşı koruma sağlar (Roxas ve ark. 2000). Sunulan çalışmada, *L. gibba* bitkisinde GPX aktivitesi 16 ppm ve *L. minor*'da ise 32 ppm B konsantrasyonuna kadar artmış sonrasında azalma görülmüştür. Bizim çalışmamıza göre SOD aktivitesi ile koordineli GPX aktivitesi, süperoksit radikali ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin temizlenmesinde merkezi bir koruyucu rol oynar.

Bu tez çalışmasında, *L. minor* ve *L. gibba* türlerinin B içeren suların fitoremediyasyonu için kullanımının uygun olup olmadığı da araştırılmıştır. Uygun fitoremediyatörlerin bulunması B ile kontamine ekosistemlerdeki türler ve bunların yaşam ortamlarının ekosistem yönetimi için değerli imkanlar sağlamaktadır (Chang ve ark. 2009; Peresa ve ark. 2011). Şekil 3.11 incelendiğinde *L. minor*'ün deney periyodu boyunca günlük alınan su örneklerinin B miktarları verilmiştir. One Way Anova Analizi, kontrol grubu ile 8, 16, 32, 64 ve 128 ppm B konsantrasyonları arasında önemli derecede B azalışı görülmüş olup anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir ( $p < 0.05$ ). Bunun aksine, bu azalış 4 ppm B konsantrasyonu için anlamlı değildir. 8, 16, 32, 64 ve 128 ppm B kaplarında ilk 3 gün boyunca B içeriğinde düşük konsantrasyon setlerine göre hızlı bir şekilde azalış görülmüştür. Şekil 3.12'de ise *L. gibba*'nın fitoremediyasyon potansiyellerini belirten B alım miktarları görülmektedir. Bu sonuçlara göre; düşük konsantrasyonlarda (4 ve 8 ppm B) istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmama ile birlikte 16, 32, 64 ve 128 ppm B kaplarında ilk 4 gün ciddi B azalışı anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ( $p < 0.05$ ). Bu sonuçlara göre, *L. minor*'ün deney kaplarındaki B miktarlarının *L. gibba*'ninkinden yüksek olduğu

görülmektedir. Bu da *L. gibba*'nın B'u bünyesinde daha fazla biriktirebildiğini ve buna bağlı olarak fitoremediasyon seviyesinin *L. minor*'e oranla daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Eser element çıkarılması için uygun sulak alan bitki türlerinin seçimi, farklı türlerin bilinen birikim kapasitelerine dayanmaktadır (Marin ve Oron 2007). Bu çalışmanın sonuçları, *L. gibba* ve *L. minor* önceki çalışmalarda rapor edilen sulak alan bitkileri ile karşılaştırıldıklarında iyi birer B akümülatörü olduklarını göstermektedir. Şekil 3.13'te görüldüğü gibi, *L. gibba*'nın kültüvasyon sonrasında B akümülyasyon değerleri 860-5090 mg B kg<sup>-1</sup> arasında, *L. minor*'ün ise 700-4010 mg B kg<sup>-1</sup> arasında değişmektedir. Frick (1985) yaptığı çalışmada, 7 günlük kültüvasyon periyodu sonrasında 10 mg l<sup>-1</sup> B içeren solüsyonda periyod sonrası *L. minor*'ün 1132 mg B kg<sup>-1</sup> akümüle ettiğini rapor etmişlerdir. Quian ve ark. (1999), sulak alan bitkileri ile yaptıkları çalışmada *Mimulus guttatus* L. (Phrymaceae) ve *Marsilea drummondii* L. (Marsileaceae) bitkilerinin yaklaşık 700-1000 mg B kg<sup>-1</sup>, *Spartina alterniflora* L. (Poaceae), *Juncus xiphioides* L. (Juncaceae), *Myriophyllum brasiliense* L. (Saxifragales) ve *Pistia stratiotes* L. (Araceae) 500 mg B kg<sup>-1</sup>'dan daha az B akümüle ettiğini söylemişlerdir. Başka bir çalışmada ise Marin ve Oron (2007), deney periyodu sonrası 10 mg l<sup>-1</sup>B içeren solüsyondan *L. gibba*'nın 900-1900 mg B kg<sup>-1</sup> akümüle ettiğini söylemişlerdir. Çalışmanın sonuçlarına göre, artan B konsantrasyonu ile bitkilerin B akümülyasyonlarının arttığı görülmüştür. Ancak bu artış, hem *L. gibba* hem de *L. minor* için 4 ve 8 ppm deney setlerinde nispeten daha düşük oranla gözlenirken, 64 ppm B setinden sonra maksimum değere ulaştığı görülmektedir. Bu durumda, bu iki bitki türü B ile kirletilmiş sulara bünyelerine B ile doyurulmaya kadar B'un bitki kütlesine B göçü yolu ile katıldığını göstermektedir. Bu da aktif ya da pasif difüzyonun olduğu apoplastik veya simplastik yollarla B girişi olduğu düşünülmektedir (Bocuk ve ark. 2013). Öte yandan, çalışmanın sonuçlarının artan B konsantrasyonu ile bitkilerin B akümülyasyonlarının artması bu durumu kanıtlar niteliktedir. Aslında, B konsantrasyonunun artmasıyla birlikte bitki B konsantrasyonlarında ani bir artış görülmektedir. Bu akümülyasyonla ilgili olarak, özellikle 64 ve 128 ppm B konsantrasyonlarında bitkileri B alım kontrol mekanizmasının bozulduğu ileri sürülmektedir. Bu da bitkilerin düzenleyici mekanizmalarında oluşan aşırı yükten

kaynaklandığı düşünölmektedir. Böylece, B canlı veya ölü yaprak dokularına kolaylıkla girerek biriktiğı düşünölmektedir. Bitki bu durumda, toksisite semptomları göstermekte ve biyomas üretimini azaltmaktadır. Allende ve ark. (2012) yılında yaptıkları çalışmada B'un dokularda depo edilmesinin muhtemelen B ve organik maddeler arasında oluşan bağdan kaynaklandığını rapor etmişlerdir.

Sonuçlar B ile kirletilmiş sulak alanlarda *L. gibba* ve *L. minor*'ün iyi birer B akümülatörü olarak kullanılabileceğini gösteriyor. Ancak, *L. gibba* ve *L. minor* ile kirletilmiş sulak alanlarda, B birikimini önlemek için *L. gibba* ve *L. minor* büyüme yada uygulama periyodu bitiminde özellikle 4 gün sonrasında ortamdan kaldırılmalı veya hasat edilmelidir. Hasat edilen Lemnalar, hem Türkiye hem de diğer ölkelerde ağır metal kirliliğı belirlendikten sonra B eksikliği bulunan topraklarda yeşil gübre olarak kullanılabilir.

Bir ekolojik sistemin izlenmesi için bilimsel olarak değerli bir aracın geliştirilmesi kolay değildir, çünkü ekolojik sistemlerin karmaşık yapıda olması ve ekolojik göstergelerinin sınırlı sayıda olmasından dolayı bu kompleks ekosistemlerin yapısını tamamen temsil etmeyebilmektedir (Lin ve ark. 2012). Kirlenmiş sucul ortamların yönetimi için etkili ve stratejik biyomonitör ve biyoindikatör türlerin seçilmesi gerekir. Ancak, çok sayıda indikatör varlığı karar verme sürecini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, seçilen indikatör sayısının en aza indirilmesi ve tüm sistemi temsil eden türlerin seçilimi kritik bir önem taşımaktadır (Lin ve ark. 2012). Bu çalışmanın sonuçları, B ile kirlenmiş ekosistemlerde *L. gibba* ve *L. minor*'ün ekolojik birer indikatör olduğu ve bu tür alanlarda bu indikatörlerin kullanılmasının risk değerlendirme açısından çevresel stratejilere yardımcı olabileceğı düşüncesini ortaya çıkarmıştır. Ayrıca bu çalışmada elde edilen sonuçlar ve kullanılan metotlar özellikle B kirliliğinin bulunduğu alanlarda, B düzeylerinin biyolojik olarak izlenmesi veya temizlenmesi için yerel halkında kullanılabileceğı basit, etkili ve çevre dostu bir model ortaya koymuştur. Son olarak, gelecek çalışmalarla bu çevre dostu modelin yeni indikatör bitki türleri ile desteklenmesi ya da B ile kirletilmiş sular için daha etkili çevre dostu yönetim stratejileri ile geliştirilmesi gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

- Aebi, H. (1984), "Catalase in vitro," *Methods in Enzymology*, **105**, 121–126.
- Ahammed, G.J., Choudhary, S.P., Chen, S., Xia, X., Shi, K., Zhou, Y. ve Yu, J. (2013), "Role of brassinosteroids in alleviation of phenanthrene–cadmium co-contamination-induced photosynthetic inhibition and oxidative stress in tomato," *J. Exp. Bot.*, **64**, 199–213.
- Al-Ghanim, K.A., Mahboob, S., Seemab, S., Sultana, S., Sultana, T., Al-Misned, Al-Hakimi, A.M.A. (2007), "Modification of cadmium toxicity in pea seedlings by kinetin," *Plant Soil Environ.*, **53**, 129–135.
- Allende, K.L., Fletcher, T.D. ve Sun, G. (2012), "The effect of substrate media on the removal of arsenic, boron and iron from an acidic wastewater in planted column reactors," *Chem. Eng. J.*, **179**, 119–130.
- Alscher, R.G. (1989), "Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants," *Physiologia Plantarum*, **77**, 457–464.
- Anonymous (2002), "Guidelines for the testing of chemicals. *Lemna sp.* Growth Inhibition Test," Draft guideline 221.
- Anonymous. (1996), "Ecological effects test guidelines. Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna spp.*," Tiers I and II, EPA712–C–96–156.
- Antunes, S.C., Pereira, R., Marques, S.M., Castro, B.B. ve Gonçalves, F. (2011), "Impaired microbial activity caused by metal pollution: a field study in a deactivated uranium mining area," *Sci Total Environ.*, **410**, 87–95.
- Appenroth, K.J., Krech, K., Keresztes, A., Fischer, W. ve Koloczek, H. (2010), "Effects of nickel on the chloroplasts of the duckweeds *Spirodela polyrhiza* and *Lemna minor* and their possible use in biomonitoring and phytoremediation," *Chemosphere*, **78**, 216–223.
- Asada, K. ve Takahashi, M. (1987), "Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts," (In: Kyle, D.J., Osmond, C.B., Arntzen, C.J. (Eds.)), *Photoinhibition*, Elsevier, Amsterdam, 227–287.
- Babic, M., Radic, S., Cvjetko, P., Roje, V., Pevalek-Kozlina, B. ve Pavlica, M. (2009), "Antioxidative response of *Lemna minor* plants exposed to thallium(I)-acetate," *Aquatic Botany*, **91**, 166–172.

- Beauchamp, C. ve Fridovich, I. (1971), “Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels,” *Anal. Biochem. Review.*, **44**, 276-287.
- Bergek, A. ve Berggren, C. (2014), “The impact of environmental policy instruments on innovation: A review of energy and automotive industry studies,” *Ecological Economics*, **106**, 112–123.
- Bhattacharya, A., Routh, J., Jacks, G., Bhattacharya, P. ve Morth, M. (2006), “Environmental assessment of abandoned mine tailings in Adak, Vasterbotten district (Northern Sweden),” *Appl. Geochem.*, **21**, 1760-1780.
- Bilotta, G.S, Milner, A.M. ve Boyd, I. (2014), “On the use of systematic reviews to inform environmental policies,” *Environmental science & policy*, **42**, 67–77.
- Bocuk, H., Yakar, A. ve Turker, O.C. (2013), “Assessment of *Lemna gibba* L. (duckweed) as a potential ecological indicator for contaminated aquatic ecosystem by boron mine effluent,” *Ecological Indicators*, **29**, 538–548.
- Cao, X., Ma, L.Q. ve Tu, C.(2004), “Antioxidative responses to arsenic in the arsenic hyperaccumulator Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.),” *Environ. Pollut.*, **128 (3)**, 317-325.
- Cappello, T., Mauceri, A., Corsaro, C., Maisano, M., Parrino, V., Lo Paro, G., Messina, G. ve Fasulo, V. (2013), “Impact of environmental pollution on caged mussels *Mytilus galloprovincialis* using NMR-based metabolomics,” *Marine Pollution Bulletin*, **77**, 132–139.
- Cappello, T., Mauceri, A., Corsaro, C., Maisano, M., Parrino, V., Paro, G.L., Messina, G. Ve Fasulo, S. (2013), “Impact of environmental pollution on caged mussels *Mytilus galloprovincialis* using NMR-based metabolomics,” *Marine Pollution Bulletin*, **77**, 132–139.
- Cerqueira, B., Vega, F.A., Silva, L.F.O. ve Andrade, L. (2012), “Effects of vegetation on chemical and mineralogical characteristics of soils developed on a decantation bank from a copper mine,” *Sci Total Environ.*, **421**, 220–229.
- Chang, J.-S., Yoon, I.-H. ve Kim, K.-W. (2009), “Heavy metal and arsenic accumulating fern species as potential ecological indicators in As-contaminated abandoned mines,” *Ecol. Indic.*, **9**, 1275–1279.

- Chang, J.-S., Yoon, I.-H. ve Kim, K.-W. (2009), “Heavy metal and arsenic accumulating fern species as potential ecological indicators in As-contaminated abandoned mines,” *Ecol. Indic.*, **9**, 1275–1279.
- Coller-Myburgh, C., Rensburg, L. ve Maboeta, M. (2014), “Utilizing earthworm and microbial assays to assess the ecotoxicity of chromium mine wastes,” *Applied Soil Ecology*, **83**, 258–265.
- Costanza, V. ve Neuman, C.E. (1997), “Managing cattle grazing under degraded forests: An optimal control approach,” *Ecological Economics*, **21**, 123-139.
- Criscuolo, C. ve Menon, C. (2015), “Environmental policies and risk finance in the green sector: Cross-country evidence,” *Energy Policy*, **83**, 38–56.
- Dai, J., Chen, R., Meng, X., Yang, C., Zhao, Z. ve Kan, H. (2015), “Ambient air pollution, temperature and out-of-hospital coronary deaths in Shanghai, China,” *Environmental Pollution*, **203**, 116-121.
- Davis, S.M., Drake, K.D. ve Maier, K.J. (2002), “Toxicity of boron to the duckweed, *Spirodella polyrrhiza*,” *Chemosphere*, **48**, 615–620.
- Demirezen, D., Aksoy, A. ve Uruc, K.(2007), “Effect of population density on growth, biomass and nickel accumulation capacity of *Lemna gibba* (Lemnaceae),” *Chemosphere*, **66**, 553–557.
- Dominicis, S.D., Fornara, F., Cancellieri, U.G., Twigger-Ross, C. ve Bonaiuto, M. (2015), “We are at risk, and so what? Place attachment, environmental risk perceptions and preventive coping behaviours,” *Journal of Environmental Psychology*, **43**, 66-78.
- Doorna, W.G.V. ve Ketsab, S. (2014), “Cross reactivity between ascorbate peroxidase and phenol (guaiacol) peroxidase,” *Postharvest Biology and Technology*, **95**, 64–69.
- Doran, P.M. (2009), “Application of plant tissue cultures in phytoremediation research: incentives and limitations,” *Biotechnol. Bioeng.*, **103**, 60–76.
- Driever, S.M., Van Nes, E.H. ve Roijackers, R.M.M. (2005), “Groth limitation of *Lemna minor* due to high plant density,” *Aquat. Bot.*, **81**, 245–251.



- Eraslan, F., Inal, A., Gunes, A. ve Alpaslan, M. (2007), “Impact of exogenous salicylic acid on the growth, antioxidant activity and physiology of carrot plants subjected to combined salinity and boron toxicity,” *Scientia Horticulturae*, **113**, 120–128.
- Eraslan, F., Inal, A., Savasturk, O. ve Gunes, A. (2007), “Changes in antioxidative system and membrane damage of lettuce in response to salinity and boron toxicity,” *Scientia Horticulturae*, **114**, 5–10.
- F. ve Ahmed, Z. (2015), “Monitoring of trace metals in tissues of Wallago attu (lanchi) from the Indus River as an indicator of environmental pollution,” *Saudi Journal of Biological Sciences*.
- Fatima, R.A. ve Ahmad, M. (2005), “Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater,” *Sci.Total Environ.*, **346**, 256–273.
- Foyer, C.H. ve Noctor, G. (2003), “Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria,” *Physiol. Plant.*, **119**, 355–364.
- Frederic, M., Samir, L., Louise, M. ve Abdelkrim, A. (2006), “Comprehensive modeling of mat density effect on duckweed (*Lemna minor*) growth under controlled eutrophication,” *Water Res.*, **40**, 2901–2910.
- Frick, H. (1985), “Boron tolerance and accumulation in the duckweed, *Lemna minor*” *J. Plant Nutr.*, **8**, 1123–1129.
- Frick, H. (1985), “Boron tolerance and accumulation in the duckweed, *Lemna minor*,” *J. Plant Nutr.*, **8** (12), 1123–1129.
- Fridovich, I. (1986), “Biological effects of the superoxide radical,” *Arch. Biochem. Biophys.*, **247**, 1–11.
- Frouz, J., Hrcakova, K., Lana J., Kristufek, V., Mudrak, O. ve Lukesova, A. (2011), “Can laboratory toxicity tests explain the pattern of field communities of algae, plants, and invertebrates along a toxicity gradient of post-mining sites?,” *Appl Soil Ecol.*, **51**, 114–21.
- Gangwar, S., Singh, V.P., Prasad, S.M. ve Maurya, J.N. (2010), “Modulation of manganese toxicity in *Pisum sativum* L. seedlings by kinetin,” *Sci. Hortic.*, **126**, 464–476.

- Garcia-Gomez, C., Sanchez-Pardo, B., Esteban, E., Penalosa, J.M. ve Fernandez, M.D. (2014), “Risk assessment of an abandoned pyrite mine in Spain based on direct toxicity assays,” *Science of the Total Environment*, **470–471**, 390–399.
- Gill, S.S. ve Tuteja, N. (2010), “Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants,” *Plant Physiol. Biochem.*, **48**, 909–930.
- Glandon, R.P. ve McNabb, C.D.(1978), “The uptake of boron by *Lemna minor*,” *Aquat. Bot.*, **4**, 53–64.
- Han, S., Tang, N., Jiang, H-X., Yang, L.T., Lee, Y. ve Chen, L.S. (2009) “CO<sub>2</sub> assimilation, photosystem II photochemistry, carbohydrate metabolism and antioxidant system of citrus leaves in response to boron stress,” *Plant Science*, **176**, 143–153.
- Hanif, M.A., Nadeem, R., Bhatti, H.N., Rashid, N., Ahmad, N.R.ve Ansari, T.M. (2007), “Ni(II) biosorption by *Cassia fistula* (Golden Shower) biomass,” *J. Hazard. Mater.*, **139**, 345-355.
- Hayat, S., Alyemeni, M.N. ve Hasan, S.A. (2012), “Foliar spray of brassinosteroid enhances yield and quality of *Solanum lycopersicum* under cadmium stress,” *Saudi J. Biol.Sci.*, **19**, 325–335.
- Henke, R., Eberiusb, M. ve Appenroth, K.J. (2011), “Induction of frond abscission by metals and other toxic compounds in *Lemna minor*,” *Aquat. Toxicol.* **101**, 261–265.
- Holm, G. (1954), “Chlorophyll mutations in barley,” *Acta Agric. Scand.*, **4**, 457-461.
- Horvat, T., Vidakovic-Cifrek, Z., Orescanin, V., Tkalec, M. ve Pevalek-Kozlina, B. (2007), “Toxicity assessment of heavy metal mixtures by *Lemna minor* L.,” *Sci. Total Environ.*, **384**, 229–238.
- Hou, W., Chen, X., Song, G., Wang, Q. ve Chang, C.C. (2007), “Effect of copper and cadmium on heavy metal polluted water body restoration by duckweed (*Lemna minor*),” *Plant Physiol. Biochem.*, **45**, 62–69.

- Jorgensen, S.E., Costanza, R. ve Xu, F.L. (2005), “*Handbook Ecological Indicators for Assessment of Ecosystem Health.*” CRC Press Tay & Francis Group, Boca Raton, FL, USA, 6–66.
- Kadlec, R.H. ve Bevis, F.B. (2009), “Wastewater treatment at the Houghton Lake wetland: vegetation response,” *Ecol. Eng.*, **35**, 1312–1332.
- Kapusta, P., Szarek-Lukaszewska, G. ve Stefanowicz, A.M. (2011), “Direct and indirect effects of metal contamination on soil biota in a Zn–Pb post-mining and smelting area (S Poland),” *Environ Pollut.*, **159**, 1516–1522.
- Katircioğlu, (2014), “Testing the tourism-induced EKC hypothesis: The case of Singapore,” *Economic Modelling*, **41**, 383–391.
- Kaur1, L., Gadgil, K. ve Sharma, S. (2012), “Role Of pH In The Accumulation Of Lead And Nickel By Common Duckweed (*Lemna minor*),” *International Journal of Bioassays*, **01 (12)**, 191-195.
- Khellaf, K. ve Zerdaoui, M.(2010), “Growth response of the duckweed *Lemna gibba* L. to copper and nickel phytoaccumulation,” *Ecotoxicology*, **19**, 1363–1368.
- Koldemir, Ő.E. ve Tükel, S.S. (2012), “Arabidopsis thaliana bitkisinde sitokinin sinyal yollarında görev alan AHP1 proteinine karşı monoklonal antikorların üretimi, seçimi ve karakterizasyonu,” *Ç.Ü Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, Cilt:27-4.
- Landia, M., Pardossia, A., Remorinib, D. ve Guidi, L. (2013), “Antioxidant and photosynthetic response of a purple-leaved and a green-leaved cultivar of sweet basil (*Ocimum basilicum*) to boron excess,” *Environmental and Experimental Botany*, **85**, 64– 75.
- Latu, K., Malano, H.M., Costelloe, J.F. ve Peterson, T.J. (2014), “Estimation of the environmental risk of regulated river flow,” *Journal of Hydrology*, **517**, 74–82.
- Lesley, B., Daniel, H. ve Paul, Y. (2008), “Iron and manganese removal in wetland treatment systems: rates, processes and implications for management,” *Sci. Total Environ.*, **394**, 1–8.

- Li, Z., Ma, Z., Kuijp, T.J.V.D., Yuan, Z. ve Huang, L. (2014), “A review of soil heavy metal pollution from mines in China: Pollution and health risk assessment,” *Science of the Total Environment*, **468–469**, 843–853.
- Lin, J., Lin, T. ve Cui, S. (2012), “Quantitative selection model of ecological indicators and its solving method,” *Ecol. Indic.*, **13**, 294–302.
- Lodeiro, P, Barriada, J.L., Herrero, R. ve Sastre de Vicente, M.E. (2006), “The marine macroalga *Cystoseira baccata* as biosorbent for cadmium(II) and lead(II) removal: kinetic and equilibrium studies,” *Environ. Pollut.*, **142**, 264-273.
- Luptakova, A., Ubaldini, S., Macingova, E., Fornari, P. ve Giuliano, V. (2012), “Application of physicochemical and biochemical methods for heavy metals removal from acid mine drainage,” *Process Biochem.*, **47**, 1633-1639.
- Marin, C.M.D.C. ve Oron, G. (2007), “Boron removal by the duckweed *Lemna gibba*: a potential method for the remediation of boron-polluted waters,” *Water Res.*, **41**, 4579–4584.
- Marrs, K.A. (1996), “The function and regulation of glutathione-S-transferases in plants,” *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **47**, 127–158.
- Mehlhorn, H., Lelandais, M., Korth, H.G. ve Foyer, C.H. (1996), “Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidase,” *Febs Lett.*, **378**, 203–206.
- Meier, R., Schindler, C., Eeftens, M., Aguilera, I., Ducret-Stich, R.E., Ineichen, A., Davey, M., Phuleria, H.C., Probst-Hensch, N., Tsai, M.Y. ve Künzli, N. (2015), “Modeling indoor air pollution of outdoor origin in homes of Sapaldia subjects in Switzerland,” *Environment International*, **82**, 85–91.
- Mittler, R. (2002), “Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance,” *Trends Plant Sci.*, **7**, 405–410.
- Mkandawire, M. ve Dudel, E.G. (2005), “Accumulation of arsenic in *Lemna gibba* L. (duckweed) in tailing waters of two abandoned uranium mining sites in Saxony, Germany,” *Sci. Total Environ.*, **336**, 81–89.
- Mkandawire, M. ve Dudel, E.G. (2007), “Are *Lemna* spp. effective phyto remediation agents?,” *Biorem. Biodiv. Bioaval.*, **1 (1)**, 56–71.

- Nakano, Y. ve Asada, K. (1981), “Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts,” *Plant Cell Physiol.*, **22**, 867-880.
- Naumann, B., Eberius, M. ve Appenroth, K.J. (2007), “Growth rate based dose response relationships and EC-values of ten heavy metals using the duckweed growth inhibition test (ISO 20079) with *Lemna minor* L. clone,” *St. J. Plant Physiol.*, **164**, 1656–1664.
- Navari-Izzo, F., Meneguzzo, S., Loggini, B., Vazzana, C. ve Sgherri, C.L.M. (1997), “The role of the glutathione system during dehydration of *Boea hygropetrica*,” *Physiol. Plant*, **99**, 23–30.
- Njambuya, J., Stiers, I. ve Triest, L. (2011), “Competition between *Lemna minuta* and *Lemna minor* at different nutrient concentrations,” *Aquat. Bot.*, **94**, 158–164.
- Ojoawo, O.S., Udayakumar G. ve Naik, P. (2015), “Phytoremediation of phosphorus and nitrogen with *Canna x generalis* reeds in domestic wastewater through NMAMIT Constructed Wetland,” *Aquatic Procedia*, **4**, 349 – 356.
- Pan, L. ve Zhou, Y. (2013), “International factor mobility, environmental pollution and skilled–unskilled wage inequality in developing countries,” *Economic Modelling*, **33**, 826–831.
- Papadakis, I.E., Dimassi, K.N., Bosabalidis, A.M., Theorios, I.N., Patakas, A. ve Giannakoula, A. (2004a), “Effects of B excess on some physiological and anatomical parameters of ‘Novelina’ orange plants grafted on two rootstocks,” *Environmental and Experimental Botany*, **51**, 247–257.
- Papadakis, I.E., Dimassi, K.N., Bosabalidis, A.M., Theorios, I.N., Patakas, A. ve Giannakoula, A. (2004b), “Boron toxicity in ‘Clementine’ mandarin plants grafted on two rootstocks,” *Plant Science*, **166**, 539–547.
- Parlak, K.U., ve Yilmaz, D.D. (2012), “Response of antioxidant defences to Zn stress in three duckweed species,” *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **85**, 52–58.

- Peresa, G., Vandenbulcke, F., Guernion, M., Hedde, M., Beguiristain, T., Douay, F., Houot, S., Piron, D., Richard, A., Bispo, A., Grand, C., Galsomies, L. ve Cluzeau, D. (2011), "Earthworm indicators as tools for soil monitoring, characterization and risk assessment. An example from the national Bioindicator programme (France)," *Pedobiologia*, **54**, 77–87.
- Pinedo, J., Ibanez, R., Lijzen, J.P.A. ve Irabien, A. (2013), "Assessment of soil pollution based on total petroleum hydrocarbons and individual oil substances," *Journal of Environmental Management*, **130**, 72-79.
- Porra, R. J., Thompson, W. A. ve Kriedelman, P. E. (1989), "Determination of accurate extraction and simultaneously equation for assaying chlorophyll a and b extracted with different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standarts by atomic absorption spectroscopy," *Biochim. Biophys. Acta*, **975**, 384-394.
- Prasad, K.V.S.K., Saradhi, P. ve Sharmila, P. (1999), "Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growt hunder zinc toxicity in *Brassica juncea*," *Environ. Exp. Bot.*, **42**,1–10.
- Prasad, M.N.V., *Aquatic plants for phytotechnology, Environmental Bioremediation Technologies*, SINGH S.N., TRIPATHI R.D. (eds.), Springer, Berlin–Heidelberg, 2007.
- Prasad, M.N.V., Malek, P., Waloszek, A., Bojko, M. ve Strazalka, K. (2001), "Physiological responses of *Lemna trisulca* L. (duckweed) to cadmium and copper accumulation," *Plant.Sci.*, **161**, 881–889.
- Qian, H., Li, J., Sun, L., Chen, W., Sheng, G.D., Liu, W. ve Fu, Z. (2009), "Combined effect of copper and cadmium on *Chlorella vulgaris* growth and photosynthesis-related gene transcription," *Aquat. Toxicol.*, **94**, 56–61.
- Qian, J.H., Zayed, A., Zhu, Y.L., Yu, M.Y. ve Terry, N. (1999), "Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: III. Uptake and accumulation of ten trace elements by twelve plant species," *J. Environ. Qual.*, **28**, 1448–1455.
- Radic, S., Stipanicev, D., Cvjetko, P., Sirac, S., Pevalek-Kozlina, B. ve Pavlica, M.(2011), "Duckweed *Lemna minor* as a tool for testing toxicity and genotoxicity of surface waters," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **74**, 182–187.

- Ramila, C.D.P., Leiva, E.D., Bonilla, C.A., Pasten, P.A. ve Pizarro, G.E. (2015), “Boron accumulation in *Puccinellia frigida*, an extremely tolerant and promising species for boron phytoremediation,” *Journal of Geochemical Exploration*, **150**, 25–34.
- Rasilainen, K., Eilu, P., Halkoaho, T., Iljina ve M., Karinen, T. (2010), “Quantitative mineral resource assessment of undiscovered PGE resources in Finland,” *Ore. Geol. Rev.*, **38**, 270–287.
- Razinger, J., Dermastia, M., Drinovec, L., Drobne, D., Zrimec, A. ve Koce, J.D. (2006), “Antioxidative Responses of Duckweed (*Lemna minor* L.) to Short-Term Copper Exposure,” *Environ Sci Pollut Res*, **8**, 1-8.
- Razinger, J., Dermastia, M., Koce, J.D. ve Zrimec, A. (2008), “Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) caused by short-term cadmium exposure,” *Environmental Pollution*, **153**, 3, 687–694.
- Ribeiro, J., Taffarel, S.R., Sampaio, C.H., Flores, D. ve Silva, L.F.O. (2013), “Mineral speciation and fate of some hazardous contaminants in coal waste pile from anthracite mining in Portugal,” *Int J Coal Geol.*, **109**, 15–23.
- Rodríguez, D., Becker, C.G., Pupin, N.C., Haddad, C.F.B. ve Zamudio, K.R. (2014), “Long-term endemism of two highly divergent lineages of the amphibian-killing fungus in the Atlantic Forest of Brazil,” *Molecular Ecology*, **23**, 774–787.
- Roxas, V.P., Lodhi, S.A., Garrett, D.K., Mahan, J.R. ve Allen, R.D. (2000), “Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that over express glutathione S-transferase/ glutathione peroxidase,” *Plant Cell Physiol.*, **41**, 1229–1234.
- Sarma, H. (2011), “Metal hyperaccumulation in plants: a review focusing on phytoremediation technology,” *J. Environ. Sci. Technol.*, **4**, 118–138.
- Sgherri, C.L.M., Liggini, B., Puliga, S. ve Navari-Izzo, F. (1994), “Antioxidant system in *Sporobolus stapfianus*: changes in response to desiccation and rehydration,” *Phytochemistry*, **35**, 561–565.
- Sharma, P. ve Dubey, R.S. (2007), “Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum,” *Plant Cell Rep.*, **26**, 2027–2038.

- Sharma, S.S. ve Dietz, K.J., (2009), “The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance,” *Trends Plant Sci.*, **14**, 43–50.
- Singh, N., Ma, L.Q., Srivastava, M. ve Rathinasabapathi, B. (2006), “Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L. and *Pteris ensiformis* L.,” *Plant Sci.*, **170** (2), 274–282.
- Singh, S. ve Prasad, S.M. (2014), “Growth, photosynthesis and oxidative responses of *Solanum melongena* L. seedlings to cadmium stress: Mechanism of toxicity amelioration by kinetin,” *Scientia Horticulturae*, **176**, 1–10.
- Skevas, T., Stefanou, S.E. ve Lansink, A.O. (2014), “Pesticide use, environmental spillovers and efficiency: A DEA risk-adjusted efficiency approach applied to Dutch arable farming,” *European Journal of Operational Research*, **237**, 658–664.
- Stout, L.M., Dodova, E.N., Tyson, J.F. ve Nusslein, K. (2010), “Phytoprotective influence of bacteria on growth and cadmium accumulation in the aquatic plant *Lemna minor*,” *Water Res.*, **44**, 4970–4979.
- Tanaka, M. ve Fujiwara, T. (2008), “Physiological roles and transport mechanisms of boron: perspectives from plants,” *Eur. J. Physiol.*, **456**, 671–677.
- Tatar, Ş.Y. ve Öbek, E. (2014), “Potential of *Lemna gibba* L. and *Lemna minor* L. for accumulation of Boron from secondary effluents,” *Ecological Engineering*, **70**, 332–336.
- Ture, C., Bell, R.W. (2004), “Plant distribution and its relationship to extractable boron in naturally-occurring high boron soils in Turkey,” *Isr. J. Plant Sci.*, **52**, 125–132.
- Turnhout, E., Hisschemoller, M. ve Eijsackers, H. (2007), “Ecological indicators: between the two fires of science and policy,” *Ecol. Indic.*, **7**, 215–228.
- Vackar, D., Brink, B., Loh, J., Baillie, J.E.M. ve Reyers, B. (2012), “Review of multispecies indices for monitoring human impacts on biodiversity,” *Ecol. Indic.*, **17**, 58–67.
- Vallner, L., Gavriloova, O. ve Vilu, R. (2015), “Environmental risks and problems of the optimal management of an oil shale semi-coke and ash landfill in Kohtla-Järve, Estonia,” *Science of the Total Environment*, **524–525**, 400–415.



- Verma, S. ve Dubey, R.S. (2003), “Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants,” *Plant Sci.*, **164**, 645–655.
- Voelker, D., Schlich, K., Hohndorf, L., Koch, W., Kuehnen, U., Polleichtner, C., Kussatz, C. ve Hund-Rinke, (2015), “K. Approach on environmental risk assessment of nanosilver released from textiles,” *Environmental Research*, **140**, 661–672.
- Wakelin, S., Gerard, E., Black, A., Hamonts, K., Condrón, L., Yuan, T., Nostrand, J.V., Zhou, J. ve O’Callaghan, M. (2014), “Mechanisms of pollution induced community tolerance in a soil microbial community exposed to Cu,” *Environmental Pollution*, **190**, 1-9.
- Wang, J.Z., Tao, S.T., Qi, K.J., Wu, J., Wu, H.Q. ve Zhang, S.L. (2011), “Changes in photosynthetic and antioxidative system of pear leaves to boron toxicity,” *African Journal of Biotechnology*, **10**, 19693–19700.
- Wei, B. ve Yang, L. (2014), “A review of heavy metal contaminations in urban soils, urban road dusts and agricultural soils from China,” *Microchemical Journal*, **94**, 99–107.
- Wei, S., Ma, L.Q., Saha, U., Mathews, S., Sundaram, S., Rathinasabapathi, B. ve Zhou, Q. (2010), “Sulfate and glutathione enhanced arsenic accumulation by arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L.,” *Environ. Pollut.*, **158** (5), 1530-1535.
- Yang, C., Chang K., Yin, M. ve Huang, H. (1998), “Methods for the determination of the chlorophylls and their derivatives,” *Taiwania*, **43**, **2**, 116-122.
- Yılmaz, D. ve Parlak, K. (2011) , “Changes in proline accumulation and antioxidative enzyme activities in *Groenlandia densa* under cadmium stress,” *Ecological Indicators*, **11**, 417–423.