

**T.C.  
ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

***Chara contraria*'DA TRİBENURON METİL TOKSİSİTESİNE  
KARŞI FARKLI AMONYAK DERİŞİMLERİNİN ETKİSİNİN  
İNCELENMESİ**

**BARIŞ TANRIVERDİ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ADYAMAN, 2020**

**T.C.**  
**ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Chara contraria*'DA TRIBENURON METİL TOKSİSİTESİNE KARŞI  
FARKLI AMONYAK DERİŞİMLERİNİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**Barış TANRIVERDİ**

**Doktora Tezi**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Hidrobiyoloji Bilim Dalı**

Bu tez 19/06/2020 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından  
oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

**Prof. Dr. E. Rıdvan SIVACI**  
**Danışman**

**Prof. Dr. Yusuf SEVGİLER**  
**Üye**

**Prof. Dr. Abuzer ÇELEKLİ**  
**Üye**

**Doç. Dr. Rıza BİNZET**  
**Üye**

**Dr. Öğr. Üyesi Mustafa GÖÇER**  
**Üye**

**Doç. Dr. Tayfun SERVİ**  
**Enstitü Müdürü**

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu'ndaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

### Doktora Tezi

#### ***Chara contraria*'DA TRIBENURON METİL TOKSİSİTESİNE KARŞI FARKLI AMONYAK DERİŞİMLERİNİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

#### **Barış TANRIVERDİ**

Adıyaman Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. E. Rıdvan SIVACI  
Yıl : 2020, Sayfa sayısı: 113+XIII

Jüri : Prof. Dr. Yusuf SEVGİLER  
: Prof. Dr. Abuzer ÇELEKLİ  
: Doç. Dr. Rıza BİNZET  
: Dr. Öğr. Üyesi Mustafa GÖÇER

Farklı amonyak derişimleri, tribenuron metil herbisiti ve bunların karışımlarının, *Chara contraria*'da enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar, TBARS ve protein miktarları üzerine subakut etkileri araştırılmıştır. Bu doğrultuda, makrofit, 14 gün süre ile amonyağın farklı derişimlerinin ayrı ya da herbisit ile karışımının etkisinde bırakılmıştır. APx, DHAR, GPx ve GST enzim aktiviteleri ile T-SH, NP-SH, PB-SH, TBARS ve protein düzeyleri spektrofotometrik olarak analiz edilmiştir. APx aktivitesi tüm uygulama gruplarında kontrole göre artış gösterirken, DHAR ve GPx aktiviteleri azalmıştır. GST enzim aktivitesi herbisit, düşük amonyak derişimi ve bu derişimin herbisitle kombinasyonu olan gruplarda kontrole göre azalmıştır. Ancak, yüksek amonyak derişimi ve bu derişimin herbisitle birlikte uygulandığı gruplarda artmıştır. T-SH ve PB-SH miktarları, tribenuron metil ve yüksek derişim amonyağın herbisitle karışımı olan gruplarda kontrole göre değişmemiştir. Fakat düşük amonyak derişimi, bu derişimin herbisitle birlikte verildiği grup ve yüksek amonyak derişim grubunda artmıştır. NP-SH miktarları hiçbir grupta değişim göstermemiştir. TBARS düzeyleri, bütün uygulama gruplarında kontrole kıyasla azalmıştır. Protein miktarı, düşük amonyak derişimi ve herbisit karışımı olan gruplarda artmıştır. Sonuçlarımıza göre, *C. contraria*'da APx ve GPx enzim aktiviteleri ile TBARS ve tiyol düzeyleri amonyak, tribenuron metil herbisiti ve bunların karışımları için biyomarkır olarak kullanılabilirler.

**Anahtar kelimeler:** Antioksidan; Biyomarkır; Tribenuron metil; Amonyak; *Chara contraria*

## ABSTRACT

### Ph.D. Thesis

**INVESTIGATION of the EFFECTS of DIFFERENT AMMONIA  
CONCENTRATIONS on TRIBENURON METHYL TOXICITY in  
*Chara contraria***

**Barış TANRIVERDİ**

Adiyaman University  
Institute of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. E. Rıdvan SIVACI  
Year : 2020, Number of pages: 113+XIII

Jury : Prof. Dr. Yusuf SEVGİLER  
: Prof. Dr. Abuzer ÇELEKLİ  
: Assoc. Prof. Dr. Rıza BİNZET  
: Asst. Prof. Dr. Mustafa GÖÇER

Subacute effects of different ammonia concentrations, tribenuron methyl herbicide, and their combinations on enzymatic and non-enzymatic antioxidants, TBARS, and protein contents in *Chara contraria* were investigated. Accordingly, the macrophyte was exposed to different ammonia concentrations alone or combined with the herbicide for 14 days. Enzyme activities of APx, DHAR, GPx, and GST and T-SH, NP-SH, PB-SH, TBARS, and protein levels were analyzed spectrophotometrically. While APx activity increased in all exposure groups compared to the control, DHAR and GPx activities decreased. GST enzyme activity decreased groups with herbicide, low ammonia concentration, and their combinations compared to the control. However, it increased in all the groups that contain the high ammonia concentration. Levels of T-SH and PB-SH did not change with respect to control in groups that they were mixed with tribenuron methyl and high concentration ammonia with herbicide. However, the low ammonia concentration increased in the group in which this concentration was given with the herbicide and high ammonia concentration group. NP-SH amounts did not change in any group. TBARS levels decreased in all the exposure groups compared to control. Protein amount increased in the low ammonia concentration group and all the herbicide combination groups. According to our results, APx and GPx activities and TBARS and thiol levels can be used as a biomarker for ammonia, tribenuron methyl and their combinations in *C. contraria*.

**Keywords:** Antioxidant; Biomarker; Tribenuron methyl; Ammonia; *Chara contraria*

## **DESTEKLER**

Bu tez çalışması Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FEFDP/2018-0001 numaralı proje ile desteklenmiştir.

## BEYAN

“*Chara contraria*’DA TRİBENURON METİL TOKSİSİTESİNE KARŞI FARKLI AMONYAK DERİŞİMLERİNİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ” başlıklı tezimde çalışmaların tamamen akademik kurallara ve etik değerlere sadık kalınarak yürütüldüğünü ve yazımda yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu ayrıca alıntılardan bilimsel etiğe uygun atıf yaparak yararlanmış olduğumu beyan ederim.

Bariş TANRIVERDİ  
imza

## TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. E. Rıdvan SIVACI'ya, tezin yazımında değerli katkılarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Abuzer ÇELEKLİ'ye, Sayın Doç. Dr. Rıza BİNZET'e, Sayın Dr. Öğr. Üyesi. Mustafa GÖÇER'e ve Sayın Prof. Dr. Yusuf SEVGİLER'e, Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi çalışanlarına, okul müdürüm Sayın Abdulkerim IŞIK'a, manevi olarak her zaman yanımda olan değerli eőim Hatice ve çocuklarım Mehmet Berk ve Çağan Mert TANRIVERDİ'ye, Biyoloji Öğretmeni Mehmet SERTBAŐ'a teőekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
DESTEKLER.....	III
BEYAN.....	IV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
RESİMLER DİZİNİ.....	X
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XI
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Antropojenik Su Kirliliği.....	3
1.2 Doğal Kirlilik.....	4
1.3 Suyun Verimliliği.....	6
1.4 Su ve Pestisitler.....	7
1.5 Enzimatik Antioksidanlar.....	11
1.5.1. Askorbat Peroksidaz (APx).....	12
1.5.2. Dehidroaskorbat Redüktaz (DHAR).....	14
1.5.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx).....	16
1.5.4. Glutasyon S-transferaz (GST).....	17
1.6 Total Tiyol (T-SH), Non Protein Tiyol (NP-SH) ve Protein Bağlı Tiyol (PB-SH).....	20
1.7 Lipit Peroksidasyonu (LPO).....	24
1.8 <i>Chara contraria</i> (Linnaeus, 1753)'nin Genel Özellikleri.....	26
1.9 Çalışmanın Amacı.....	31
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	32
2.1. Bitkilerde Antioksidanların Çeşitli Ksenobiyotiklere Yanıtı.....	37
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	39
3.1. Materyal.....	39
3.1.1. Stok Tribenuron Metil Çözeltisinin Hazırlanması.....	41
3.1.2. Kimyasal Maddeler.....	41
3.1.3. Cihazlar ve Diğer Gereçler.....	43
3.2. Yöntem.....	44
3.2.1. <i>C. contraria</i> Örneklerinin Hazırlanması.....	44
3.2.2. Toksikite Denemeleri.....	45
3.2.3. Biyokimyasal Analizler.....	50
3.2.3.1. Askorbat Peroksidaz (APx) Aktivitesi.....	50
3.2.3.2. Dehidroaskorbat Redüktaz (DHAR) Aktivitesi.....	52
3.2.3.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesi.....	53
3.2.3.4. Glutasyon S-transferaz (GST) Aktivitesi.....	55
3.2.3.5. Total Tiyol, Non-Protein Tiyol, Protein Bağlı Tiyol.....	56
3.2.3.5.1. Total Tiyol (T-SH).....	57



3.2.3.5.2. Non Protein Tiyol (NP-SH) ve Protein Bağlı Tiyol (PB-SH) ..	58
3.2.3.6. Tiyobarbiturik Asit Reaktif Maddeleri Miktarı (TBARS).....	58
3.2.3.7. Protein Yöntemi.....	60
3.2.4. İstatistiksel Analiz.....	61
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	63
4.1. BULGULAR .....	63
4.1.1. Tribenuron Metil ve Farklı Amonyak Derişimlerinin Etkisindeki <i>C. contraria</i> 'da Antioksidan Enzim Aktiviteleri .....	63
4.1.1.1. APx Enzim Aktivitesi .....	63
4.1.1.2. DHAR Enzim Aktivitesi.....	67
4.1.1.3. GPx Enzim Aktivitesi .....	68
4.1.1.4. GST Enzim Aktivitesi.....	69
4.1.2. <i>C. contraria</i> 'da Antioksidan Tiyol Miktarındaki Değişimler .....	70
4.1.2.1. Total Tiyol (T-SH) Düzeyi .....	70
4.1.2.2. Non Protein Tiyol (NP-SH) Düzeyi.....	72
4.1.2.3. Protein Bağlı Tiyol (PB-SH) Düzeyi .....	72
4.1.3. Tribenuron Metil ve Amonyagin Farklı Derişimlerinin <i>C. contraria</i> 'da TBARS Miktarı Üzerine Etkileri .....	73
4.1.4. Protein Düzeyi.....	74
4.2. TARTIŞMA.....	76
5. SONUÇ ve ÖNERİLER .....	92
KAYNAKLAR .....	95
KİŞİSEL BİLGİLER.....	113

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 MBL besi ortamı .....	40
Çizelge 3.2 Askorbat peroksidaz yöntemi .....	51
Çizelge 3.3 Dehidroaskorbat redüktaz yöntemi .....	52
Çizelge 3.4 Glutasyon peroksidaz yöntemi .....	54
Çizelge 3.5 Glutasyon S-transferaz yöntemi .....	56
Çizelge 4.1 Tribenuron metil ve farklı amonyak derişimlerinin etkisindeki <i>C. contraria</i> enzim aktiviteleleri .....	65
Çizelge 4.2 <i>C. contraria</i> 'da enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar, TBARS ve protein düzeyleri arasındaki ilişkiler .....	66
Çizelge 4.3 Tribenuron metil ve farklı amonyak derişimlerinin etkisindeki <i>C. contraria</i> 'da T-SH, NP-SH, PB-SH, TBARS ve protein miktarlarındaki değişim .....	71

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Tribenuron metilin kimyasal yapısı .....	8
Şekil 1.2 Tribenuron metilin yan ürünleri.....	9
Şekil 1.3 Abiyotik stres kaynaklı ROT üretimi ve hücre ölümü.....	10
Şekil 1.4 Oksidatif stres .....	12
Şekil 1.5 Yüksek yapılı bitkilerde ROT'ların elimine edilme yolları .....	14
Şekil 1.6 GST alt birimlerinin yapılarının şerit gösterimleri .....	18
Şekil 1.7 <i>Arabidopsis</i> spp.ve diğer bitki GST'leri için yapılan isimlendirme modeli	19
Şekil 1.8 Bitkilerde abiyotik stres toleransında tiyollerin rollerine genel bakış .....	21
Şekil 1.9 Trx ve Grx'in indirgeyici mekanizmaları .....	24
Şekil 1.10 ROT kaynaklı hücre zarı lipit peroksidasyon durumları.....	25
Şekil 3.1 Tiyol standart grafiği .....	57
Şekil 3.2 TBARS standart grafiği .....	59
Şekil 3.3 Protein standart grafiği.....	61
Şekil 4.1 Farklı amonyak derişimleri ve tribenuron metil etkisindeki <i>C. contraria</i> 'da APx enzim aktivitesinin kontrole göre yüzde değişimi .....	64
Şekil 4.2 Farklı amonyak derişimleri ve tribenuron metil etkisindeki <i>C. contraria</i> 'da DHAR enzim aktivitesinin kontrole göre yüzde değişimi .....	67
Şekil 4.3 Farklı amonyak derişimleri ve tribenuron metil etkisindeki <i>C. contraria</i> 'da GPx enzim aktivitesinin kontrole göre yüzde değişimi .....	68
Şekil 4.4 Farklı amonyak derişimleri ve tribenuron metil etkisindeki <i>C. contraria</i> 'da GST enzim aktivitesinin kontrole göre yüzde değişimi.....	69
Şekil 4.5 Farklı amonyak derişimleri ve tribenuron metil etkisindeki <i>C. contraria</i> 'da T-SH miktarının kontrole göre yüzde değişimi .....	70
Şekil 4.6 Farklı amonyak derişimleri ve tribenuron metil etkisindeki <i>C. contraria</i> 'da NP-SH miktarının kontrole göre yüzde değişimi.....	72
Şekil 4.7 Farklı amonyak derişimleri ve tribenuron metil etkisindeki <i>C. contraria</i> 'da PB-SH miktarının kontrole göre yüzde değişimi.....	73
Şekil 4.8 Farklı amonyak derişimleri ve tribenuron metil etkisindeki <i>C. contraria</i> 'da TBARS miktarının kontrole göre yüzde değişimi .....	74
Şekil 4.9 Farklı amonyak derişimleri ve tribenuron metil etkisindeki <i>C. contraria</i> 'da protein miktarının kontrole göre yüzde değişimi.....	75

## RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.1 Charales ordosunun morfolojik özellikleri .....	28
Resim 1.2 Anteridiaların stereo binoküler mikroskop görüntüsü .....	29
Resim 1.3 <i>C. contraria</i> 'nın genel görüntüsü ve kalsiyum karbonat absorbe eden korteks tüpleri .....	30
Resim 3.1 <i>C. contraria</i> örneklerinin alındığı havuz .....	39
Resim 3.2 <i>C. contraria</i> 'nın habitatındaki görüntüsü .....	39
Resim 3.3 MBL besi ortamında <i>C. contraria</i> inkübasyonu .....	41
Resim 3.4 MBL çözeltisindeki kontrol grubu <i>C. contraria</i> örnekleri.....	46
Resim 3.5 0.81 µg/L tribenuron metil çözeltisindeki <i>C. contraria</i> örnekleri .....	46
Resim 3.6 0.65 mg/L amonyak derişimi etkisindeki <i>C. contraria</i> örnekleri .....	47
Resim 3.7 0.65 mg/L NH <sub>3</sub> derişimi ve 0.81 µg/L tribenuron metil karışımının etkisindeki <i>C. contraria</i> örnekleri .....	48
Resim 3.8 1.61 mg/L NH <sub>3</sub> derişimi etkisindeki <i>C. contraria</i> örnekleri.....	48
Resim 3.9 1.61 mg/L NH <sub>3</sub> ve 0.81 µg/L tribenuron metil karışımının etkisindeki <i>C. contraria</i> örnekleri.....	49

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

°C	: Santigrat derece
dak	: Dakika
$\epsilon$	: Ekstinksiyon katsayısı
g	: Gram
L	: Litre
m	: Metre
m <sup>2</sup>	: Metrekare
m <sup>3</sup>	: Metreküp
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
mmol	: Milimol
$\mu$ g	: Mikrogram
$\mu$ L	: Mikrolitre
$\mu$ M	: Mikromolar
nm	: Nanometre
nmol	: Nanomol
U	: Ünite
w/v	: Ağırlık/hacim
%	: Yüzde
<	: Küçük
>	: Büyük

### Kısaltmalar

Al	: Alüminyum
ALS	: Asetolaktat Sentetaz
APx	: Askorbat Peroksidaz
ark.	: Arkadaşları
As	: Arsenik
AsA	: Askorbik Asit
BHT	: 2,6-Di- <i>tert</i> -butyl-4-methylphenol
BSA	: Sığır Serum Albumini
Ca	: Kalsiyum
Cd	: Kadmiyum
Cu	: Bakır
CAT	: Katalaz
CO <sub>2</sub>	: Karbondioksit
CDNB	: 1-Kloro-2,4-dinitrobenzen
Cys	: Sistein
DHA	: Dehidroaskorbik Asit

DHAR	: Dehidroaskorbat Redüktaz
DTNB	: 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)
Fe	: Demir
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GST	: Glutasyon S-transferaz
Grx	: Glutaredoksin
GSH	: Redükte Glutasyon
GSSG	: Okside Glutasyon
GR	: Glutasyon Redüktaz
Glu	: Glutamik asit
Gly	: Glisin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen Peroksit
HO <sup>•</sup>	: Hidroksil Radikali
HNE	: 4-Hidroksinonenal
LOOH	: Lipit Hidroperoksit
LO <sup>•</sup>	: Lipit Oksil Radikali
MDA	: Malondialdehid
Met	: Metiyonin
MetO	: Metiyonin Sülfoksit
Mg	: Magnezyum
N	: Azot
NaCl	: Sodyum Klorür
NH <sub>4</sub> Cl	: Amonyum Klorür
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	: Amonyum
NH <sub>3</sub>	: Amonyak
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	: Nitrit
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	: Nitrat
NO	: Nitrik Oksit
NP-SH	: Non Protein Tiyol
O <sub>2</sub> <sup>-•</sup>	: Süperoksit Radikali
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	: Singlet Oksijen
OLOO <sup>•</sup>	: Peroksil Radikali
ONOO <sup>-</sup>	: Peroksinitrit
O <sub>3</sub>	: Ozon
Pb	: Kurşun
PCs	: Fitoşelatinler
PCS	: Fitoşelatin Sentetaz
POD	: Peroksidaz
PB-SH	: Protein Bağlı Tiyol
PQ	: Paraquat
PVP	: Polivinilpirolidon
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
S	: Kükürt
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SNP	: Sodyum Nitroprussid

Trx	: Tiyoredoksin
T-SH	: Total Tiyol
TCA	: Trikloroasetik Asit
TMP	: 1,1',3,3'-tetramethoxypropane
TBA	: Tiyobarbitürük Asit
TBARS	: Tiyobarbiturik Asit Reaktif Maddeleri
UV	: Ultraviyole
vb.	: ve benzeri

## 1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun giderek artmasıyla birlikte, insan gereksinimlerini karşılayabilecek kaynaklar yetersiz kalmaya başlamıştır. Bu durumun temel nedeninin, insanoğlunun var olan kaynakları hızlı bir şekilde tüketmesiyle ilgili olduğu söylenebilir. Artan ihtiyaçları karşılayabilmek için, sanayi kuruluşlarının, fabrikaların, endüstriyel ve tarımsal alanların üretimleri de gün geçtikçe daha da hız kazanmaktadır. Bu tür kuruluşların faaliyetleri sonucu oluşan atık sular; nehir, akarsu, göl, gölet ve hendek gibi sucul ekosistemlere ve tarımsal arazilere karışarak kirlilik oluşturmaktadır [1]. Ekili alanlara dahil olan bu sulardaki nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) ve nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) gibi azot kaynaklı bazı bileşenler, tarımsal kirliliğin ortaya çıkmasının temel nedenlerinden sadece bir kısmını oluşturmaktadır.  $\text{NO}_3^-$ ; azotlu gübre, organik gübre, insan ve hayvan atıkları ve endüstriyel atıklar gibi organik kaynakların, mikroorganizmaların biyokimyasal aktiviteleri yoluyla ayrışması sonucu oluşan inorganik bir kirleticidir. Azotun sudaki yüksek çözünürlüğü ve toprak tarafından tutulma oranı düşüktür. Bu nedenlerden dolayı azot, sucul bitkiler tarafından kullanılmadıkça veya denitrifikasyonla atmosfere verilmediği sürece kolaylıkla yeraltı sularına karışabilmektedir [2]. Kontamine olmuş yeraltı sularıyla tarımsal sulama yapılması veya bu suların içme suyu olarak kullanılması, hem makrofitler için, hem de hayvan sağlığı için tehlike oluşturmaktadır [2,3]. Çünkü normal koşullarda bitkiler için temel elementlerden biri olan azot, yabancı otlarla mücadelede kullanılan herbisitlerle reaksiyona girdiği zaman, sucul ekosistemlerin biyorestoratörleri olan makrofitler [4] için toksik olabilmektedir [5].

Bünyesinde organik kirletici bulunduran lağım suları da bir çeşit kirlilik kaynağıdır. Yapılan araştırmalarda, iki milyon ton lağım suyunun ve diğer atıkların, günlük olarak su kaynaklarına dahil edildiği tahmin edilmektedir. Lağım sularının %90'ından ve diğer atıkların da %70'inden fazlası arıtılmadan alıcı sulara deşarj edilmektedir [1]. Bu ani etki sonucunda, ekosistemin taşıyabileceği kapasitesinin üzerinde bir yük getirmesiyle, sistem içerisindeki tüm trofi düzeyleri az ya da çok bu olumsuz etkiyle karşılaşmaktadır. Sistemin ayakta kalabilmesi için, atık sular deşarj



edilmeden önce ya kimyasal ya da biyolojik olarak basit düzeyde de olsa, arıtıma tabi tutulmak zorundadırlar.

Yeryüzünün %75'i sulardan meydana gelirken bu suyun %97'si okyanus ve denizlerde toplanmıştır. Geriye kalan %3'lük kısmı ise tatlı sular oluşturmaktadır. Bu oranlamayı kendi içerisinde devam ettirirsek %3'lük tatlı suların %68.3'ü buzullarda, %31.4'ü yer altında ve %0.3'ü ise yer yüzeyinde ve atmosferde bulunmaktadır. Anlaşılacağı gibi çevremizde bire bir olarak kullandığımız su, dünya üzerindeki suyun ancak %0.01'i kadardır [6]. Canlılar tarafından kullanılacak tatlı su oranının bu derece az olması, suyun kirleticilere maruz bırakılmamasını ve çok daha tasarruflu bir şekilde tüketilmesini gerektirmektedir.

Her ne kadar yüzde dağılım oranı çok az olsa da sistematik olarak tanımlanmış, biyosferde yaşayan yaklaşık 1.8 milyon türün yüz bin kadarını bünyesinde barındırır. Bunun yanında çeşitli iç su tipleri (lentik ve lotik sistemler); ekonomi, eğitim, bilim, kültür, estetik gibi temel yaşam bilimleri için de vazgeçilmez bir unsurdur. Ancak tatlı sular, karasal ekosistemlere oranla, tür çeşitliliği azalması konusunda daha dezavantajlı bir durumdadır. Bunun başlıca nedeni, insanların, suyu, hiç bitmeyecekmiş gibi vahşice kullanmasıdır. Gidilen nokta bu şekilde devam ederse, sistem geri döndürülemeyecek hale gelecek ve zamanla biyoçeşitlilik yok olma tehlikesiyle yüz yüze kalacaktır. Küresel tatlı su biyoçeşitliliğini yok olma noktasına getiren antropojenik etkenler; doğal su kirliliği, suyun akış değişikliği, habitatın tahribi veya bozulması ve egzotik türlerin istilası şeklinde sıralanabilir [7]. Böyle çok sayıda canlıya ev sahipliği yapan, insanlığa sunduğu hizmetler konusunda oldukça cömert davranan bu değerli suların korunması büyük önem taşımaktadır.

Suyu habitat olarak kullanan organizmaların canlılıklarının ve temel metabolik faaliyetlerinin sürekliliği için, suyun kirlenmemesi gerekmektedir. Fakat insanoğlu dünya üzerinde var olduğu sürece, suyun kirlenmemesi gibi bir durumdan bahsetmek pek mümkün görünmemektedir. Popülasyonun artmasıyla birlikte bu kirlilik miktarı ciddi boyutlara ulaşabilmektedir. Popülasyonun artışıyla beraber sanayileşmenin de ilerlemesi, kirlilik üzerinde sinerjistik etkiye neden olmaktadır. Sanayileşmeyle birlikte insan ihtiyaçları da çeşitlenip artmaya başlayınca daha çok

kaynak ve enerji tüketimine neden olmakta ve bu da doğal olarak kirliliği doğurmaktadır [8].

Su kirliliği; ırmakların, okyanusların, göllerin, yeraltı sularının antropojenik kirleticiler nedeniyle ya da kendiliğinden doğal karakteristiğinin bozulması olarak tanımlanabilir. Suyun insan faaliyetleri veya doğal unsurlarla kirlenmesi durumunda, sucul ekosistemlerde yaşayan bitkisel-hayvansal popülasyonlar ve komüniteler doğrudan veya dolaylı bir şekilde etkilenebilmektedir [9]. Su kirliliği, gelişen ve gelişmekte olan ülkelerde ölüm ve hastalık nedenlerinin başında gelmektedir. Uluslararası raporlara göre yaklaşık olarak günde 1400 insan, su ve suya bağlı hastalıklar nedeniyle ölmektedir [10].

### **1.1 Antropojenik Su Kirliliği**

Suyun kalitesi, tarımsal, evsel veya endüstriyel faaliyetler sonucu oluşan çeşitli kirleticilerle veya aşırı tüketim neticesinde bozulmaktadır. Bu şekilde meydana gelen kirlilik süreci, antropojenik kirlilik olarak adlandırılmaktadır [11,12].

Tarımsal alanların bulunduğu sucul ekosistemlerdeki organizmaların çoğu, rutin bir şekilde birçok stres faktörüne maruz kalmaktadır. Bu bölgelerdeki yüzey suları, yüksek miktarda besin tuzu, tortu ve pestisit içermektedir. Tarımsal alanların bulunduğu sulara bu tarz kirleticilerin dahil olmasında, su akışı, toprak erozyonu ve pestisit içeren sprey şişe kullanımı etkili olabilmektedir [13]. Pestisitler; bitki, mantar ve zararlı organizmaların büyümesini sınırlandırarak, öldürerek veya uzaklaştırarak, tarımda ürün verimliliği ve çeşitliliğini arttırmak için kullanılan kimyasal ürünlerdir [14,15]. Sucul ekosistemlerin kontaminasyonuna neden olan ve neticesinde bu sistemlerin restorasyonunu gerektiren, temel antropojenik kirleticilerden olan pestisitler, dünya çapında tarımda yaygın olarak kullanılmaktadır. İstenilen üründen daha çok elde edebilmek için zararlılara karşı kullanılan bu sentetik kimyasal ürünler; akarsuların, nehirlerin, göletlerin, göllerin ve kıyı alanlarının kirlenmesine yol açmaktadır [15].

Yirminci yüzyılın ikinci yarısında Yeşil Devrimin ortaya çıkmasıyla birlikte çiftçiler, sentetik gübre, böcek ilacı ve herbisit kullanarak verimi arttırmak için doğal

olmayan bu ürünleri kullanmaya başlamışlardır [15]. Kullanılan ileri teknolojilerle, akarsu ve nehirlerin %50'sinden fazlasının pestisit ve besin tuzu yüklenmesinden etkilendiği tahmin edilmesine rağmen bu alandaki çalışmalar sınırlıdır. Sisteme taşınan pestisitler, sadece hedef organizmaları değil aynı zamanda tüm canlılık sistemlerini de olumsuz şekilde etkileyebilmektedir. Bunun sonucu olarak biyobirikim ile beraber ayrışma sonucunda ekosisteme ekstra karbon ve besin tuzu yüklenmesi ile daha vahim sonuçlar ortaya çıkmaktadır [16].

Antropojenik etkiler değerlendirildiğinde sadece sucul ekosistemlerdeki kirlilik değil, aynı zamanda karasal ekosistemlerdeki büyük endüstriyel alanların faaliyetleri özellikle iç su ekosistemlerinde büyük tahribata neden olmaktadır.

Yukarıda söz edildiği gibi tarımsal, endüstriyel veya evsel kaynaklı atık sularında bulunan, sentetik ve organik bileşiklerin kalıntıları, yapay kirletici olarak gruplandırılmaktadır. Doğal olmayan bu kirleticiler, içme sularına, yeraltı sularına veya akan sulara doğrudan veya dolaylı olarak deşarj edilebilmektedir. Sentetik ve organik kirleticilere maruz kalmış suların, sucul organizmaların vücuduna herhangi bir şekilde girişi ise bu canlıların sağlığını tehlikeye sokmaktadır [17]. Besin zincirinin diğer trofik basamaklarındaki organizmaların da bunları tüketmesiyle birlikte, tabandan tavana doğru biyolojik birikim sonucu, tüm canlıların olumsuz yönde etkilendiği bir durum ortaya çıkmaktadır.

## **1.2 Doğal Kirlilik**

Bir bölgenin aşırı yağış alması neticesinde su baskınları oluşabilmektedir. Akış hızı yüksek olan bu sular, tarım arazilerinden geçerken karşılaştığı birçok kirleticiyi, farklı alanlara taşıyarak sucul ekosistemlerin doğal olarak kirlenmesine neden olabilmektedir. Bu kirleticilerin başında fosfor ve azot gibi besin tuzları olabildiği gibi [18], tarımsal pestisitler, endüstriyel kimyasallar veya insanlar tarafından meydana getirilen birçok endüstriyel organik kirleticiler de olabilir. Bu kirleticiler kolay bir şekilde yok olmadıklarından dolayı uzun süreli taşınabilirler ve sucul organizmalarda biyobirikime neden oldukları için bunların üzerinden beslenen diğer canlılar için toksik hale gelebilirler [19]. Toprak yeterli miktarda suya doymuş

olduğu için bu fazla suyun toprak altına sızması da bir başka deyişle filitrelenmesi de azalır [20].

Azot, dünya atmosferinde en fazla bulunan (%78) elementlerden bir tanesidir. Organik moleküllerin yapısına katılma yönünden karbon, hidrojen ve oksijenden sonra dördüncü sırada yer almaktadır. Sucul ekosistemlerde çözülmüş inorganik azot şeklinde bulunmaktadır. En yaygın iyonik (reaktif) formları, amonyum ( $\text{NH}_4^+$ ),  $\text{NO}_2^-$  ve  $\text{NO}_3^-$ 'tür. Azotun bu formlarının sucul habitatlara endüstriyel, evsel veya tarımsal alanlardan akması sonucu inorganik azot kirliliği ortaya çıkmaktadır. Bu durum fitoplankton, bentik alg ve makrofit gibi birincil üreticilerin gelişmesini ve çoğalmasını uyarabilir veya arttırabilir. Fitoplankton artışı ile birlikte, tatlı su, nehir ağzı ve deniz kıyısı ekosistemleri ötrofik hale gelmektedir. Ayrıca sucul hayvanların inorganik azot bileşiklerine doğrudan maruz kalması, bu organizmaların hayatta kalma, üreme ve çoğalma yeteneklerini azaltabilmektedir. Yer altı ve yerüstü sularının inorganik azot bileşikleri ile kirlenmesi, insan sağlığı ve ekonomi üzerinde olumsuz etkilere neden olabilmektedir [21].

Bilindiği gibi ayrıştırıcılar karbon, fosfor, azot, sülfür gibi elementlerin doğada geri dönüşümünde önemli bir rol oynarlar [22]. Bentik faunanın sedimentte bulunan organik maddeleri çeşitli yollarla yeniden mineral hale getirmesine biotürbasyon denir. Bu fauna yuva yapma, metabolik faaliyetler, beslenme, predatörden kaçma gibi davranışlar sayesinde organik madde ayrışmasını hızlandırır. Bu etki bazı habitatlarda olumsuz bir süreci meydana getirebilir. Örneğin kararlı bileşiklerin oluşması, toksik maddelerin mineralizasyonu inhibe etmesi gibi önemli metabolik faaliyetleri durdurabilir. Böyle bir durumda herhangi bir inorganik maddenin fazladan artışı alg gibi planktonik canlı sayısının toplam biyomasını birdenbire maksimum seviyeye çıkartır. Bu da dolaylı olarak alg kirliliğine neden olmaktadır [23]. Sonuç olarak bu tip habitatta ani oksijen azalmaları, bulanıklılığın artması ve ışık geçirgenliğinin azalması kaçınılmazdır [24].

Eğer bu süreç bir şekilde aksaklığa uğrarsa, sucul habitatların doğal veya antropojenik kaynaklı kirlenmeler tarafından kirlenmesi ile sistem geri döndürülemeyecek duruma gelebilmektedir [25]. Bu tür ajanlara maruz kalan sucul ekosistemlerde, *Salmonella* spp., *Aeromonas* spp. ve *Legionella* spp. gibi patojenik

bakteriler oluşabilmektedir [26]. Çoğalan bu patojenler, sistemi dönüşümsüz bir hale sokabilirler.

### **1.3 Suyun Verimliliği**

Göl, gölet, akarsu ve ırmak gibi sucul ekosistemler tarım arazileri için büyük önem taşımaktadır. Tarımsal ekim alanları bu sulardan beslendiği için, sağlıklı ve verimli tarım ürünleri için kullanılan bu suların fiziksel, kimyasal ve biyolojik yapısının da doğal olması gerekmektedir. Çünkü bu sular kendini besleyen birçok havzayı da içine alır. Dünyanın çoğu yoksul bölgesinde, günde bir dolardan da daha az miktarda kazandığı parayla geçimini sağlayan, bir milyardan fazla insan bulunmaktadır. Bunlar arasından, özellikle tarımla uğraşan 850 milyon fakir, kırsal kesim halkı yer almaktadır. Dolayısıyla geçimini tarımla sağlayan bu insanlar için su, oldukça kritik bir öneme sahiptir. Aynı zamanda, gelişmekte olan çoğu ülkede su, tarımsal verimi kısıtlayan önemli bir faktör olarak göze çarpmaktadır [27].

Dünya üzerindeki bütün ülkelerde, 2050 yılına kadar 6-9 milyar arasında insan, beslenme ile ilgili büyük sorunlarla yüz yüze kalacaktır. Bu nedenle gelişen ülkelerde nüfusun %40 kadarı tarıma bağımlı olacak ve ülkenin ana ekonomik girdisi haline gelecektir. Fakat küresel tarım; kentleşme, doğal kaynakların kullanımı ve bunların sürdürülebilirliği, iklim değişikliği gibi çevresel sorunlarla karşı karşıyadır [28]. Özellikle dünya beslenmesinde önemli yer tutan tahıl ekimi yapılan arazilerde verimi arttırmak amacıyla doğal gübrelemenin yetersiz olduğu durumlarda yapay gübreler ve pestisitler kullanılmaktadır. Bu gübrelerin bitkiler tarafından kullanımı sonucu oluşan özellikle amonyak, karıştığı sularda kirlilik oluşturmaktadır [21]. Buna ek olarak tarım alanlarında kullanılan herbisitlerin de bu sulara karışması sonucu oluşan kirlilik yükü sucul sistemlerde daha da artmaya başlamaktadır [5].

Sucul ekosistemlerde bu şekilde oluşan yüksek kirlilik etkilerini bertaraf etmek amacıyla, makrofitlerin enzimatik antioksidanlarında artışlar olmaktadır. Bir organizmanın antioksidan enzim aktivitesi ne kadar yüksekse direnç mekanizması da o derece etkindir. Dolayısıyla bir canlının hayatını devam ettirmesini sağlayan enzim aktivitesi aralığını tespit etmek oldukça önemlidir. Çünkü bu tür biyomarkırlar suda

kirleticilerin olduğuna dair ipucular vermekle birlikte güçlü biyorestoratörlerin neler olduğu hakkında da bizlere ışık tutmaktadır. Biyomarkırlar; canlıların hücre, sıvı, doku ya da organlarında bulunabilen, ksenobiyotiklerin farklı derişimlerinin etkisine karşı cevap verme yeteneğine sahip olan hücresel, biyokimyasal, moleküler ya da fizyolojik değişkenlerdir. Biyomarkır analizleri ile ortamdaki kirleticilerin varlığı analitik tekniklerle ölçülebilmekte ve birçok çevresel kirlilik izleme programında bu analiz yöntemleri önemli bir yer tutmaktadır [29]. Biyorestoratör, sucul ekosistemlerde bulunan ve biyosorbsiyon kapasitesi yüksek makrofit olarak tanımlanmaktadır [4]. Biyosorbsiyon kapasitesi yüksek bir organizmanın toksikantlara maruz kalması sonucu ölmesi, bu tür habitatların geri döndürülemeyecek derecede bozulması anlamına gelebilmektedir.

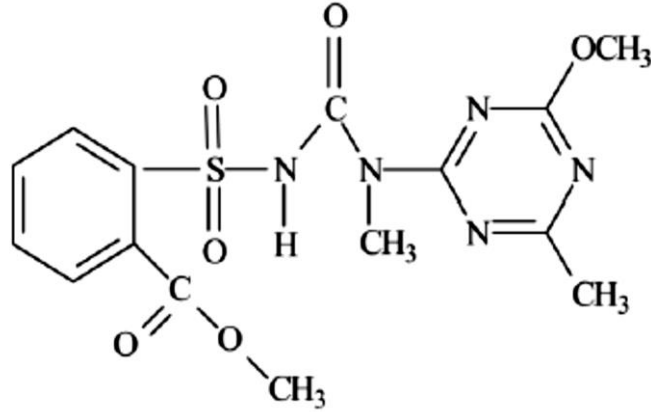
#### **1.4 Su ve Pestisitler**

Dünya’da her yıl binlerce ton pestisit, tarımsal alanda yabancı ot ve çimleri yok etmek amacıyla kullanılmaktadır. Pestisit ailesinin bir üyesi olan herbisitler; sülfonil üre türevleri (amidosulfuron, azimsulfuron, nicosulfuron, rimsulfuron, thifensulfuron methyl, tribenuron methyl) ve azoxystrobin (AZX) gibi formlardır. Ürün verimini yükseltmek amacıyla tarım arazilerinde yaygın şekilde kullanılan bu herbisitler, topraktan süzülerek bir şekilde yeraltı sularına karışmakta ve bu suların doğal karakteristiğini bozmaktadır. Adı geçen bütün pestisitler, özellikle nötr veya hafif alkali pH'ya sahip sularda iyi çözünebilmelerinden dolayı, kolaylıkla bitkisel yapılara difüze olabilmektedir [30].

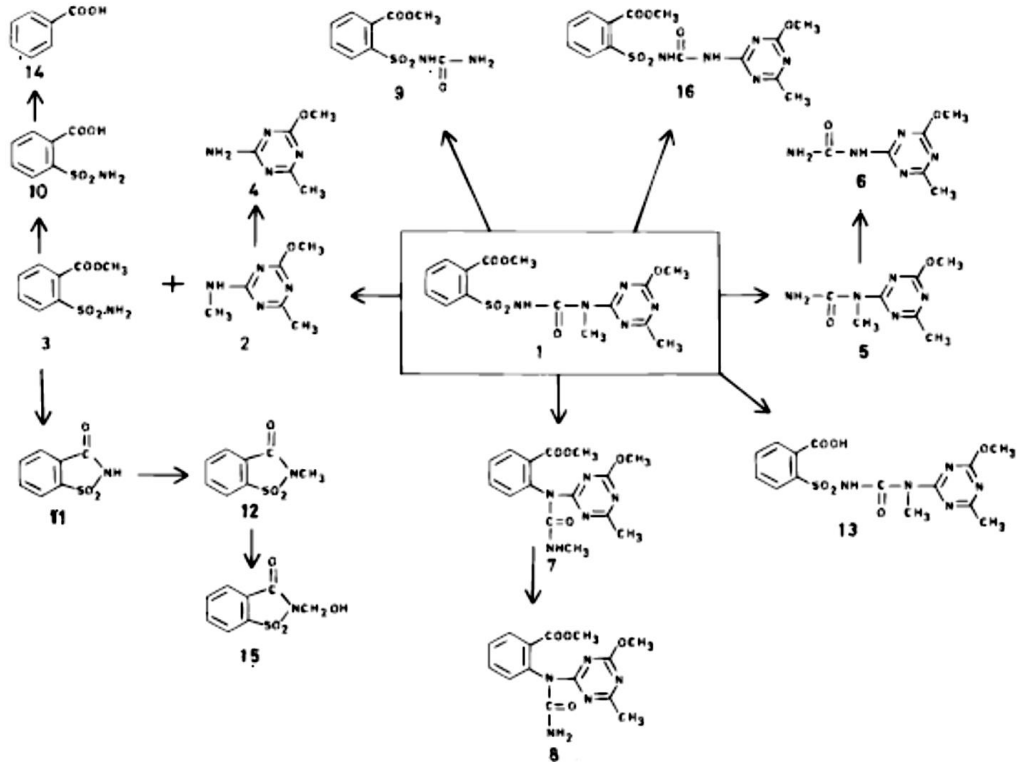
Sülfonil üre grubu ve türevleri herbisitler, karıştığı sularda doğal bozunum sonucu oluşan yan ürünler ile toksik olmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız tribenuron metil, yabancı ot kontrolünde oldukça etkin olan, sülfonil üre grubuna ait bir herbisittir (Şekil 1.1). Bu herbisitinin tarımda daha çok tercih edilmesinde, tortu oranının ve hayvan toksisitesinin nispeten düşük olması etkilidir [31]. Tribenuron metil, valin, lösin ve izolösin aminoasitlerinin sentezinden sorumlu olan asetolaktat sentaz enzimini (ALS) inhibe eden bir herbisittir [32]. Dolayısıyla protein sentezinin aksaması tüm metabolik olayları etkileyerek büyümeyi inhibe edebilmektedir.

Herbisitin etkinliği, uygulanan doza, yabancı otların genç ya da olgun olmasına ve herbisitinin aktif bileşenlerine karşı hassasiyetine göre değişebilmektedir [33]. Bu nedenle tribenuron metil, düşük yoğunlukta bile fitotoksik etki yapabilmektedir [34].

Herbisitin bu toksik etkileri, ışığın etkisiyle yok edilebilmektedir. Ultraviyole (UV) ve güneş ışığı etkisindeki sularda, pH'nın artması ve çözülmüş inorganik maddelerin etkisiyle, fotobozunum oranı artmaktadır. Fotoliz sonucu oluşan yan ürünler (Şekil 1.2) sayesinde ise sucul ortamlarda detoksifiye olabilmektedir [35]. Ayrıca kolay bir şekilde hidrolize uğradığı için, topraktan organik çözücülerin yüksek orandaki karışımıyla veya sulu çözeltileriyle de ekstrakte edilebilmektedir [34].



Şekil 1.1 Tribenuron metilin kimyasal yapısı [36]



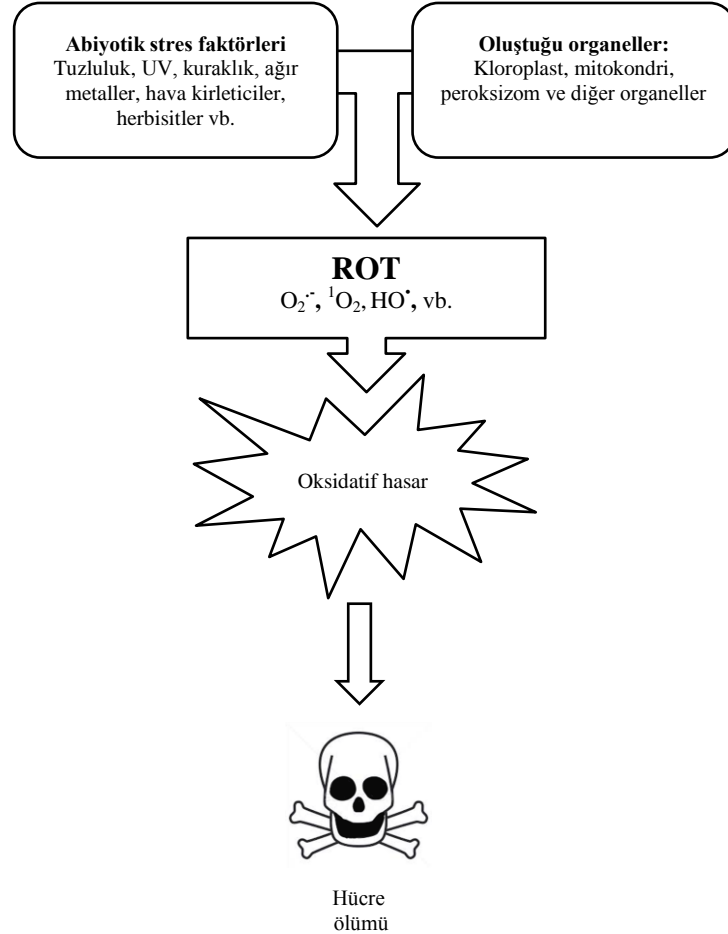
Şekil 1.2 Tribenuron metilin yan ürünleri [35] 1) Tribenuron-methyl; 2) *N*-methyl-4-methoxy-6-methyl- 1,3,5-triazin-2-amine; 3) methyl 2-sulfamoyl benzoate; 4) 4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-amine; 5) *N*-(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)-*N*-methyl urea; 6) *N*-(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl) urea; 7) *N*-(2-carbomethoxyphenyl)-*N*-(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl) -*N*-methyl urea; 8) *N*-(2-carbomethoxyphenyl)- *N* - (4-methoxy-6-methyl-1, 3, 5-triazin-2-yl) urea; 9) *N*-(2-carbomethoxy phenylsulfonyl)-*N*-methyl urea; 10) 2-sulfamoylbenzoic acid; 11) *o*-benzoic sulfimide; 12) *N*-methyl-*o*-benzoic sulümide; 13) 2-[4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl (methyl) carbamoyl sulfamoyl] benzoic acid; 14) benzoic acid; 15) *N*-hydroxymethyl-*o*-benzoic sulümide; 16) Methyl 2-(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl carbamoyl sulfamoyl)benzoate

Kullanılan bu tür kimyasallar oksidatif strese yol açar. Bu olumsuz koşullardan kurtulmak üzere canlılar, enzimatik ve enzimatik olmayan savunma sistemlerini devreye sokarlar.

Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar, organizmanın abiyotik veya biyotik faktörlere karşı oluşturduğu moleküllerdir. Bu moleküller, sulara karışan organik maddelerin oksijenle bozunumu sonucu radikal olmayan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ile süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil radikali ( $HO^{\cdot}$ ) ve singlet oksijen ( $^1O_2$ ) gibi reaktif oksijen türlerine (ROT) (Şekil 1.3) karşı oluşmaktadır. ROT'lara maruz kalan



makrofitlerde lipit, DNA veya protein moleküllerinin parçalanması sonucu büyüme inhibisyonu hatta bitkinin ölümü gibi istenmeyen sonuçlar görülmektedir [37].



Şekil 1.3 Abiyotik stres kaynaklı ROS üretimi ve hücre ölümü [38]

Bitkilerde, özellikle doymamış yağ asitleri, HO<sup>•</sup> ve <sup>1</sup>O<sub>2</sub>'ye karşı oldukça hassastır. Bu durum hücre zarının bütünlüğünün bozulmasına neden olur. Lipit peroksidasyonu (LPO) sonucu hücre zarının seçici geçirgen yapısının deformasyonu, zardan sızıntının artması ve membran proteinlerinin yapısının hasar görmesiyle sonuçlanır.

Makrofit DNA'sı çeşitli yollarla ROS'lar tarafından hasara uğrayabilir. ROS'lardan en reaktif olanı hidroksil radikalidir. Singlet oksijen guanini deforme ederken süperoksit ise hiç tepkimeye girmez. ROS'lardan hem çekirdek DNA'sı hem

de mitokondriyal DNA etkilenmektedir. Radikallerin verdiği hasar dolaylı veya doğrudan olabilmektedir. DNA hasarının en yaygın tipi, LPO sonucu oluşan malondialdehidin (MDA) guaninle konjugasyonudur [37].

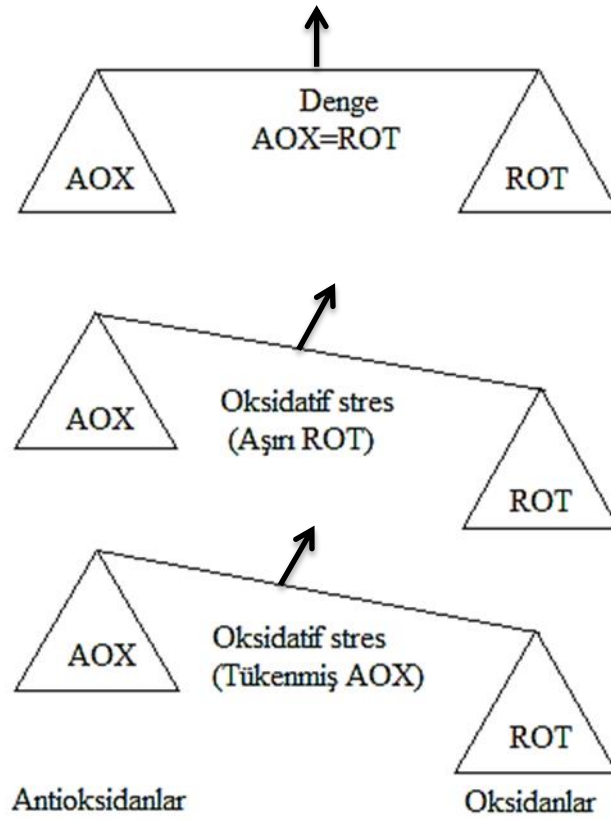
Makrofit proteinlerinin ROT'larla okside olması, aminoasitler arasındaki kovalent bağların koparak yapılarının bozulmasına neden olur. Protein oksidasyonlarının çoğu tipi geri dönüşümsüzdür fakat sülfür içeren aminoasitlerin yer aldığı protein denatürasyonu geri dönüşümlü olabilmektedir [37]. Bu tip oksidasyon oldukça yaygındır ve oksidatif stresin bir belirteçidir.

Temel olarak ROT'un neden olduğu istenmeyen sonuçların ortaya çıkmaması için, sucul makrofitler birçok savunma mekanizması geliştirmektedir. Bu mekanizmalar içerisinde enzimatik ve enzimatik olmayan moleküllerin miktar ve aktivitelerinin değişmesi oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Bu savunma mekanizmaları sayesinde, ya toksik maddeleri daha az toksik hale getirerek ya da tamamen başka bir forma çevirerek hayatta kalmaya çalışırlar. Bu etkin mekanizmaları nedeniyle sucul ekosistemlerin restore edilmesinde, makrofitlerin yaygın bir şekilde kullanılabilir olduğu konusunda birçok araştırma yapılmıştır [39]. Bu araştırmalardan yola çıkılarak çalışmamızda kullandığımız *Chara contraria* (A. Braun ex Kützing), hem yüksek metabolik faaliyeti hem de kolaylıkla elde edilebilmesi, ayrıca maliyetinin oldukça düşük olması ve güçlü biyosorbsiyon özelliğinden dolayı tercih edilmiştir.

### **1.5 Enzimatik Antioksidanlar**

Fotosentez tepkimesinin gerçekleştiği kloroplastlarda çoklu doymamış yağ asitleri bol miktarda bulunmaktadır. Bu nedenle kloroplast taşıyan canlılar oksidatif hasar riski altındadır. Bu durum ise oksidatif strese neden olmaktadır. Oksidatif stres, oluşan ROT'lara karşı antioksidan savunma sisteminin yetersiz kaldığı durumda ortaya çıkan bir olgudur. Fotosentez esnasında oluşan moleküler oksijen reaktif olmasa da HO<sup>•</sup>, O<sub>2</sub><sup>-</sup> gibi ROT'lara ve radikal olmayan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>'ye dönüşebilmektedir. Normal koşullarda ROT'lar ile antioksidan sistemler denge durumundadır [38]. Antioksidanların tükenmesi ve aşırı ROT birikimi veya her

ikisinden dolayı bu kritik denge bozulduğunda oksidatif stres ortaya çıkar (Şekil 1.4). Temel olarak enzimatik antioksidan savunma sistemleri, oksidatif stresin minimuma indirgenmesinde büyük önem taşır [40]. Örneğin bitkilerde bulunan ve metabolik faaliyeti yüksek olan kloroplast ve mitokondri gibi organellerde çok fazla miktarda ROT birikebilir. Bu bölgelerde oluşan ROT'lar, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemi elemanları ile ortamdaki uzaklaştırılarak bitkiler oksidatif stresten korunmaktadır [38].



Şekil 1.4 Oksidatif stres [40]

### 1.5.1. Askorbat Peroksidaz (APx)

Askorbat peroksidaz (APx), enzimatik antioksidanlar içerisinde önemli bir yere sahiptir. APx, bitkilerde, özellikle makrofitlerde aşırı ışık ve ısı gibi abiyotik stres koşullarında, kloroplastlarda ve peroksisomlarda aktif hale geçebilen antioksidan bir enzimdir. Enzimin temel mekanizması, fotosentez esnasında oluşan

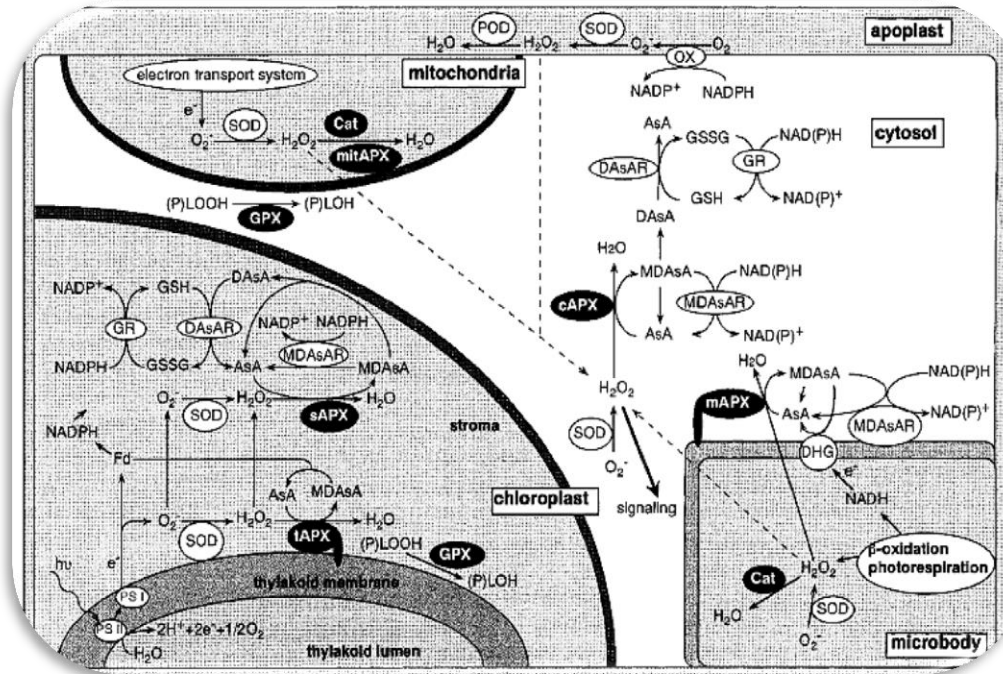
$H_2O_2$  ve bunun ürünü olan  $HO^\bullet$ 'yu ortamdan uzaklaştırarak hücrenin zarar görmesini engellemektir [38,41,42]. Enzimin, bitkilerde bakır (Cu) eksikliği veya fazlalığında seviyesi artmaktadır. Ayrıca NaCl'nin olmadığı stres koşullarında,  $H_2O_2$  ve sodyum nitroprussid (SNP) bileşikleri de APx'in artmasına neden olmaktadır [38]. Bu enzim substrat olarak askorbik asit (AsA) kullanmaktadır. Stres koşulları altında oluşan  $H_2O_2$ 'yi uzaklaştırmak için APx seviyesinin artışı ile birlikte, substrat olarak kullanılan AsA azalması da görülür [43].

APx, kapalı tohumlu bitkilerden; bezelye, ıspanak, su mercimeği ve çınar yapraklarında, çay, mısır ve beyaz katırtırnağında, bunun yanında baklagil kök nodüllerinde, soya fasulyesi embriyolarında ve hint fasulyesi endospermlerinde tespit edilmiştir. Ayrıca *Euglana*, *Chlamydomonas* spp., *Zooxanthella* spp. gibi ökaryotik alglerde ve belli siyanobakterilerde de aktivitesi belirlenmiştir. Fotosentetik organizmalara ek olarak APx, protozoan *Trypanosoma cruzi*'de de tespit edilmiştir. Hayvan ve mantarlarda ise bulunmamaktadır. Hayvanlardan yalnızca sığır gözünde aktivite gözlemlenmiştir ve aktivite bitkilerinkinden çok farklıdır [41]. Sığır gözünde bulunan APx, elektron donörü olarak kullandığı AsA'nın, hayvan dokularında bol miktarda bulunmasından dolayı,  $H_2O_2$ 'nin Glutatyon peroksidaz (GPx) tarafından uzaklaştırmasına katkı sağlayabilmektedir [44]. APx'in farklı özelliklere sahip birçok izoenzimi vardır. Bu izoenzimler; tilakoid (tAPx), glioksizom membran formları (gmAPx), kloroplast stromal çözünür formu (sAPx), sitosolik form (cAPx) [38] ve mitokondriyal (mitAPx) [44] formlardan oluşmaktadır.

APx'in aktivitesi bazı durumlarda ise özellikle abiyotik stres faktörleri sırasında yavaşlatılabilmekte veya durdurulabilmektedir. Örneğin, salisilik asit ve 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA) tarafından aktivasyonu inhibe edilebildiği gibi [45], bitki hücrelerinde nitrik oksit (NO) tarafından da APx'in aktivitesi engellenebilmektedir [46].

Temel olarak APx'in etki mekanizması, kloroplastta fotosentez sonucu oluşan  $H_2O_2$ 'nin suya dönüşmesi ile gerçekleşmektedir. Substrat olarak kullanılan AsA, bu sırada monodehidroaskorbata (MDAsA) dönüşerek okside hale gelir. Daha sonra okside MDAsA, monodehidroaskorbat redüktaz (MDAsAR) enzimi aracılığıyla NADPH'in protonlarını kullanarak AsA veya dehidroaskorbata (DAsA) indirgenir.

İndirgenmiş durumdaki DAsA, DAsA redüktaz (DAsAR) katalizörlüğünde redükte glutasyonu (GSH) kullanarak AsA'ya indirgenir. AsA oluşumuyla birlikte GSH, yükseltgenerek okside glutatyonu (GSSG) dönüşür. Glutasyon redüktaz (GR), GSSG'ye NADPH'tan proton ve elektron aktararak yeniden GSH oluşumunu sağlar. Böylelikle APx, AsA-GSH döngüsü ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin toksik seviyelerde birikimini önlemiş olur [44,47] (Şekil 1.5). Sonuç olarak bu mekanizma ile ototrof organizmalar, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve onun yan ürünlerinin olumsuz etkilerinden korunmuş olurlar.



Şekil 1.5 Yüksek yapılı bitkilerde ROS'ların elimine edilme yolları [44]

### 1.5.2. Dehidroaskorbat Redüktaz (DHAR)

Bitki dehidroaskorbat redüktazları (DHAR) temel olarak kloroplast ve sitozolde bulunmakla birlikte diğer hücresel bölümlerde de bulunabilmektedir. Bitkilerde bulunan DHAR enzimlerini kodlayan birçok gen ve enzimin en az iki izoformu bulunmaktadır [48]. Örneğin *Arabidopsis* spp., DHAR'ı kodlayan üç fonksiyonel gene sahiptir; DHAR1 (*At1g19570*), DHAR2 (*At1g75270*) ve DHAR3 (*At5g16710*). Son on yılda, bitkilerde DHAR'ın moleküler yapısını ve

mekanizmasını açıklamak için yapılan çalışmalarla DHAR enzimine olan ilgi artmıştır [47].

Farklı bitkilerden alınan DHAR'ın üç boyutlu genel yapısı, hemen hemen aynı olmasına rağmen substrat ve GSH'ın bağlandığı bölgeler farklı olabilmektedir. GSH'ın bağlandığı bölge G bölgesi ve substratın bağlandığı bölge ise H bölgesi olarak adlandırılmaktadır. DHAR'da bulunan H bölgesi veya dehidroaskorbik asit (DHA) bağlanma bölgesi veya substrat bağlı bölge, yapısal olarak G bölgesine göre daha esnektir [47].

DHAR aktivitesi sıcaklık, kuraklık, osmoz ve ağır metallerin neden olduğu stres koşullarında artmaktadır. Bunun sonucu olarak DHAR'ın aşırı şekilde sentezi AsA miktarını artırmakla birlikte, bitkiler kendilerini oksidatif hasara karşı korumaktadır [48].

Yukarıda da belirtildiği gibi DHAR enzimi, DHA'yı, GSH katalizörlüğünde AsA'ya indirgeyerek stres koşullarında antioksidan aktiviteyi artıran AsA miktarını yükseltir. DHA'yı AsA'ya indirgeyen bu tepkime, bitkilerde iyi bilinen bir tepkimedir. AsA'nın yeniden oluşumunu sağlayan bu tepkimenin gerçekleşebilmesi için de ortam pH'ının alkali olması gerekmektedir [47].

DHAR aktivitesi aşağıdaki üç reaksiyonla gerçekleşmektedir:



Kükürt bağlı DHAR katalizörlüğünde öncelikle DHA, AsA'ya dönüşür. Bu sırada substrattan enzime hidroksil eklenir ve DHAR-SOH oluşur (Reaksiyon 1). Daha sonra GSH kullanılarak DHAR-SOH, radikal DHAR-S-SG'ye dönüşür (Reaksiyon 2). Bu tepkimeyi takiben DHAR-S-SG, GSH'tan proton alarak tekrardan DHAR-S ve GSSG oluşur (Reaksiyon 3) [47].

Üç tepkime özetlenecek olursa;



**1.5.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx)**

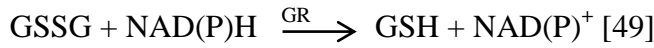
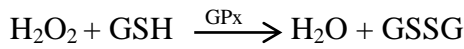
Peroksitleri parçalayarak toksik olmayan bileşikler haline getiren peroksidazlardan glutasyon peroksidaz (GPx) önemli bir antioksidan enzimdir. Peroksidaz ailesinin önemli bir üyesi olan bu enzim, yüksek yapılı bitkilerde bulunur ve demir içermez [49-52]. İlk kez Mills tarafından 1957 yılında sığır eritrositlerinde, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin neden olduğu oksitadif hasara karşı hemoglobini koruyan bir enzim olarak keşfedilmiştir [53]. Takip eden sonraki yıllarda, hücre zarlarını, DNA'yı, lipitleri ve proteinleri, GSH'ı GSSG'ye oksitleyerek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin yıkıcı etkilerinden koruduğu bulunmuştur [49,54,55,56]. Ayrıca düşük oksidatif strese bile indüklenebilen bir biyomarkır olma özelliğinden dolayı, oksidatif strese karşı ilk savunma hattını oluşturmaktadır [54]. Bu enzim üretiminde özellikle sucul makrofitlerde kök ve yaprak gibi çeşitli dokularda, patojenler, metaller, soğuk, kuraklık ve tuz gibi çeşitli abiyotik stres koşulları etkilidir. GPx'in stres koşullarındaki tepkisine ilaveten, tiyol-disülfür dengesini düzenleyerek hücrel redoks homeostazında önemli olduğu düşünülmektedir [51,52,57]. Enzimin bu tür stres koşullarına karşı antioksidan özellik göstermesinde selenyum elementinin önemli bir yeri vardır. Selenyum, GPx enziminin yapısına kofaktör olarak katılır. GPx'in aktif merkezinde selenosistein aminoasidi bulunur. Aminoasidin yan grubunda yer alan selenyum, elektron alış-verişi (oksidasyon-redüksiyon) tepkimesinin gerçekleşmesini sağlar. Böylece organik peroksitlerin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin indirgenmesini sağlayarak bunların; yağ asitlerini, proteinleri ya da özellikle DNA'yı okside edici özelliklerini ortadan kaldırır [58].

GPx'in model organizma *Arabidopsis* spp.'de, hücrenin farklı bölgelerinde lokalize olmuş sekiz adet izomeri bulunmaktadır. Bunlardan iki tanesi kloroplastta, ikisi sitozolde, ikisi mitokondride, birisi endoplazmik retikulumda ve birisi de çekirdekte konumlanmıştır [50]. Farklı bölgelere konumlanmış olan bu enzimler üç tipte sınıflandırılırlar; selenyum bağlı GPx (GPxs), selenyum bağlı olmayan fosfolipit hidroperoksit GPx (PHGPx), GST aktivitesi gösteren GPx (GST-GPx) [59]. Bu enzim tiplerinden PHGPx'in, tuz stresine karşı olduğu [60] ve aynı zamanda katalaz (CAT) içermeyen tütün bitkilerinde aktivitesinin arttığı [61], GST-

GPx'in ise transgenik tütün bitkilerinde aşırı soğuk ve tuz stres koşullarında üretildiği gözlenmiştir [62].

GPx etki mekanizması; GPx katalizörlüğünde GSH'tan alınan proton ve elektronların H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye aktarılıp H<sub>2</sub>O'nun oluşumuyla başlar. Daha sonra GSSG'ye GR aracılığı ile NADPH'tan elektron ve proton aktarılarak, GSH'ın yeniden oluşumu ile sonlanır. Bu tepkime ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoksifiye edilerek, zararlı etkilerinden hücre yapıları korunmuş olur [49].

Glutatyon peroksidaz reaksiyonları:

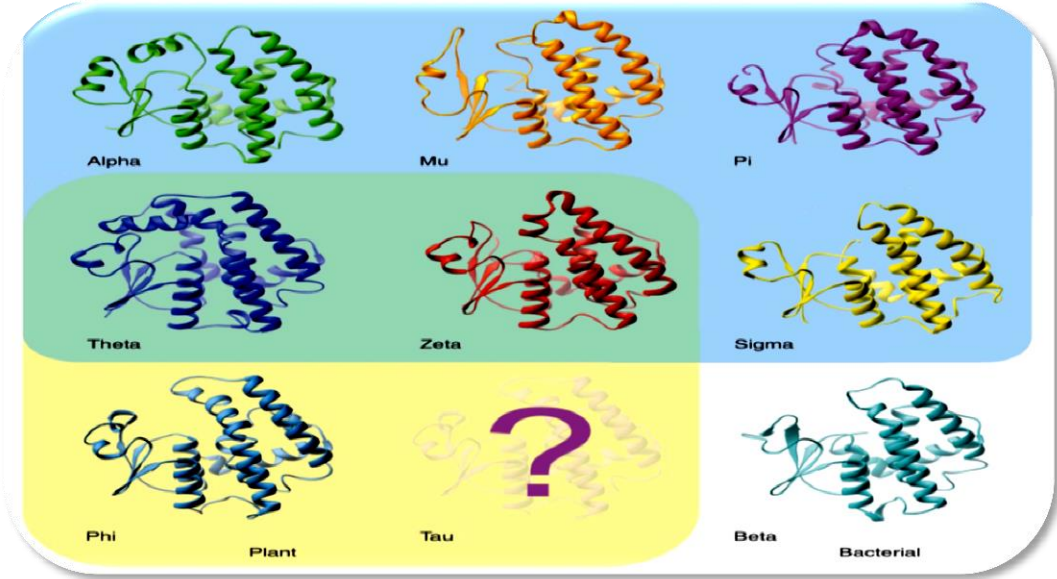


#### **1.5.4. Glutatyon S-transferaz (GST)**

Glutatyon S-transferaz, 50 kDa molekül ağırlığa sahip, temel olarak iki polipeptit alt ünitelerden oluşan ve çözünebilir özelliğine sahip antioksidan bir enzimdir. Bu enzim herbisite maruz kalmış tüm bakteri, mantar, hayvan ve bitkilerde, detoksifikasyon metabolizmasında rol oynamaktadır [63-65]. Glutatyon S-transferazlar (GST), esas olarak hücre sitozolünde bulunmakla birlikte mikrozomal formu da mevcuttur [63]. Bu enzimler ilk olarak 1960'lı yıllarda, hayvanlarda, ilaçların metabolizması ve detoksifikasyonundaki önemini bir sonucu olarak keşfedilmiştir. Bitkilerde ise varlıkları ilk olarak, atrazin herbisitine maruz kalan mısırdaki keşfedilmiştir [64].

Glutatyon S-transferaz enziminin birçok izomeri bulunmaktadır. Enzimin çeşidinin çok olması, bu enzimlerin adlandırılmasıyla yapılan bir sınıflandırma sistemi gerektirmektedir. Böyle bir sınıflandırma sistemi, öncelikle hayvan GST'leri için geliştirilmiştir. Daha sonra da hayvan GST sınıflandırma yöntemi esas alınarak bitki GST'leri için bir sınıflandırma sistemi yapılmıştır [64]. Bitki GST'leri, memelilerdeki sınıflandırma kriterleri göz önüne alınarak phi (F), tau (U), theta (T), zeta (Z) ve lambda (L) şeklinde beş sınıfa ayrılmaktadır. Phi ve tau bitkilere özelken, theta, zeta ve lambda diğer organizmalarda da (mantar, hayvan) gözlenmiştir [63,64,66].

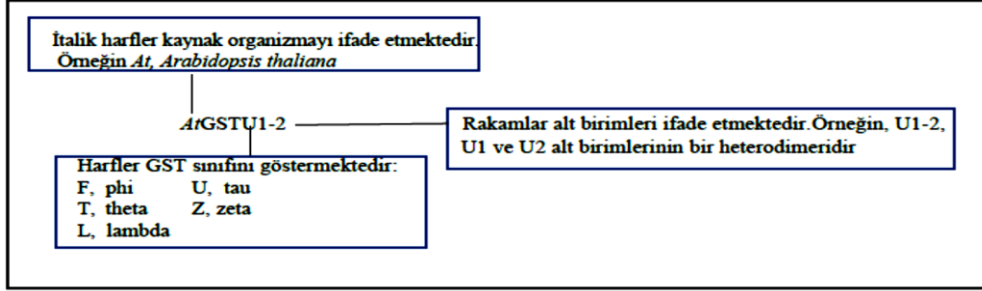




Şekil 1.6 GST alt birimlerinin yapılarının şerit gösterimleri [64]. Memelilere özgü GST'ler (alpha, mu, pi ve sigma) mavi arka plana sahiptir; bitkilere özgü (phi) ve bakteriye özgü (beta) GST'ler, sırasıyla sarı ve beyaz arka plana sahiptir; hem hayvanlarda hem de bitkilerde olan GST'ler (theta ve zeta) yeşil arka plana sahiptir. Soru işareti olan tau GST'nin yapısı henüz belirlenmemiştir. Her enzim farklı bir sınıfta olmasına rağmen çok az da olsa aralarında bir benzerlik bulunmaktadır.

Çözünbilme özelliği olan her GST'deki alt birimler, aralarında iki özdeş molekül kombinasyonu haline gelebilmektedir. Phi ve tau sınıfı GST'lerde, sadece aynı sınıftan alt birimler dimerize olabilirler. Bununla birlikte, herhangi bir sınıftaki alt üniteler de oldukça farklı aminoasitler bulunsalar bile kendi aralarında dimerleşebilirler. Bu şekilde alt üniteler aralarında etkileşime girerek heterodimer oluşturabilmektedir ve bu durum, GST'lerin bitkilerdeki çeşitliliğini büyük ölçüde artırmaktadır. Fakat alt birimlerin eşleşmesinin işlevsel önemi henüz belirlenmemiştir [64]. Bu adlandırmalar model organizma *Arabidopsis* spp.'de olduğu gibi, memeli GST'lerindeki isimlendirme sistemi örnek alınarak yapılmıştır (Şekil 1.7). Aynı uygulama GST alt birimleri için de yapılmaktadır. *Arabidopsis* spp. gibi organizmalarda genom bilgisinin tümü mevcut olduğu için, her bir sınıfın GST alt birimlerini kodlayan genlerin kromozomlar üzerindeki konumlarına göre numaralandırılma yapılmaktadır. Bitkilerde ise genom bilgisinin eksik veya mevcut

olmama durumlarına göre numaralandırma sistemi, her sınıf için GST genlerinin keşif sırasına göre yapılmaktadır [64].



Şekil 1.7 Arabidopsis spp.ve diğer bitki GST'leri için yapılan isimlendirme modeli [64]

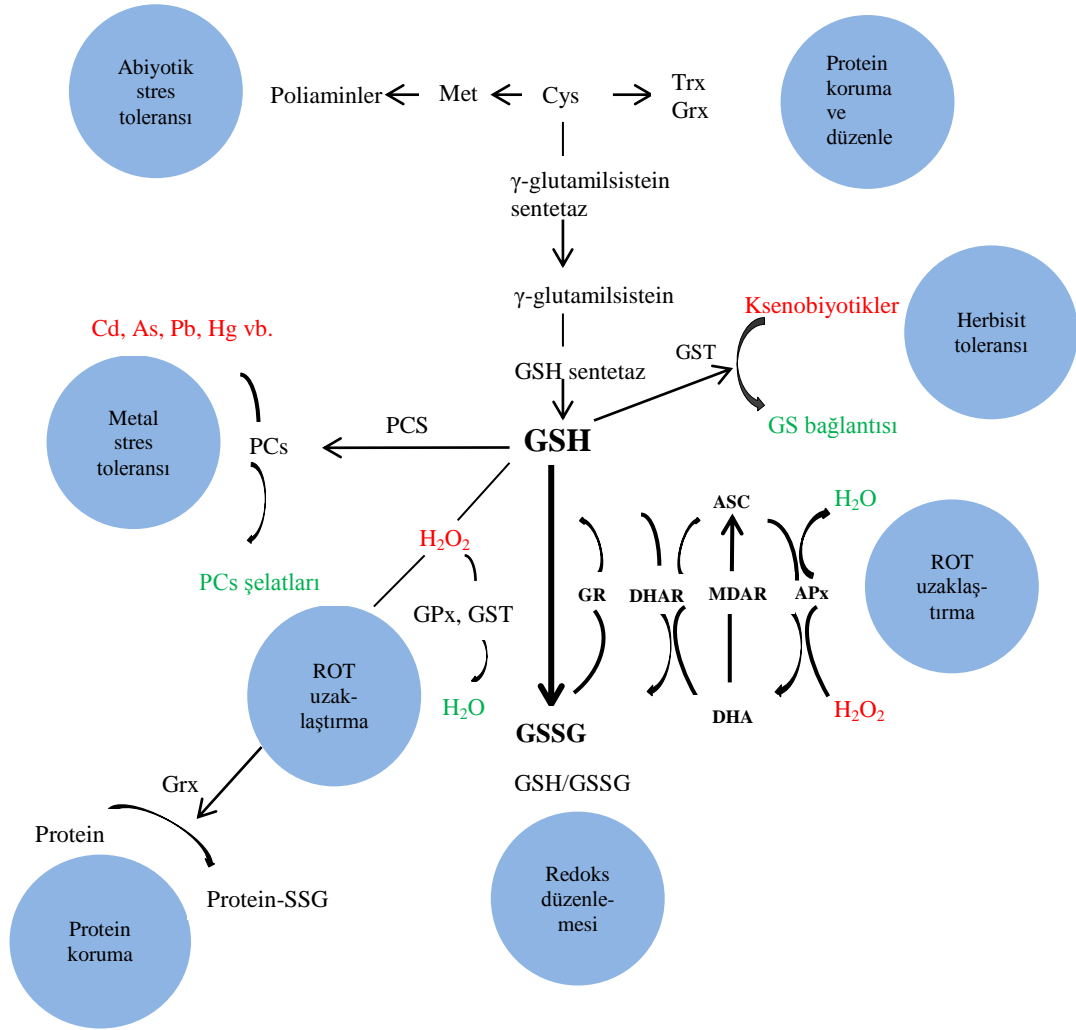
GST aktivitesi organizmalarda çeşitli stres koşulları altında artabilmektedir. Bazı tau GST'ler, hücre bölünmesi sırasında veya bitkinin oksin ve sitokin hormonlarına maruz kalmaları esnasında uyarılmaktadır. Ayrıca hem tau hem de phi GST'lerin, ozmotik stres ve aşırı sıcaklıkların etkisiyle sentezinin arttığı bilinmektedir. Herbisit ve kimyasal toksinlerin neden olduğu oksidatif stres koşullarında da GST'lerin sentezi uyarılabilmektedir [64].

Glutasyon S-transferaz enziminin stres koşulları etkisiyle uyarılması sonucu, enzimin aktif bölgesindeki iki bağlayıcı bölge, substrat-GSH bağlantısını sağlamaktadır. Bu bölgeler GSH'nin bağlandığı G bölgesi ve hidrofobik elektrofillerin bağlandığı H bölgesinden oluşmaktadır [65,67]. Birçok fotosentetik organizmada substrat-GSH bağlantısı vakuolde gerçekleşmektedir [68]. Fakat bazı durumlarda substratın elektrofilik özelliği yüksek olabilmektedir ve bu durum substratın kendiliğinden GSH'a bağlanmasını sağlamaktadır. GST'nin bu tepkimedeki rolü ise, substrat-GSH bağlantısını hızlandırmaktır [65]. Hidrofobik bileşenler [68], endobiyotik ve ksenobiyotik substratlar GST katalizörlüğünde GSH'a bağlanmaktadır. Bunun bir sonucu olarak hücrelerin ve organizmaların klinik ilaçlara, antibiyotiklere, insektisitlere, herbisitlere, organik kirleticilere ve doğal toksinlere karşı direnç mekanizmaları gelişmektedir. Bu şekildeki substrat-enzim etkileşimi ile GST'ler, hücrenin detoksifikasyonunu sağlamaktadır [66,67].

**1.6 Total Tiyol (T-SH), Non Protein Tiyol (NP-SH) ve Protein Bağlı Tiyol (PB-SH)**

Tiyol grupları, proteinlerin tersiyer ve kuaterner yapılarının oluşumu için gerekli olan disülfid bağlarının oluşumunda, enzimlerin antioksidan aktivitelerinde, ROT'ların ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda önemli bir role sahiptir [69]. Proteinler tiyol grupları içerir ve ROT'lara maruz kaldıklarında birincil, ikincil veya üçüncül yapılarında modifikasyonlar oluşabilir. Canlı vücudunda bulunan plazma proteinlerinin ROT'lara maruz kalıp kalmadığı, yapılarında bulunan sülfidril ve karbonil grupları ölçülerek belirlenebilmektedir [70]. Tiyoller, GSH gibi düşük molekül ağırlıklı hücre bileşenlerinin ve sadece indirgenmiş durumda etkili olabilen birçok enzim aktivitesinin indüksiyonunu da sağlarlar [71].

Tiyoller genel olarak, bulunduğu bileşiklerin moleküler ağırlıklarına göre, düşük moleküler ağırlıklı tiyoller ve yüksek moleküler ağırlıklı tiyoller şeklinde iki gruba ayrılabilir [69]. Düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı tiyoller ve diğer moleküller arasındaki biyokimyasal etkileşimler hakkındaki bilgiler yetersiz olmasına rağmen, şu ana kadar yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, tiyollerin bitkilerin abiyotik stres toleransında merkezi bir rol oynadığını göstermektedir (Şekil 1.8) [72].



Şekil 1.8 Bitkilerde abiyotik stres toleransında tiyollerin rollerine genel bakış [72]. Abiyotik stres toleransının potansiyel rolleri ve önemi, SH-ürünleri yanındaki mavi dairelerle, potansiyel zararlı bileşikler ise kırmızı ve ürünleri yeşil yazı tipinde gösterilmiştir. Met, metiyonin; Cys, sistein; Trx, tiyoredoksin; Grx, glutaredoksin; PCs, fitoşelatinler; PCS, fitoşelatin sentetaz

Düşük molekül ağırlıklı tiyollerin serbest sistein, metiyonin ve GSH gibi tiyoller ile bunların öncülleri ve homologları olduğu tahmin edilmektedir [69]. Düşük moleküler ağırlıklı olan bu moleküllerde, bitkiler için gerekli olan altı makro elementten biri olan kükürt bulunmaktadır. Sistein molekülünde bulunan ve tiyol olarak adlandırılan kükürt grubu, nükleofilik (elektron verici) bir bileşiktir. Bu bileşik biyolojik redoks tepkimelerinin yürütülmesinde oldukça önemli bir rol

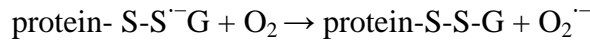
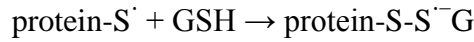
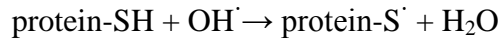
oyunmaktadır. İki sistein aminoasidi oksitlendiğinde, aralarında kolayca kırılabilen kovalent bağlı bir disülfür bağı oluşturabilirler. Ditiyol-disülfür şeklindeki bu oluşum, bitkiler dahil tüm yaşam formlarında gözlenebilmektedir. Bu tepkime, redoks tepkimelerinin kontrolünü sağlayarak canlıları oksidatif hasara karşı korumaktadır [73]. Bu tür biyolojik tepkimelerde oluşan tiyol grupları, organizmanın oksidatif hasara maruz kaldığını göstermektedir.

Düşük moleküler ağırlıklı diğer bir tiyol olan metiyonin ise bitki hücrelerinde üretilebilen ancak hayvanlar tarafından dışarıdan alınan temel aminoasitlerdendir. Metiyonin de sistein gibi ROT'lara maruz kalabilir ve bunun sonucunda metiyonin, metiyonin sülfokside (MetO) oksitlenebilir. Bu durum proteinlerin aktivitelere ve üç boyutlu yapılarında değişikliklere neden olabilir [74]. MetO'nun, metiyonine indirgenmesi sitozol ve plastitlerde bulunan ve ROT'ları elimine eden Metiyonin Redüktaz tarafından sağlanır. Sisteinin aksine bitki hücrelerinde metiyoninin, kuraklık ve osmotik stres gibi faktörler nedeniyle biriktiği tahmin edilmektedir. Metiyonin aynı zamanda oksidatif stres koşullarında oluşabilen çeşitli poliaminlerin sentezinde bir substrat kaynağı olarak kullanılmaktadır [72]. Kuraklık, tuzluluk, UV, soğuk, sıcak, ozon, herbisit, yaralanma gibi hemen hemen bütün abiyotik stres koşullarında poliaminler sentezlenerek bu tür faktörlere karşı bitkiler direnç gösterebilmektedir [72,75]. Metiyoninin en önemli özelliği ise sentezi sırasında kükürdün kullanılmamasıdır. Dolayısıyla kükürtün sınırlı olduğu koşullarda da sentezlenebilmektedir [72].

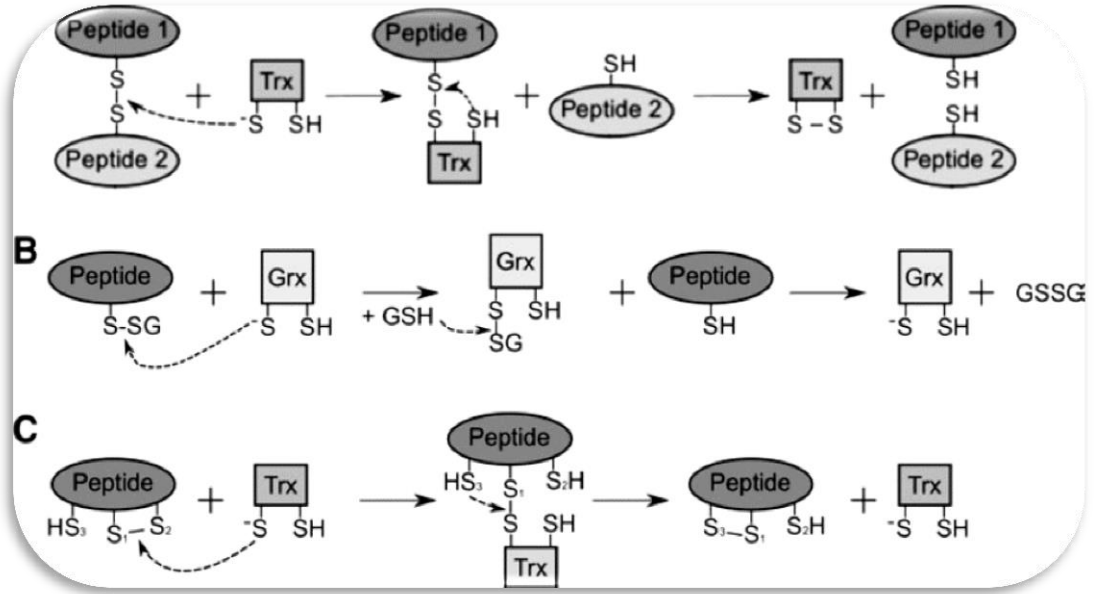
Düşük moleküler ağırlıklı bir diğer tiyol olan GSH, glutamik asit (Glu), sistein (Cys) ve glisin (Gly) olmak üzere üç temel aminoasitten oluşan ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) bir tripeptittir [47]. Alg, mantar ve tohumlu bitkilerde redoks tepkimelerinde tampon bileşik olarak çok önemli bir görevi vardır. Yapısında bulunan tiyol grubu, metalleri kendine bağlayarak organizmayı oksidatif strese karşı korumaktadır [76]. Aynı zamanda proteinlerdeki tiyol gruplarını da oksidatif hasardan korur [69]. GSH'daki bazı yapılar ağır metallerle konjugasyon yapar ve bu şekilde oluşan bileşiklere fitoşelatin denir. Fitoşelatinler, GSH kaynaklı ağır metal bağlayıcı [39] peptitlerdir ve genel yapısı da ( $\gamma$ -Glu-Cys)<sub>n</sub>-Gly ( $n = 2-11$ ) şeklindedir. Ağır metale maruz kalan bitkilerde, fitoşelatinlerin sentezi artar ve bu durum GSH'ın

tükenmesine neden olur [77-79]. Böyle durumlarda aminoasit bileşenlerinden *de novo* biyosentezi (gerektiğinde kullanılmak üzere üretilen) ile GSH üretilir ve bu şekilde oluşan stres faktörlerine cevap verilir [79]. Örneğin kadmiyuma (Cd) maruz kalan bitkilerde GSH önemli bir rol oynamaktadır. GSH'ın buradaki rolü Cd'la şelat oluşturarak Cd'yi vakuole çekmek ve bitkiyi ROT hasarlarından korumaktır. GSH, çoğu enzimin tiyol gruplarını bu şekilde oksidatif hasardan korumaktadır [80].

Protein moleküllerinde bulunan sülfidril grupları yüksek moleküler ağırlıklı tiyollere karşılık gelmektedir. Bunlardan bazıları kolaylıkla ulaşılabilir tipte bazıları ise az çok protein yapıda gömülü haldedir. Hücre zarında yer alan proteinlerde de bu gruplar bulunur. Bu tiyol grupları birçok biyokimyasal reaksiyonun tam olarak gerçekleşebilmesinde katalizör olarak görev yapan koruyucu moleküllerdir. Eğer bir tiyol grubu, ortamda bulunan bir ROT varlığında oksidasyona uğrarsa, birçok metabolik faaliyeti inhibe ederek hücrelerin savunma potansiyellerini düşürürler [69].



Yukarıdaki reaksiyonlarda olduğu gibi tiyollerin proteine bağlanmasında Trx ve Grx'ler önemli bir rol oynar. Trx ve Grx'ler, bakterilerden (*Escherichia coli*) yüksek yapılı bitki ve hayvanlara kadar birçok organizmada, oksidatif stres koşullarında oluşan, protein temelli koruyucu mekanizmalardandır. Her iki protein de sistein kalıntısı içeren tiyol oksidoredüktazlardır. Grx, GSH'ı doğrudan GSSG'ye oksitlerken, Trx bunun için farklı redüktazlara ihtiyaç duyar. Sitolik ve mitokondriyal Trx, NADPH'ye bağlı Trx Redüktaz katalizörlüğünde, plastidik Trx ise ferrodoksin/Trx Redüktaz katalizörlüğünde çalışır. Her iki oksidoredüktazın ifadenmesini sağlayan gen sayısı türden türe farklılık gösterebilmektedir. Osmotik stres, tuz stresi ve ağır metal stresi gibi çeşitli abiyotik faktörlerin etkisinde, Trx ve Grx'in miktarları artarak bitkiler oksidatif hasardan korunmuş olurlar [72] (Şekil 1.9).



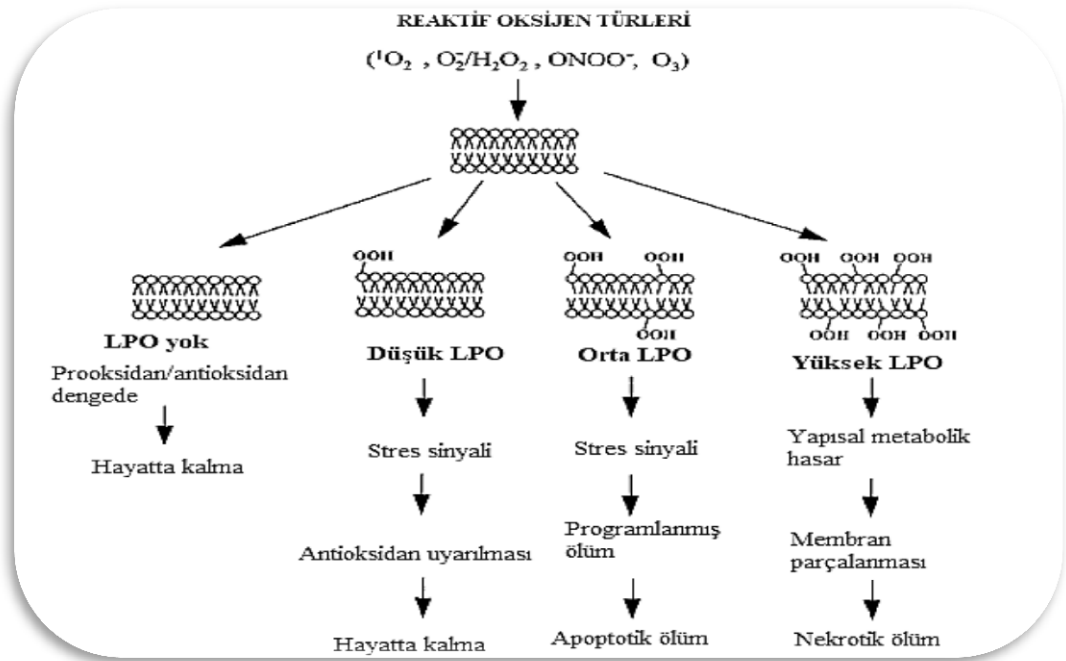
Şekil 1.9 Trx ve Grx'in indirgeyici mekanizmaları [81] A. İki peptidil sistein arasındaki disülfid köprüsünün Trx ile indirgenmesi. Reaksiyonun tamamlanması için hem katalitik sistein, hem de Trx sisteini gereklidir. B. Grx tarafından hedef proteinin yeniden glutatyonilasyonu. Bu tepkimede sistein ve GSH gereklidir. C. Hedef proteinin Trx ile izomerleştirilmesi. Bu tepkime için ise katalitik sistein gereklidir

### 1.7 Lipit Peroksidasyonu (LPO)

Oksidatif stresin ürünü olan malondialdehid (MDA), ROT'lar tarafından, doymamış yağ asitlerinin bozunumu ile oluşan ve LPO'nun belirteci olan organik bir bileşiktir [82]. Bu bileşik, biyolojik sistemlerdeki çoklu doymamış yağ asitlerinin, serbest radikaller tarafından oksidasyona uğraması sonucu oluşan bir ürün olarak da tanımlanmaktadır [83]. Birçok araştırmacı, herbisit, ksenobiyotik, ağır metal ve tuz gibi çeşitli kimyasallara maruz kalan bitkilerde, MDA seviyelerinin hücre zarı LPO sonucu arttığını tespit etmiştir ve bu durumu fizyolojik stres ve yaşlanmanın bir göstergesi olarak kabul etmişlerdir [84-87].

Peroksidasyon reaksiyonlarıyla oluşan MDA ve hücre zarında bulunan proteinlerin etkileşimi, molekül içi ve moleküller arası proteinlerin çapraz bağlanmalarına neden olur ve bu durumda biyolojik zarlar ciddi bir şekilde zarar görür [84]. Oksidatif stres koşulları altında hücre zarlarının ve yapısında lipit bulunan yapıların lipit peroksidasyonu ile bozunması sonucunda ise bazı ara ürünler

oluşmaktadır. Bu ara ürünlerden biri olan lipid hidroperoksitleri (LOOH'ler); doymamış fosfolipitler, glikolipitler ve kolesterolün HO<sup>•</sup>, lipid oksil (LO<sup>•</sup>) veya peroksil radikalleri (OLOO<sup>•</sup>) ile singlet oksijen, ozon (O<sub>3</sub>) ve peroksinitrit (ONOO<sup>•</sup>) gibi reaktif olmayan türlere maruz kalmalarıyla oluşmaktadır [88]. Bu tür serbest radikallere ve reaktif olmayan türlere maruz kalan katı ve sıvı yağların oksidasyonu, bu yağların renk, koku, tat ve yapı gibi bazı karakteristik özelliklerinin değişimine neden olmaktadır. Yağların yapısında meydana gelen bu tarz değişimler, herhangi bir dokuda LPO olduğunu gösterir.



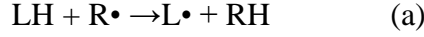
Şekil 1.10 ROT kaynaklı hücre zarı lipid peroksidasyon durumları [88]

Antioksidan savunmanın yetersiz kaldığı durumlarda, çoklu doymamış yağ asitlerinde zincirleme oksidasyon tepkimeleri görülür. Lipid peroksidasyonu, reaksiyonu başlatan ilk molekülün oluşumu, reaksiyon zincirinin başlaması, yayılması, dallanması ve sonlandırılması şeklinde devam eden karmaşık bir sistemdir [89].

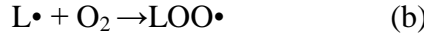
Lipid peroksidasyon zincir reaksiyonları, serbest bir radikal tarafından doymamış yağ asidindeki (LH) metilen grubundan hidrojen atomunun koparılması



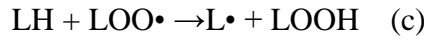
ile başlamaktadır. Hidrojen kaybeden yağ asitleri radikal lipit (L•) formuna dönüşür (a reaksiyonu).



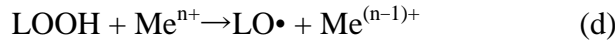
Lipit radikalleri ise oksijenle hızlı bir şekilde birleşerek lipit peroksil radikallerine (LOO•) döner (b reaksiyonu).



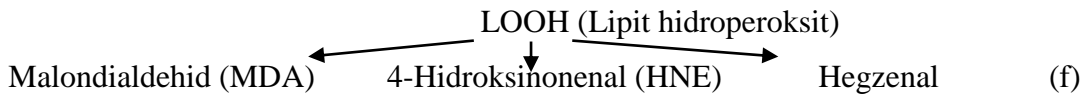
Oluşan peroksil radikalleri, zircirdeki diğer doymamış yağ asitlerinden hidrojen kopartır ve lipit hidroperoksitleri oluşur (LOOH) (c reaksiyonu).



Bu tepkime sonucu oluşan lipit hidroperoksitler kısmen kararlıdır. Fakat ortamda geçiş elementi metal iyonları bulunduğu anda, LOOH, bu metal iyonları ile tepkimeye girerek LPO'yu tekrardan başlatabilecek serbest radikallerin oluşumuna neden olabilir (d-e reaksiyonları).



Katalitik metal iyonlarının varlığında veya yokluğunda oluşan lipit hidroperoksitleri yeni radikal oluşumunun yanı sıra (lipit peroksit, siklik peroksit ve siklik endoperoksit), LPO'nun son ürünleri olan malondialdehid (MDA), 4-hidroksinonenal (HNE) ve hegzenal gibi aldehit oluşumuna da neden olur (f reaksiyonu).



Oluşan bu aldehitler LPO'nun bir belirtisi olmakla birlikte toksik olabilmektedir [89,90].

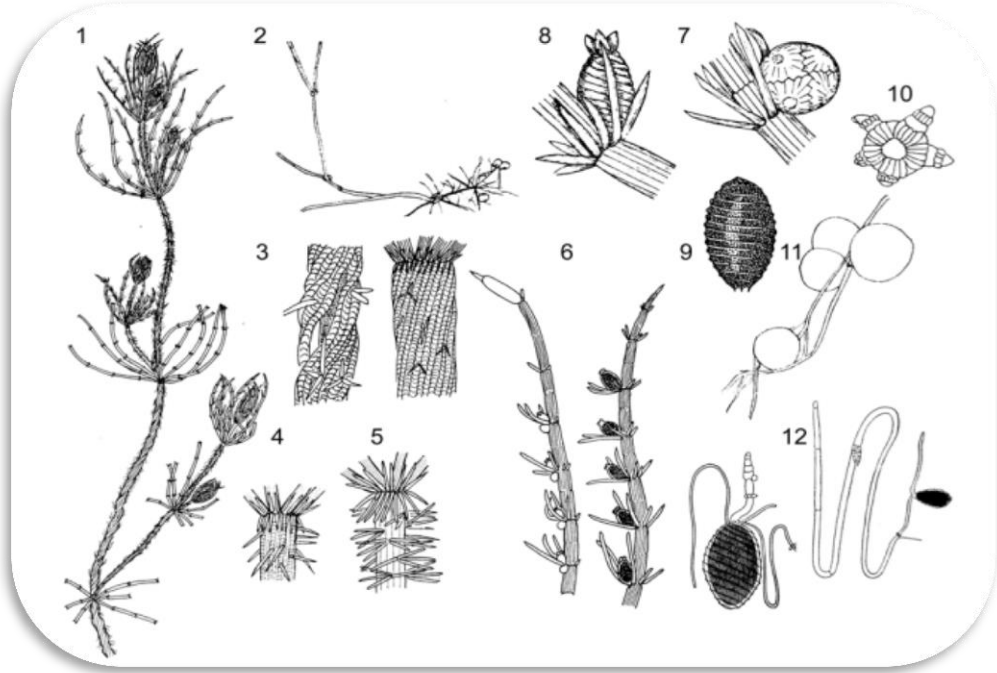
### 1.8 *Chara contraria* (Linnaeus, 1753)'nın Genel Özellikleri

Charales ordosu üyeleri, dünya çapında sığ ve yavaş akan, acı ve tatlı sert su habitatlarında dağılış göstermektedir [91]. Genellikle yaprak, kök veya çiçek gibi tipik doku ve organları olmayan, çok hücreli tallus yapılarına sahip, yeşil algler grubundandır. Makroskobik tallusa sahip olan üyeleri bir metreden daha fazla

uzunluğa kadar büyüebilmektedir [92]. Sürgün sistemi elemanları zemine, hücre turgor basıncı etkisiyle dik pozisyonda büyümelerini sağlayan rizoidlerle bağlanır. Tallusun nod ve internodlara farklılaşmasıyla birlikte, apikal büyümeyi sağlayan kompleks bir morfolojileri vardır [93] (Resim 1.1). Bunlara sualtı çayırları da denilmektedir. Sığ sularda oluşan charophytes çayırları, fitoplanktonların büyümesini engellemekle birlikte su kalitesini ve özellikle de berraklığı olumlu yönde etkilerler [94].

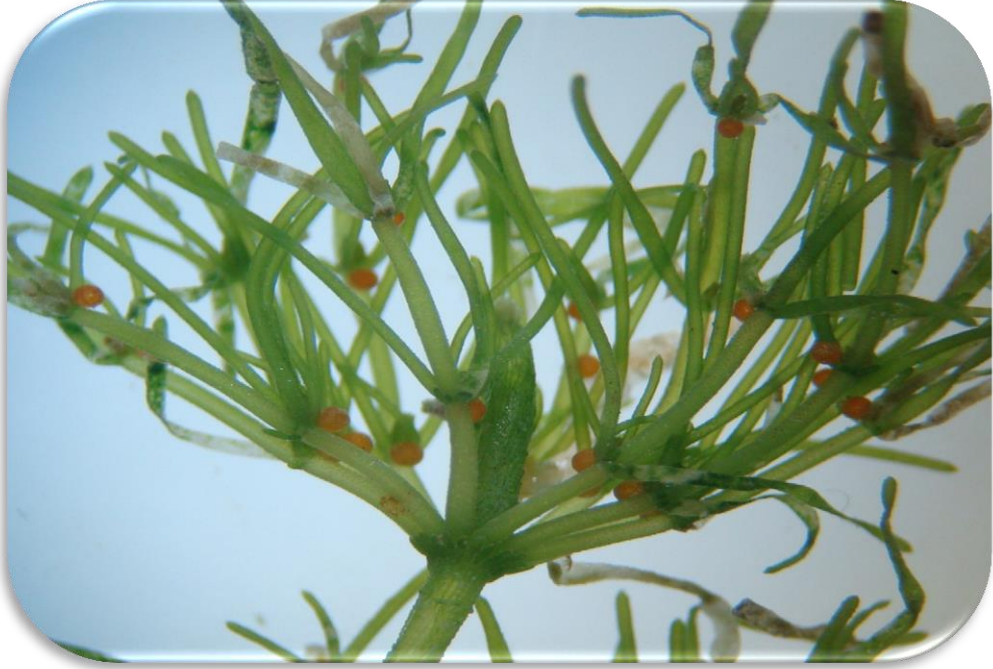
Characeae ailesinin, *Chara* LINNAEUS, *Lamprothamnium* J. GROVES, *Nitellopsis* HY, *Lychnothamnus* (RUPR.) LEONHARDI, *Nitella* AGARDH ve *Tolypella* (A. BR.) LEONHARDI olmak üzere altı cinsi bulunmaktadır. Bu sınıflandırma, tallus morfolojisi ve üreme yapıları dikkate alınarak yapılmaktadır [94]. Characeae üyeleri, oospor adı verilen etrafı kalın duvarlı, olumsuz koşullara dayanıklı zigot üretebilirler. *Nitella* ve *Chara*, Characeae sınıfının en yaygın olan iki cinsidir [95].

Su kalitesinin sürdürülmesinde, bu organizmaların denitrifikasyonu artırmaları ve zooplanktonlar için barınak oluşturmaları gibi faktörler çok önemlidir. Temel olarak fitoplanktonlarla ışık ve besin açısından rekabete girdiklerinden ve ayrıca salgıladıkları allelokimyasallar nedeniyle su çiçeklenmesine neden olan (water bloom) fitoplankton çoğalmasını baskı altında tutarlar [96].



Resim 1.1 Charales ordosunun morfolojik özellikleri [93]

1. Tallus, ana dal, dalcık ve internodların toplamı olan düğümlerden oluşur,
2. Bazal kısmı rizoidlerden oluşur,
3. Sapın yüzeyi kortikal ve omurga hücreleri ile kaplıdır,
4. Stipuloid hücreler nodlardaki branklet (düğüm) temel alınarak düzenlenmektedir. Bunlar tek (4) veya
5. Kümeler içinde korteksten oluşurlar,
6. Eşaysız üreme organları;
7. Anteridia,
8. Oogonia,
9. Olgun oogonia kahverengi veya siyah renklidir ve sadece bir yumurta hücresi içerirken, anteridia parlak turuncu renktedir (Resim 1.2). Koruyucu hücreli zigot, döllenme sonrası oluşur. Başka bir üreme türü, her iki branklet kompleksinden kaynaklanan özel vejetatif dalcıkların veya beyaz yıldız şeklinde yapıların (10) veya küresel yapıların (11) kullanılması şeklindedir. 12 ise protallus adı verilen procharadır [94].



Resim 1.2 Anteridiaların stereo binoküler mikroskop görüntüsü

*Chara* türleri bir cm'den başlayıp bir metreden daha fazla uzunluğa kadar büyüebilmektedir. Damarlı bitkilerin aksine yüzeylelerinde  $\text{CaCO}_3$  biriktirebilme özellikleri bulunmaktadır (Resim 1.3). Bu özelliklerinden dolayı kuru ağırlıklarının %20 ile %70 kadarı  $\text{CaCO}_3$ 'tan oluşabilmektedir. Örneğin *C. rudis* ile yapılan bir çalışmada [92], en fazla kalsiyum karbonatın biriktirildiği ve kuru biyokütlerdeki en büyük artışın Haziran-Temmuz aylarında olduğu tespit edilmiştir.

*Chara contraria*, Charales ordosu içerisinde yer alan, küçük çaplı ve az dallanma gösteren, eşit uzunlukta iplikciklerden oluşan, tatlı su ekosistemlerinin sınırları boyunca büyüyen ve su altı çayırları oluşturabilen yaygın, tek yıllık bir makroalg türüdür [92,97]. Tallusları makroskobik büyüklükte ve 120 cm'ye kadar çıkabilmektedir. Korteks, tilakonthus (primer kortekste spin şeklinde çok hücreli yapı) ve diplostikus (ana kortekste sekonder dallanma yapısı) yapıdadır. Spin hücreleri genellikle kısa veya papilla formundadır. Gri, kahverengiden koyu yeşile uzanan, 5–20 cm boyunda ince bir tutunma yapısına ve iki sıralı kısa stipulodlara sahiptir [93,94]. Çoğu türü tek yıllık olmasına rağmen çevresel şartların uygun olduğu durumlarda kış mevsimini de atatabilirler. Genellikle su altı vejetasyonunun

baskın türüdür ve bundan dolayı da sucul habitatlara, diğer abiyotik ve biyotik faktörlerden daha fazla oranda karbonat katkısında bulunurlar [92]. *Chara contraria* türü ülkemizde olduğu gibi, Avrupa’da da her yerde yayılım gösteren kozmopolit bir türdür. Kalsiyum bakımından zengin, zemini kum veya çamur olan tatlı su kaynaklarında ve hatta acı su ekosistemlerinde de yaşayabilmektedir. Ayrıca 2000 metreden 3700 metreye kadar olan tatlı su sistemlerinde de tespit edilmiştir [98].

*C. contraria*’nın taksonomideki yeri;

Domain:	Eukaryota
Alem:	Plantae
Şube:	Charophyta
Sınıf:	Charophyceae
Takım:	Charales
Familiya:	Characeae
Cins:	<i>Chara</i> Linnaeus, 1753
Tür:	<i>Chara contraria</i> A. Braun ex Kützing 1845 [99].



Resim 1.3 *C. contraria*'nın genel görüntüsü ve kalsiyum karbonat absorbe eden korteks tüpleri [99]

**1.9 Çalışmanın Amacı**

Tarımda ürün verimini artırmak amacıyla kullanılan tribenuron metil, tarımsal sulara ve oradan doğal sulara karışabilmektedir. Oldukça toksik olan bu herbisit karıştığı sucul ekosistemlerde amonyağın varlığı ile birlikte daha da toksik olabilmektedir. Bu kombine toksik etkiyi belirleyebilmek için daha önce yapmış olduğumuz çalışmalarda, biyolojik arıtım kapasitesinin iyi olduğu tespit edilen *C. contraria* [100] makrofitinin kullanımının uygun olabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışma ile tribenuron-metil ve amonyağın farklı derişimlerinin birlikte ve ayrı etkisinde bırakılan *C. contraria*'daki savunma sisteminin aktif hale gelip gelemeyeceği ve dolayısıyla ortamda kirleticilerin varlığında nasıl bir tepki verebileceği araştırılmış olacaktır. Çalışmamızdaki temel amaç; *C. contraria*'da herbisit tribenuron metil ve amonyağın farklı derişimlerinin tek başına ve birlikte verildiklerinde subakut etkisinin;

- a. Askorbat peroksidaz (APx; EC 1.11.1.11),
- b. Dehidroaskorbat redüktaz (DHAR; EC 1.8.5.1),
- c. Glutasyon peroksidaz (GPx; EC 1.11.1.9),
- d. Glutasyon S-transferaz (GST; EC 2.5.1.18) enzim aktiviteleri ile non-enzimatik olan;
- e. Total tiyol (T-SH),
- f. Non-protein tiyol (NP-SH)
- g. Protein bağlı tiyol (PB-SH) miktarları ve LPOnun göstergesi olan;
- h. Tiyobarbiturik Asit Reaktif Maddeler (TBARS) ve
- i. Protein miktarları üzerine olan etkilerini araştırmaktır.

**2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR**

Makroalgler çeşitli biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı enzimatik ve enzimatik olmayan savunma sistemlerine sahiptirler. Yapılan çalışmalarda enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan seviyeleri çalışılmış ve analiz edilen antioksidanların, organizmaların yaşam döngülerindeki önemi belirtilmiştir.

Oxyfluorfen ve diuron herbisitlerine maruz bırakılan mikroalg *Scenedesmus obliquus*'ta [101] enzimatik antioksidan seviyeleri ölçülmüştür. Bu mikroalg türü, her iki herbisit 15 µg/L ve 22.5 µg/L derişimlerine 24 saat boyunca maruz bırakılmıştır. Uygulanan derişimler çok düşük olmasına rağmen (<25 µg/L), büyüme inhibisyonunun görülmesi her iki derişimin mikroalg için çok toksik olduğunu göstermiştir. Oxyfluorfenin yüksek derişiminin GST aktivitesinde kontrole göre %76 oranında, APx seviyesinde oxyfluorfenin her iki derişiminin etkisi ile kontrole göre sırasıyla %19 ve %29 oranlarında artışa neden olduğu görülmüştür. Diuron uygulamasında ise düşük derişimin GST aktivitesini kontrole göre daha fazla oranda artırdığı, APx aktivitesinde ise bir değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir.

Coors ve ark. [102] çalışmalarında, *C. globularis* ve diğer bazı makrofitleri terbuthylazine (TBA) herbisitine maruz bırakmışlardır. TBA'nın yüksek derişimlerinin yapraklanma, kuru ağırlık ve filiz uzunluğunu önemli ölçüde azalttığı, düşük derişimlerin ise artırdığı gözlenmiştir. Ayrıca düşük derişimlerin klorozise neden olduğu ve antosiyanin üretimini azalttığı, yüksek derişimlerin ise bu durumun tersi etki yaptığı tespit edilmiştir.

*Lemna minor* makrofiti ve *S. obliquus* mikroalgi üzerinde herbisit flumioxazinin etkileri çalışılmıştır. *L. minor* için 3.6 µg/L, *S. obliquus* için 3 µg/L derişimleri kullanılmış ve her iki organizmada da 48 saatlik muameleden sonra herbisit %50 oranında büyüme inhibisyonuna neden olduğu tespit edilmiştir. Aynı sürede total pigment içeriği, mikroalgte %53, makroalgte ise %40 oranında azalmıştır. *S. obliquus*'te APx, GR ve CAT enzim aktiviteleri 6 saatten sonra artarken zaman artışına bağlı olarak aktiviteleri inhibe edilmiştir. *L. minor*'da ise CAT, APx ve GR enzim aktiviteleri 48 saat sonra, sırasıyla %56.28 ve %58'e ulaşmıştır [103].

Garanzini ve Menone [104], AZX fungusitinin, sucul makrofit *Myriophyllum quitense*'de neden olduğu oksidatif stres ve DNA hasarı çalışmışlardır. *M. quitense* 24 saat boyunca AZX'in farklı derişimine maruz bırakılmıştır. GST aktivitesinde kontrole göre önemli bir değişiklik gözlenmezken CAT ve POX aktivitelerinin inhibe edildiği bildirilmiştir. Kontrole kıyasla 50 ve 100 µg/L'de hem LPO hem de DNA hasarı 3 kat daha yüksek bulunmuştur.

Glyphosate herbisitinin *Pouteria torta* ağacı üzerindeki etkisi çalışılmıştır. Glyphosate artışıyla birlikte, MDA içeriğinde artış, protein, aminoasit ve fenolik bileşen miktarlarında ise azalma bildirilmiştir. Ayrıca herbisit derişiminin artışı yapraklarda klorozis ve nekroza neden olmuştur [105].

Glyphosate herbisiti ve bakırın ayrı ayrı ve birlikte uygulandığında *Salvinia natans*'in büyümesi ve antioksidan enzimler üzerindeki etkileri çalışılmıştır. Bitki 7 gün boyunca sadece Cu'ya maruz bırakıldığında, Cu'nun düşük derişimlerinde, kontrole kıyasla daha az yaprağın sarardığı, yüksek derişimlerde ise daha çok yaprağın sarardığı tespit edilmiştir. Aynı etki glyphosatenin tek başına uygulandığı gruplarda da gözlenmiştir. Fakat ikisi birlikte yüksek derişimlerde uygulandığında, sarı yaprak sayısında önemli ölçüde artış görülmüştür. Aynı şekilde glyphosate-Cu karışımı yüksek derişimlerinin yaprak sayısını %73-93 oranında azalttığı, büyümeyi de önemli oranda inhibe ettiği rapor edilmiştir. Glyphosate-Cu karışımının en yüksek derişiminde, çoğu bitkinin solduğu ve bu nedenle de taze ağırlığın ölçülemediği bildirilmiştir. Yüksek Cu ve düşük glyphosate derişimleri, klorofil pigmentlerini ve MDA içeriğini artırırken yüksek glyphosate klorofil, karoteneoid ve MDA içeriğini azaltmıştır. Kombine stres koşulunda MDA içeriği artarken en yüksek glyphosate-Cu derişiminde azalmıştır. Cu ve herbisit tek başına ve ikisinin karışımı şeklindeki yüksek derişimler APx aktivitesini artırırken düşük derişimler etkilememiştir [106].

Herbisit paraquatın (PQ) eğrelti otu *Azolla microphylla*'daki bazı parametreler üzerine olan etkileri değerlendirilmiştir. Paraquatın yüksek derişimlerinin 24 saatlik dilimlerinde yaprak renginin yeşilden kahverengiye dönüştüğü ve 48 saatten sonra da bitkinin öldüğü görülmüştür. Maruz kalma süresinin artışıyla birlikte farklı PQ derişimlerinin uygulanması, protein içeriğinde



sürekli bir düşüşe yol açmıştır. PQ derişim artışı zamana bağlı olarak MDA içeriğini ve GPx, APx aktivitesini de artırmıştır [107].

Mitsou ve ark. [108] çalışmalarında propanil herbisidinin *L. minor*'un antioksidan enzim ve büyüme oranı üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Makroalg 24 gün boyunca herbisite tabi tutulmuştur. *L. minor*'un enzimatik antioksidanlarında (GPx ve GST) kontrole kıyasla önemli derecede bir değişiklik gözlenmemiştir. Bunun yanında propanilin düşük derişimleri yaprak sayısını ilk günlerde artırırken ilerleyen günlerde azaltmıştır. Aynı şekilde büyüme oranı önemli derecede azalmış ve yaprak rengi de sarıdan beyaza dönmüştür.

Norflurazon herbisitinin 6 farklı derişiminin *L. minor* yaprak üretimi üzerindeki etkisi çalışılmıştır. Makrofit 10 gün boyunca herbisit 10, 25, 50, 100, 250 ve 250 µg/L derişimlerine maruz bırakılmıştır. Yapraklardaki azalma oranları kontrole kıyasla; %41 (25 µg/L), %59 (50 µg/L), %83 (100 µg/L), %97 (250 µg/L) ve %100 (500 µg/L) şeklindedir. Herbisit kültür ortamından uzaklaştırılmasıyla birlikte yaprak üretiminde yeniden artış tespit edilmiştir [109].

*Lemna. minor* ile yapılan başka bir çalışmada atrazin herbisidinin etkisi araştırılmıştır. Bitki 7 gün boyunca herbisite maruz bırakılmış ve yaprak sayısı, biyomas ve klorofil etkinliği ölçülmüştür. Kontrole oranla yaprak sayısı, biyomas ve klorofil miktarları sırasıyla %53.9, %44.6 ve %2.3 oranlarında düşmüştür [110].

Azoxystrobin dünya çapında yaygın olarak kullanılan bir fungusittir. Sucul makrofit *M. quitense*, fungusitin 1–10 µg/L ve 100–500 µg/L derişimlerine maruz bırakılmıştır. GST aktivitesi 1–10 µg/L derişimlerinde önemli oranda yükselirken CAT ve POD aktivitesinde düşüş tespit edilmiştir. Analiz edilen hiçbir derişimde toplam klorofil, klorofil-a, klorofil-b ve klorofil a/b oranlarında kontrole göre önemli bir fark gözlenmemiştir [111].

Tarımsal alanda geniş çapta kullanılan atrazin herbisitinin su altı makrofiti *Potamogeton perfoliatus* üzerindeki etkileri araştırılmıştır [112]. Uygulamalar; 0.13-0.14 mg/L düşük derişim ve 1.10-1.31 mg/L yüksek derişim olacak şekilde ayarlanmıştır. Uygulanan düşük derişimlerde 4. haftaya kadar fotosentezde önemli azalmalar gözlenirken sonraki haftalarda fotosentez oranlarında tekrardan artış görülmüştür. Yüksek derişimlerde ise fotosentez olumsuz etkilenmiştir. Fotosentezin

aksamasına bağlı olarak kuru biyokütlede önemli azalmalar tespit edilmiştir. Ayrıca kontrol ve düşük derişim uygulanan gruplarda, yaprak sürgünlerinde 6. haftaya kadar artış gözlenirken 6. haftadan sonra değişiklik gözlenmemiştir. Internodyumlar arası uzunluk ise yüksek derişim uygulanan gruplarda %38 oranında artarken düşük derişim uygulanan gruplarda daha az olmuştur. Ortalama kök uzunluğu da her iki uygulamada 2. haftadan sonra artmıştır.

*Brassica napus* ile yapılan bir çalışmada [31], bitkiye farklı derişimlerde tribenuron metil uygulaması yapılmıştır. Tribenuron metile maruz bırakılan bitkilerin boyları, kontrol bitkilerine kıyasla azalmıştır. >0.2 µg/ml tribenuron metil uygulanan bitkilerde çiçeklenmenin başlaması 2–8 gün gecikmiş ve tüm uygulamalarda bu etki gözlenmiştir. Ayrıca üst yapraklarda kloroza ve çiçek renginde solmaya neden olmuştur.

Kieloch ve Domaradzki [33] yaptıkları bir çalışmada, *Anthemis arvensis* L., *Chenopodium album* L. ve *Stellaria media* L. yabancı otlarına karşı mücadelede tribenuron metili spreyci formunda kullanmışlardır. Bitkilerin 2-4, 6-8 ve 10-12 yapraklı formları üzerinde uygulama yapılmıştır. Derişim miktarından bağımsız bir şekilde tribenuron metil, *A. arvensis*'in en genç bitkilerinde biyokütleyi %91-96 oranında azaltmıştır. Ayrıca düşük kimyasal düzeyi ve bitki yaşının büyük olması nedeniyle de bitki biyokütlesindeki azalma düşmüştür.

Wang ve ark. [113] yaptıkları çalışmada, NO donörü olan SNP varlığında (10 µM), makroalg *Hydrilla verticillata*'yı amonyum stresine (3 mM amonyum klorid) maruz bırakmışlardır. SNP ile muamelede *H. verticillata* üzerindeki koruyucu özelliği araştırılan NO içeriği artmıştır. Membran hasarının oluşmasına ve klorofil, MDA, GSH ve AsA seviyelerinin azalmasına neden olan amonyum kaynaklı olumsuz etkilerin miktarı artan NO ile elimine edildiği ifade edilmiştir. Ayrıca APx, SOD, NADPH-oksidaz ve GST enzim aktivitelerinde artış olmuştur.

Caicedo ve ark. [114] su mercimeği *Spirodela polyrrhiza* ile yaptıkları çalışmada, büyüme ortamına azotun NH<sub>3</sub> ve NH<sub>4</sub><sup>+</sup> formlarını ekleyerek, farklı pH değerlerinde büyüme üzerindeki etkilerini incelemiştir. Amonyak derişimi ve pH değerlerinin artmasının büyüme inhibisyonuna neden olduğu bulunmuştur. Amonyak derişiminin düşük olması durumunda büyüme oranında önemli boyutta azalma

görülmemiştir. Amonyagın neden olduğu büyüme inhibisyonu pH'ya bağlı olarak değişebilmektedir. Amonyagın iyonize olup olmaması ve pH seviyesi bitkilerdeki toksisite mekanizmasını etkileyebilmektedir.

Vines ve ark. [115] yaptıkları bir çalışmada iyonize olmamış amonyagın bitkilerde solunumu %46-62 oranlarında, gaz halindeki amonyagın ise %78 oranında inhibe ettiğini tespit etmişlerdir.

Yüksek amonyak derişimlerinin mikroalg *Tetraselmis cordiformis* üzerindeki toksik etkisinin, indol-3-asetik asit (IAA), zeatin (ZT) ve brassinosteroid (Br) fitohormonları ile giderilmesi araştırılmıştır [116]. MDA içeriğinin, kontrol ile karşılaştırıldığında 2.12 kat arttığı, bununla birlikte amonyak kaynaklı yıkıcı etkilerin, kültür ortamına eklenen ve canlı vücudu dışında, yapay yolla üretilen, eksojen olarak adlandırılan fitohormonların etkisi ile belirgin şekilde azaltıldığı belirlenmiştir.  $\text{NH}_4^+$ e, 50, 200, 500, 800 ve 1000 mg/L derişimlerinde 7 gün maruz kaldıktan sonra, *T. cordiformis*'in büyüme inhibisyonu %2.99, %17.19, %27.24, %34.95 ve %39.44 oranlarında gözlenmiştir. Fitohormonların kültür ortamına eklenmesinden sonra fotosentez, CAT, SOD aktivitesinin ve azot metabolizmasında çok önemli rolü olan glutamin sentaz (GS) geni transkripsiyonunun arttığı belirlenmiştir. Ayrıca klorofil miktarlarının da azaldığı fakat fitohormonların detoksifikasyon özelliği sayesinde tekrardan arttığı ve bunun sonucunda da büyüme inhibisyonunun, miktarı artan fitohormonların detoksifikasyon özelliği ile azaldığı belirlenmiştir.

Zhuang ve ark. [117] yaptıkları çalışmada 0.02 (kontrol), 0.20, 1.00, 2.00, 5.00, 10.0, 15.0 ve 20.0 mg/L  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  derişimlerine maruz bırakılan *H. verticillata* makrofitinin bazı parametrelerini incelemişlerdir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 5 gün boyunca 0.20 ve 1.00 mg/L derişimlerinde  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 'e maruz bırakılan *H. verticillata*'nın sürgünlerinde, MDA içeriğinde önemli bir değişiklik gözlenmezken, 2.00 mg/L'de ise MDA miktarında artış belirlenmiştir.  $\text{O}_2^-$  ve  $\text{H}_2\text{O}_2$  üretimi, sırasıyla  $\geq 2.00$  ve  $\geq 5.00$  mg/ L  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  ile yapılan uygulamalarda önemli ölçüde artmıştır. Düşük  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  ( $\leq 2.00$  mg/L) derişiminde, *H. verticillata*'nın sürgünlerinde SOD, POD, CAT, DHAR ve GR enzim aktivitelerinde değişiklik meydana gelmemiştir fakat yüksek derişimlerde (5.00 ve 10.0 mg/L)

antioksidan enzim aktivitelerindeki artışın önemli olduğu bildirilmiştir. Özellikle APx aktivitesi, derişime bağı olarak doğrusal bir şekilde artmıştır.

Cao ve ark. [118] 0.16–0.25 mg/L NH<sub>4</sub><sup>+</sup> derişimlerinin, *C. demersum*, *M. spicatum* ve *Vallisneria natans* bitkilerinin büyümeleri üzerinde toksik etki yapmadığını belirtmişlerdir. Bu makrofitlerin büyümelerinde amonyağın toksik etki göstermemesinde, kullanılan NH<sub>4</sub><sup>+</sup>'ün belirli bir derişime kadar azot kaynağı olarak kullanması etkili olmuştur. Bazı durumlarda eğer makrofitin metabolik aktivitesi ve toleransı yüksek ise amonyağın bu toksik etkisine karşı makrofit direnç gösterip hayatta kalabilmektedir.

### **2.1. Bitkilerde Antioksidanların Çeşitli Ksenobiyotiklere Yanıtı**

Bertrand ve ark. [119] çalışmalarında, farmasötik ve ağır metallerin *P. pusillus* makrofiti üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Bu kirleticilere maruz kalan ve Temmuz'da örneklenen makrofit yapraklarında GPx aktivitesi saptanmazken, kök ve gövdede enzim aktivitesinin önemli ölçüde inhibe edildiği tespit edilmiştir. Ayrıca Aralık periyodunda toplanan örneklerdeki enzim aktivitesinin yaprakta inhibe edildiği ve kökte ise aktive edildiği gözlenmiştir. Klorofil pigmentlerinin, soğuk iklimde önemli oranda azaldığı ılıman periyotta ise daha az oranda düştüğü tespit edilmiştir.

*Nymphaea tetragona*, uranyumun farklı derişimlerine (5, 30 ve 55 mg/L) 21 gün boyunca maruz bırakılmıştır. Uranyuma maruz kalan bitkinin, kloroplast yapısı ve işlevinin bozulması sonucu fotosentetik performansının azaldığı, yapraklarda çözünür protein ve ayrıca klorofil-a, klorofil-b ve karoten içeriğinin önemli ölçüde inhibe edildiği bildirilmiştir. Bunun yanında POD, SOD, CAT aktivitesinin ve MDA içeriğinin arttığı, hücre membran sisteminin artan uranyum derişimlerine bağı olarak zarar gördüğü rapor edilmiştir [120].

*Lemna minor* ile yapılan başka bir çalışmada 1-octyl-3-methylimidazolium bromide ([C8mim]Br) isimli iyonik bir sıvı kullanılmış ve makrofitin antioksidan enzim kapasiteleri, pigment içeriği ve MDA miktarı analiz edilmiştir. *Lemna. minor* 28 gün boyunca 0.25 ve 2 µg/L derişimlerinin etkisinde bırakılmıştır. Klorofil-a, b ve

karotenoid içeriklerinde 7-14. günlerde kontrole göre önemli değişiklik gözlenmezken 21-28. günlerden sonra derişime bağlı olarak azalma görölmüştür. 0.5–2 mg/L [C8mim] Br uygulanan gruplarda POD aktivitesi, 7-28. günler arasında anlamlı bir artış göstermiştir. Bütün gruplarda kimyasala maruz kalma süresi uzadıkça CAT aktivitesinde azalmanın olduğu tespit edilmiştir. Uygulama grupları ile kontrol grubu arasında 7-14. günler arasında MDA içeriğinde önemli bir fark gözlenmezken 21. günden sonraki artış oldukça önemli olmuştur [121].

*Pistia stratiotes* bitkisi, kromun 0, 10, 40, 80 ve 160 µM derişimlerine 48, 96 ve 144 saat boyunca maruz bırakılmış ve klorofil, protein, MDA, non-protein tiyol, APx ve GPx aktivitelerindeki değişim çalışılmıştır. MDA içeriği kök ve yapraklarda derişime bağlı olarak artmıştır. Kökte APx aktivitesi, bütün derişimlerde 144 saatlik periyotta kontrole kıyasla artmıştır. Kökte GPx aktivitesi 48 ve 96 saatlik muamelede artarken 144 saatte 10 µM'da azalmıştır. Non protein tiyol içeriğinde 40 µM Cr'ye kadar artış kaydedilirken üst derişimlerde azalma gözlenmiştir. Kök ve yapraklardaki protein içeriği, 10 µM derişim ve 48 saat periyodunda artarken diğer bütün derişimlerde zamana bağlı olarak azalmıştır [122].

3-chlorobiphenyl kimyasalının sucul makrofit *Ceratophyllum demersum* üzerindeki etkileri ve detoksifikasyon sisteminin kapasitesi araştırılmıştır. 3-chlorobiphenyl'in 0.005 ve 0.05 µg/L derişimleri GR, mitokondriyal-GST ve sitozolik-GST (c-GST) aktivitelerini anlamlı derecede artırmış fakat GSH üzerinde önemli bir etki yaratmamıştır. 0.5 µg/L derişiminde GR ve c-GST aktivitesi artarken, 5 µg/L'de hiçbir enzim aktifleşmemiştir. Fotosentetik oksijen üretimi ise tüm derişimlerde uygulanan kimyasal tarafından inhibe edilmiştir [123].

**3. MATERYAL ve YÖNTEM****3.1. Materyal**

Çalışmada, kullanılan *C. contraria* makroalgi Adıyaman Durukaynak Köyü yerleşkesinde bulunan havuzdan (37°47'28.1"N-38°07'55.8"E) toplanmıştır (Resim 3.1 ve 3.2). Toplanan örnekler Adıyaman Üniversitesi Biyoloji Bölümü Hidrobiyoloji Laboratuvarı'na getirilmiştir.



Resim 3.1 *C. contraria* örneklerinin alındığı havuz



Resim 3.2 *C. contraria*'nın habitatındaki görüntüsü

Alınan örnekler, çeşme suyu ile yıkanıp ayıklanarak her türlü yabancı maddeden, alglerden ve su böceklerinden arındırılmıştır. Temizlenen örnekler için MBL kültür ortamı [124] hazırlanmıştır. MBL besi ortamı kimyasal içeriği Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 MBL besi ortamı

Stok Çözeltileri	1 L distile su başına	
1. CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	36.76 g	
2. MgSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	36.97 g	
3. NaHCO <sub>3</sub>	12.60 g	
4. K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.71 g	
5. NaNO <sub>3</sub>	85.01 g	
6. Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	28.42 g	
7. Na <sub>2</sub> EDTA	4.36 g	
8. FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	3.15 g	
9. Metal Çözeltisi		Her bir kimyasalı 750 mL distile suda çözdükten sonra son çözelti hacmi distile su ile 1 L’ye tamamlandı.
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.01 g	
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.022 g	
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.01 g	
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0.18 g	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.006 g	
10. Vitamin stok çözeltisi		
B <sub>12</sub> Vitamini	0.0005 g/L dH <sub>2</sub> O	
B <sub>1</sub> vitamini	0.10 g/L dH <sub>2</sub> O	
Biyotin	0.0005 g/L dH <sub>2</sub> O	
11. Tris stoğu	250 g/L dH <sub>2</sub> O	

2000 mL’lik beherler içine 1600 mL distile su eklendikten sonra içerisine 2’şer mL MBL çözeltisi için gereken kimyasalların stok çözeltilerinden eklenmiş ve MBL çözeltisinin pH’sı 7.5’e ayarlanmıştır. Beherlerdeki çözeltiler 2000 mL’lik balon jodelere aktararak saf su ile 2000 mL’ye tamamlanmıştır. Makroalg örnekleri, içerisinde 1600 mL MBL çözeltisi bulunan 6 adet 2000 mL’lik behere, 50 g eklenerek inkübe edilmiştir (Resim 3.3). Hazırlanan kültür suyunun sıcaklığı 24 °C ve ortam pH’ı 7.50’te tutularak standart ışık yoğunluğunda 16:8 saat aydınlık:karanlık periyodunda inkübasyona tabi tutulmuştur [96]. Örneklerin suları 3 gün boyunca günlük olarak değiştirilmiştir. 3. günün sonunda bitki örnekleri kullanılarak deney düzenekleri hazırlanmıştır.



Resim 3.3 MBL besi ortamında *C. contraria* inkübasyonu

Çalışmada toksikant olarak tribenuron metil (IUPAC adı: Methyl 2-[[[N-(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl) methylamino] carbonyl] amino] sulfonyl] benzoate; CAS No: 101200-48-0) herbisidinin ticari formu olan Granstar ile amonyum klorür ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; IUPAC adı: ammonium chloride; CAS No: 12125-02-9, Sigma-Aldrich) uygulanmıştır.

### 3.1.1. Stok Tribenuron Metil Çözeltisinin Hazırlanması

0.0011 g tribenuron-metil tartılarak saf su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Çözelti +4 °C'de kullanılıncaya kadar muhafaza edilmiştir.

### 3.1.2. Kimyasal Maddeler

1. di-Sodyum hidrojen fosfat	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Merck
2. Sodyum di-hidrojen fosfat	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	Merck
3. Etilendiamin tetraasetik asit	EDTA	Sigma -Aldrich
4. di-Potasyum hidrojen fosfat	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	Merck
5. Potasyum di-hidrojen fosfat	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Merck



6. Askorbik asit	ASC	Sigma -Aldrich
7. Hidrojen peroksit	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ISOLAB
8. Redükte L-glutasyon	GSH	Sigma -Aldrich
9. Dehidroaskorbik asit	DHA	Sigma -Aldrich
10. Glutasyon redüktaz	GR	Sigma -Aldrich
11. β-Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat	β-NADPH	Sigma -Aldrich
12. 1-Kloro-2,4-dinitrobenzen	CDNB	Sigma -Aldrich
13. Metanol	CH <sub>4</sub> O	ISOLAB
14. Trikloroasetik asit	TCA	Merck
15. Etil alkol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OH	ISOLAB
16. Polivinilpirolidon	PVP	Sigma -Aldrich
17. Hidroklorik asit	HCl	Sigma -Aldrich
18. Sodyum hidroksit	NaOH	Sigma -Aldrich
19. Tribenuron metil		Du Pont
20. Amonyum klorür	NH <sub>4</sub> Cl	Sigma -Aldrich
21. Tris baz	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	Sigma -Aldrich
22. Tris asit	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	Sigma -Aldrich
23. 5,5'-ditiyo-bis (2-nitrobenzoik asit)	DTNB	Sigma
24. 1,1',3,3'-tetrametoksipropan	TMP	Sigma -Aldrich
25. Sülfürik asit	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Tekkim
26. 2,6-bütilhidroksitoluen	BHT	Sigma -Aldrich
27. 2-Tiyobarbitürik asit	TBA	Sigma -Aldrich
28. Sodyum karbonat	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck
29. Sodyum potasyum tartarat	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> KNaO <sub>6</sub> .4H <sub>2</sub> O	Merck
30. Sodyum dodesil sülfat	SDS	Sigma -Aldrich
31. Folin-Ciocalteu's fenol ayırıcı		Merck
32. Sığır serum albümin	BSA	Sigma -Aldrich
33. Kalsiyum klorür	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Sigma -Aldrich
34. Magnezyum sülfat	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	aber
35. Sodyum bikarbonat	NaHCO <sub>3</sub>	Prolabo
36. Sodyum nitrat	NaNO <sub>3</sub>	Sigma -Aldrich

37. di-Sodyum silisyum trioksit	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	Sigma -Aldrich
38. di-Sodyum etilendiamin tetraasetik asit	$\text{Na}_2\text{EDTA}$	Sigma -Aldrich
39. Demir klorür	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Sigma -Aldrich
40. Çinko sülfat	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sigma -Aldrich
41. Kobalt klorür	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Sigma -Aldrich
42. Mangan klorür	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Sigma -Aldrich
43. Sodyum molibdat	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Prolabo
44. Bakır sülfat	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Merck
45. Aseton	$\text{CH}_3\text{COCH}_3$	Merck
46. Sodyum azid	$\text{NaN}_3$	Sigma-Aldrich

**3.1.3. Cihazlar ve Diğer Gereçler**

1. Analitik terazi	AND HR-250AZ
2. Benmari	Daihan Wisd Wise Bath
3. Buz makinası	İzmaç
4. Homojenizatör	Daihan WiseStir Wisd
5. Otomatik pipet seti	Nichiryo Nichipet EX, Accumax
6. Pipet ucu 200-1000 $\mu\text{L}$	ISOLAB
7. pH metre	Orion-2 Star Thermo-Scientific
8. Soğutmalı santrifüj	Hettich Universal 320R
9. Spektrofotometrik analiz küvetleri	ISOLAB
10. Vorteks	Multi-Mixer MVS-1
11. UV-Visible spektrofotometre	Shimadzu UV1800
12. Distile su cihazı	Millipore Rios 8
13. Mikroplaka okuyucu	BioTek EON
14. Mikroplaka	Greiner
15. Çalkalayıcı	ISOLAB
16. Terazi	Ohaus Scout Pro SPU 6001
17. -86 °C Dondurucu	Thermo Scientific
18. İnkübatör	Daihan Wisd WiseCircu

19. Magnetik karıştırıcı	VELP Scientifica
20. Hava pompası	HDOM
21. 1.5 mL'lik santrifüj tüpü	ISOLAB
22. No-Frost buzdolabı	Altus
23. Bulaşık makinesi	Arçelik

### 3.2 Yöntem

#### 3.2.1. *C. contraria* Örneklerinin Hazırlanması

6 adet 2000 mL'lik beher içerisine 50 g *C. contraria* taze biyokütlesi konulmuştur. Daha sonra beherlerin üzeri şeffaf filmle kaplanarak 24 °C sıcaklık ve 185 µmol/m<sup>2</sup>/sn ışık yoğunluğunda 3 gün boyunca adaptasyon için bekletilmiştir.

Denemelere geçilmeden önce uygulanacak olan NH<sub>4</sub><sup>+</sup> derişimleri, Mayıs ve Haziran 2014'de Eğriçay Deresi'nde ölçülen iki farklı NH<sub>3</sub> ölçümü (0.65 mg/L ve 3.22 mg/L) dikkate alınarak belirlenmiştir. Yapılan arazi gözlemlerinde, tahıl ekimi yapılan Eğriçay Deresi'nin Kırkgöz Pınarı mevkiinde herbisit tribenuron metil içerikli tarım ilacı şişelerine rastlanmıştır. Bölgede hedef olmayan organizmalar için oldukça tehlikeli bir durum oluşturan bu herbisit etkisinin tespit edilebilmesi için, tribenuron metilin amonyakla birlikte etkisinin araştırılmasına karar verilmiştir.

İnkübasyona bırakmış olduğumuz örnek ortamlarındaki 0.65 mg/L ve 3.22 mg/L NH<sub>3</sub> derişimlerini elde edebilmek için MBL çözeltisi içerisine konması gereken NH<sub>4</sub>Cl miktarı US EPA [125] tarafından sağlanan tabloya göre hesaplanmıştır. *Chara contraria* örnekleri 3.22 mg/L NH<sub>3</sub> derişiminde 48 saat içinde sarardıkları için, bunun yerine yarı derişimi olan 1.61 mg/L NH<sub>3</sub> derişimi kullanılmıştır. Amonyak düzeyini hesaplamak için aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır:

$$[\text{NH}_3^+] = [\text{NH}_4\text{Cl}] \times \frac{17}{53.5} \times \text{iyonizasyon katsayısı}$$

17: NH<sub>3</sub><sup>+</sup>'ün molekül ağırlığı (g/mol)

53.5: NH<sub>4</sub>Cl'nin molekül ağırlığı (g/mol)

İyonizasyon katsayısı: Belirli bir sıcaklık ve belirli bir pH'da NH<sub>3</sub>'ün NH<sub>4</sub><sup>+</sup>'e iyonlaşma yüzdesi

Çalışmada kullanılan makrofitin yaşadığı habitatın pH'ı 7.5 ve su sıcaklığı 24 °C olduğundan US EPA tarafından sağlanan tabloya göre, iyonizasyon katsayısı esas alınarak belirlenmiştir. Kültür ortamının pH'ı NH<sub>4</sub>Cl asit özellikte olduğu için ortam pH'ı NaOH ile 7.5'e ayarlanmıştır.

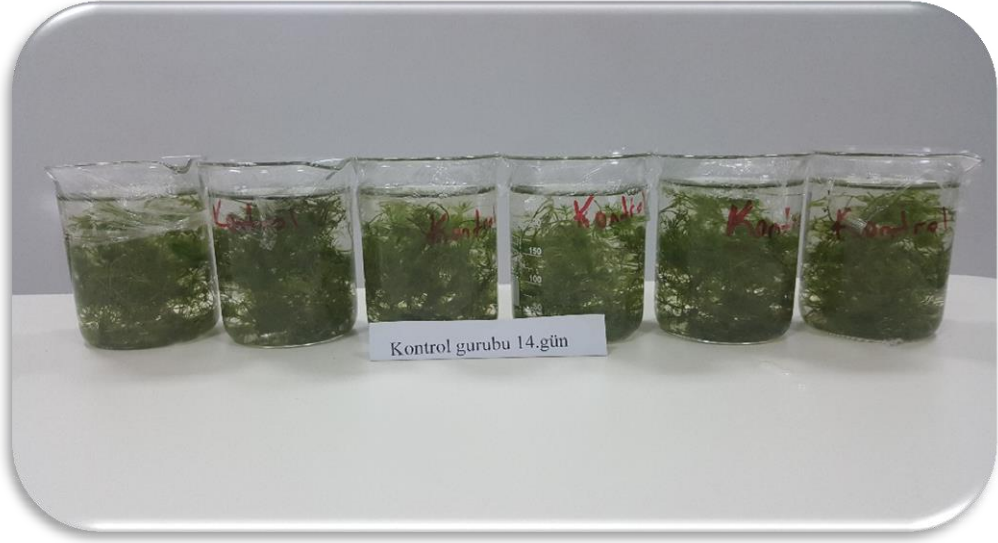
### **3.2.2. Toksikite Denemeleri**

Toksikite denemeleri 3 günlük adaptasyon sürecinden geçmiş olan *C. contraria* örnekleri kullanılarak laboratuvar koşullarında gerçekleştirilmiştir.

Her uygulama grubu 6 tekrarlı olacak şekilde düzenlenmiştir. Deney düzeneneği aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

#### **Kontrol Grubu**

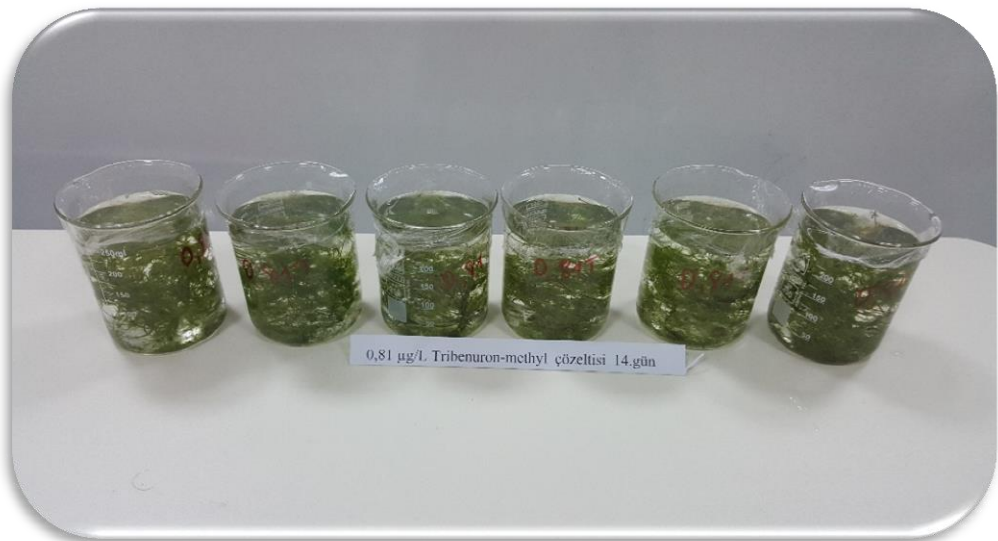
MBL çözeltisi 6 adet 250 mL'lik behere aktarılmış ve her beher içerisine 5 g *C. contraria* örneği konularak ağzı şeffaf filmle kapatılmıştır. Hazırlanan örnekler 14 gün süre ile 24 °C sıcaklık ve 185 µmol/m<sup>2</sup>/sn ışık yoğunluğunda bekletilmiştir (Resim 3.4).



Resim 3.4 MBL çözeltisindeki kontrol grubu *C. contraria* örnekleri

#### 0.81 µg/L Tribenuron Metil Grubu

0.81 µg/L tribenuron metil içeren MBL çözeltisi 6 adet 250 mL'lik behere aktarılmıştır. Her beher içerisine 5 g *C. contraria* örneği konularak ağızı şeffaf filmle kapatılmıştır. Hazırlanan örnekler 14 gün süre ile 24 °C sıcaklık ve 185 µmol/m<sup>2</sup>/sn ışık yoğunluğunda bekletilmiştir (Resim 3.5).



Resim 3.5 0.81 µg/L tribenuron metil çözeltisindeki *C. contraria* örnekleri

**0.65 mg/L NH<sub>3</sub> Grubu**

0.65 mg/L NH<sub>3</sub> içerecek şekilde hazırlanan NH<sub>4</sub>Cl çözeltilisi 6 adet 250 mL'lik behere aktarılmıştır. Tüm beherlere 5 g *C. contraria* örneği konularak ağzı şeffaf filmle kapatılmıştır. Hazırlanan örnekler 14 gün süre ile 24 °C sıcaklık ve 185 µmol/m<sup>2</sup>/sn ışık yoğunluğunda bekletilmiştir (Resim 3.6).



Resim 3.6 0.65 mg/L amonyak derişimi etkisindeki *C. contraria* örnekleri

**0.65 mg/L NH<sub>3</sub>+0.81 µg/L Tribenuron Metil Grubu**

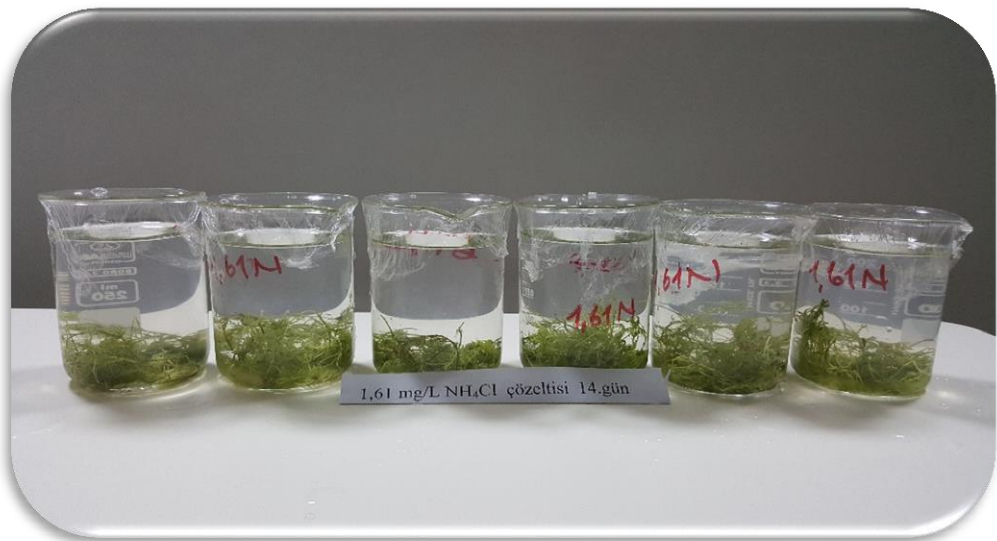
0.81 µg/L tribenuron metil ve 0.65 mg/L NH<sub>3</sub> içerecek şekilde hazırlanan NH<sub>4</sub>Cl çözeltilisi 6 adet 250 mL'lik behere aktarılmıştır. Her beher içerisine 5 g *C. contraria* örneği konularak ağzı şeffaf filmle kapatılmıştır. Hazırlanan örnekler 14 gün süre ile 24 °C sıcaklık ve 185 µmol/m<sup>2</sup>/sn ışık yoğunluğunda bekletilmiştir (Resim 3.7).



Resim 3.7 0.65 mg/L  $\text{NH}_3$  derişimi ve 0.81  $\mu\text{g/L}$  tribenuron metil karışımının etkisindeki *C. contraria* örnekleri

### 1.61 mg/L $\text{NH}_3$ Grubu

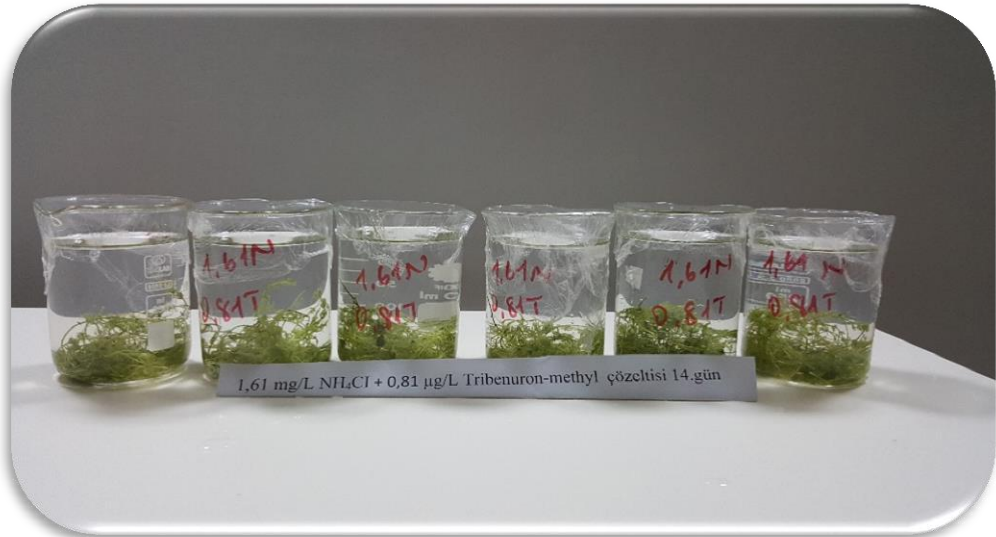
1.61 mg/L  $\text{NH}_3$  içerecek şekilde hazırlanan  $\text{NH}_4\text{Cl}$  çözeltisi 6 adet 250 mL'lik behere aktarılmıştır. Her beher içerisine 5 g *C. contraria* örneği konularak ağzı şeffaf filmle kapatılmış ve 24 °C sıcaklık ve 185  $\mu\text{mol/m}^2/\text{sn}$  ışık yoğunluğunda 14 gün süre ile bekletilmiştir (Resim 3.8).



Resim 3.8 1.61 mg/L  $\text{NH}_3$  derişimi etkisindeki *C. contraria* örnekleri

**1.61 mg/L NH<sub>3</sub>+0.81 µg/L Tribenuron Metil Grubu**

0.81 µg/L tribenuron metil ve 1.61 mg/L NH<sub>3</sub> içerecek şekilde hazırlanan NH<sub>4</sub>Cl çözeltisi 6 adet 250 mL'lik behere aktarılmıştır. Her beher içerisine 5 g *C. contraria* örneği konularak ağzı şeffaf filmle kapatılmıştır. Hazırlanan örnekler 14 gün süre ile 24 °C sıcaklık ve 185 µmol/m<sup>2</sup>/sn ışık yoğunluğunda bekletilmiştir (Resim 3.9).



Resim 3.9 1.61 mg/L NH<sub>3</sub> ve 0.81 µg/L tribenuron metil karışımının etkisindeki *C. contraria* örnekleri

Besi ortamının pH'ı deney boyunca 7.5 olarak ölçülmüş ve sıcaklığı 24 °C olacak şekilde kontrol edilmiştir. Adaptasyon sürecinde olduğu gibi 48 saatte bir, su değişimi yapılmıştır. Bu uygulamaya 14 gün boyunca devam edilmiştir. 14. günün sonunda örnekler besi ortamından alınarak kurutma kâğıdı ile suyu uzaklaştırılmış ve hassas terazi ile tartılarak, kontrol grubunun her beherinden ortalama 4 tane 1'er g, diğer grupların ise her beherinden ortalama 2 tane 1'er g alınarak eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Daha sonra -80 °C'de biyokimyasal analizler yapılincaya kadar bekletilmiştir.



**3.2.3. Biyokimyasal Analizler**

Biyokimyasal analiz için, *C. contraria* örnekleri -80 °C'den çıkarılarak homojenize edilmiştir. Homojenizasyon, %2'lik polivinilpirolidon içeren pH 7.5 50 mM Tris tamponu ile yapılmıştır. Makrofit ağırlığının 4 katı olacak şekilde (w/v) homojenizasyon çözeltisi ile buz içerisinde homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat 15000 x g'de 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant APx, DHAR, GPx, GST enzim analizi, T-SH, NP-SH, PB-SH, TBARS ve protein miktarını belirlemek için kullanılmıştır.

**3.2.3.1. Askorbat Peroksidaz (APx) Aktivitesi**

Askorbat peroksidaz aktivitesi Nakano ve Asada [126] yöntemine göre analiz edilmiştir.

**Belirteçler**

- 50 mM pH 7.0 sodyum fosfat tamponu
- 4 mM EDTA
- 8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 1 mM askorbik asit

**50 mM pH 7.0 sodyum fosfat tamponu hazırlanışı:** 0.3677 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 0.2748 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tartılarak behere konulmuştur. Çözelti pH'ı 7'ye ayarlanmış ve balon jode saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

**4 mM EDTA hazırlanışı:** 0.1489 g EDTA tartılarak 100 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır.

**8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin hazırlanışı:** %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den 285 µL alınarak 10 mL saf suya konulmuş ve iyice karıştırılmıştır. 900 µL sodyum fosfat tamponunun absorbansı 240 nm dalga boyunda ölçülmüştür (OD1). Bu çözeltiye seyreltilmiş olan %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den 100 µL eklenerek optik dansitesi okunmuştur (OD2). Ölçülen absorbans değeri  $A = \epsilon \cdot c \cdot l$  formülünde yerine konularak elde edilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (c) derişimine göre 8 mM olacak şekilde sodyum fosfat tamponu ile seyreltme yapılmıştır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin 240 nm'deki ekstinksiyon katsayısı  $\epsilon = 0.0436 \text{ mM/cm}$ 'dir.  $l = \text{ışık yolu}$ ;  $A = \text{OD2-OD1}$

**1 mM askorbik asit hazırlanışı:** 0.0176 g tartılarak saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

### **Yöntem**

Askorbat peroksidaz enzim aktivitesini ölçebilmek için gerekli çözeltiler hazırlandıktan sonra spektrofotometrik analiz küvetlerine aşağıdaki şekilde yerleştirilmiştir. Örnek ve kör küvetleri aynı anda spektrofotometreye yerleştirilmiştir. 30 °C'de 10 dakikalık inkübasyondan sonra hem kör hem de örnek küvetlerine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den 125 µL eklenmiştir. Oluşan tepkime sonucunda absorbans değerlerindeki değişim 3 dakika boyunca 290 nm'de ölçülmüştür (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 Askorbat peroksidaz yöntemi

<b>Çözeltiler</b>	<b>Kör (µL)</b>	<b>Örnek (µL)</b>
Fosfat Tamponu	500	500
EDTA	25	25
Askorbik asit	-	250
Su	250	-
Örnek	100	100

### **Hesaplama**

$$APx \text{ (mmol/dak/mL)} = \frac{OD_0 - OD_3}{t} \times \frac{V_t}{V_0} \times 2.8$$

OD<sub>0</sub> = Başlangıç absorbans değeri

OD<sub>3</sub> = 3. dakikadaki absorbans değeri

t = Zaman (dak)

V<sub>t</sub> = Toplam hacim

V<sub>0</sub> = Örnek hacmi

2.8 mM/cm = İndirgenmiş askorbatın 290 nm'deki ekstinksiyon katsayısı

$$APx \text{ spesifik aktivitesi (mmol/dak/mg protein)} = \frac{APx \text{ aktivitesi}}{\text{Protein miktarı}}$$

**3.2.3.2. Dehidroaskorbat Redüktaz (DHAR) Aktivitesi**

Dehidroaskorbat redüktaz aktivitesi DeTullio ve ark. [127] yöntemine göre analiz edilmiştir.

**Belirteçler**

- 200 mM pH 6.2 sodyum fosfat tamponu
- 10 mM GSH
- 10 mM DHA

**200 mM pH 6.2 sodyum fosfat tamponu hazırlanışı:** 2.1819 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ve 0.2584 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  tartılarak behere konulmuştur. pH 6.2'ye ayarlanmış ve balon jojede saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

**10 mM GSH hazırlanışı:** 0.0615 g GSH tartılarak sodyum fosfat tamponu ile 20 mL'ye tamamlanmıştır.

**10 mM DHA hazırlanışı:** 0.0174 g DHA tartılarak 10 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır.

**Yöntem**

Dehidroaskorbat redüktaz enzim aktivitesini ölçebilmek için hazırlanan çözeltiler spektrofotometrik analiz küvetlerine aşağıdaki şekilde yerleştirilmiştir. Köre örnek yerine saf su konulmuştur. Oluşan tepkime sonucunda absorbans değerlerindeki değişim 5 dakika boyunca 30°C'de ve 265 nm'de ölçülmüştür (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 Dehidroaskorbat redüktaz yöntemi

Çözeltiler	Kör ( $\mu\text{L}$ )	Örnek ( $\mu\text{L}$ )
Fosfat Tamponu	600	600
GSH	200	200
Örnek	-	100
Su	100	-
DHA	100	100

**Hesaplama**

$$\text{DHAR (mmol/dak/mL)} = \frac{\text{OD}_5 - \text{OD}_0}{t} \times \frac{V_t}{V_0} \times 14$$

OD<sub>0</sub> = Başlangıç absorbans değeri

OD<sub>5</sub> = 5. dakikadaki absorbans değeri

t = Zaman (dak)

V<sub>t</sub> = Toplam hacim

V<sub>0</sub> = Örnek hacmi

14 mM/cm = İndirgenmiş askorbatın 265 nm'deki ekstinksiyon katsayısı

$$\text{DHAR spesifik aktivitesi (mmol/dak/mg protein)} = \frac{\text{DHAR aktivitesi}}{\text{Protein miktarı}}$$

**3.2.3.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesi**

Glutasyon peroksidaz aktivitesi Nagalakshmi ve Prasad [128] yöntemine göre analiz edilmiştir.

**Belirteçler**

- 100 mM potasyum fosfat tamponu pH 7.0
- 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 100 U GR
- 50 mM GSH
- 2 mM NADPH
- 50 mM Sodyum azid
- 6.7 mM EDTA

**100 mM potasyum fosfat tamponu hazırlanışı:** 0.8338 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 0.6745 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tartılarak behere konulmuştur. pH 7'ye ayarlanmış ve balon jodede saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

**2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Hazırlanışı:** APx yönteminde olduğu gibi hazırlanmıştır.

**50 mM GSH hazırlanışı:** 0.0307 g GSH tartılarak potasyum fosfat tamponu ile 2000  $\mu\text{L}$ 'ye tamamlanmıştır.

**2 mM NADPH hazırlanışı:** 0.0167 g NADPH tartılarak saf su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

**50 mM sodyum azid hazırlanışı:** 0.0813 g sodyum azid tartılarak 25 mL saf suda çözülmüştür.

**6.7 mM EDTA Hazırlanışı:** 0.2494 g tartılıp 100 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır.

### Yöntem

Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesini ölçebilmek için hazırlanan çözeltiler spektrofotometrik analiz küvetlerine aşağıdaki şekilde yerleştirilmiştir. Örnek ve kör küvetleri aynı anda spektrofotometreye yerleştirilmiştir. Kör ve örnek küvetleri içerisindeki çözeltiler 30 °C'de 2 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra örnek küvetine 100  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , kör küvetine ise 100  $\mu\text{L}$  saf su konulmuştur. Oluşan tepkime sonucunda absorbans değerlerindeki değişim 2 dakika boyunca 340 nm'de ölçülmüştür (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 Glutasyon peroksidaz yöntemi

Çözeltiler	Kör ( $\mu\text{L}$ )	Örnek ( $\mu\text{L}$ )
Fosfat Tamponu	500	500
GR	10	10
GSH	20	20
NADPH	100	100
Sodyum azid	20	20
EDTA	150	150
Örnek	100	100

### Hesaplama

$$\text{GPx (mmol/dak/mL)} = \frac{\text{OD}_0 - \text{OD}_2}{t} \times \frac{V_t}{V_0} \times 6.2$$

$\text{OD}_0$  = Başlangıç absorbans değeri

$\text{OD}_2$  = 2. dakikadaki absorbans değeri

t = Zaman (dak)

V<sub>t</sub> = Toplam hacim

V<sub>ö</sub> = Örnek hacmi

6.2 mM/cm = NADPH'in 340 nm'deki ekstinksiyon katsayısı

$$\text{GPx spesifik aktivitesi (mmol/dak/mg protein)} = \frac{\text{GPx aktivitesi}}{\text{Protein miktarı}}$$

#### **3.2.3.4. Glutasyon S-transferaz (GST) Aktivitesi**

Glutasyon S-transferaz aktivitesi Habig ve ark. [129]yöntemine göre analiz edilmiştir.

##### **Belirteçler**

- 1 mM EDTA içeren 0.1 M potasyum fosfat tamponu
- 25 mM GSH
- 10 mM CDNB

**1 mM EDTA içeren 0.1 M potasyum fosfat tamponu hazırlanışı:** 1.1341 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.29 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 0.0372 g EDTA tartılarak behere konulmuş ve pH 6.5'e ayarlanarak balon jode saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

**25 mM GSH hazırlanışı:** 0.077 g GSH tartılarak fosfat tamponu ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

**10 mM CDNB hazırlanışı:** 0.0203 g CDNB tartılarak %96'lık etil alkol ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

##### **Yöntem**

Glutasyon S-transferaz enzim aktivitesini ölçebilmek için hazırlanan çözeltiler spektrofotometrik analiz küvetlerine aşağıdaki şekilde yerleştirilmiştir. Kör ve örnek küvetlerindeki çözeltiler iyice karıştırıldıktan sonra her iki küvet içerisine 66 µL CDNB eklenmiştir. Oluşan tepkime sonucunda absorbands değerlerindeki değişim 5 dakika boyunca 340 nm'de ölçülmüştür (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5 Glutasyon S-transferaz yöntemi

Çözeltiler	Kör (µL)	Örnek (µL)
Fosfat tamponu	868	808
GSH	66	66
Örnek	-	60

**Hesaplama**

$$\text{GST (mmol/dak/mL)} = \frac{\text{OD}_5 - \text{OD}_0}{t} \times \frac{V_t}{V_0} \times 9.6$$

OD<sub>0</sub>= Başlangıç absorbans değeri

OD<sub>5</sub>= 5.dakikadaki absorbans değeri

t= Zaman (dak)

V<sub>t</sub>= Toplam hacim

V<sub>0</sub>= Örnek hacmi

9.6 mM/cm= CDNB'nin 340 nm'deki ekstinksiyon katsayısı

$$\text{GST spesifik aktivitesi (mmol/dak/mg protein)} = \frac{\text{GST aktivitesi}}{\text{Protein miktarı}}$$

**3.2.3.5. Total Tiyol, Non-Protein Tiyol, Protein Bağlı Tiyol**

Sedlak ve Lindsay [130] yöntemine göre hesaplanmıştır.

**Belirteçler**

- 0.2 M Tris tamponu pH 8.2
- 0.4 M Tris tamponu pH 8.9
- 0.01 M DTNB
- Mutlak metil alkol
- %50'lik TCA

**0.2 M Tris tamponu hazırlanışı:** Tris bazdan 2.4228 g tartılarak 50 mL saf suda çözülmüştür. Çözündükten sonra pH 8.2'ye ayarlanmış ve 100 mL'lik balon jöjeye aktarılarak saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

**0.4 M Tris tamponu hazırlanışı:** Tris bazdan 4.8456 g tartılarak 50 mL saf suda çözülmüş ve pH 8.9'a ayarlanmıştır. Daha sonra 100 mL'lik balon jöjeye aktarılmış ve distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

**0.01 M DTNB hazırlanışı:** DTNB'den 0.0198 g tartılarak %99.8'lik metanolle 5 mL'ye tamamlanmıştır.

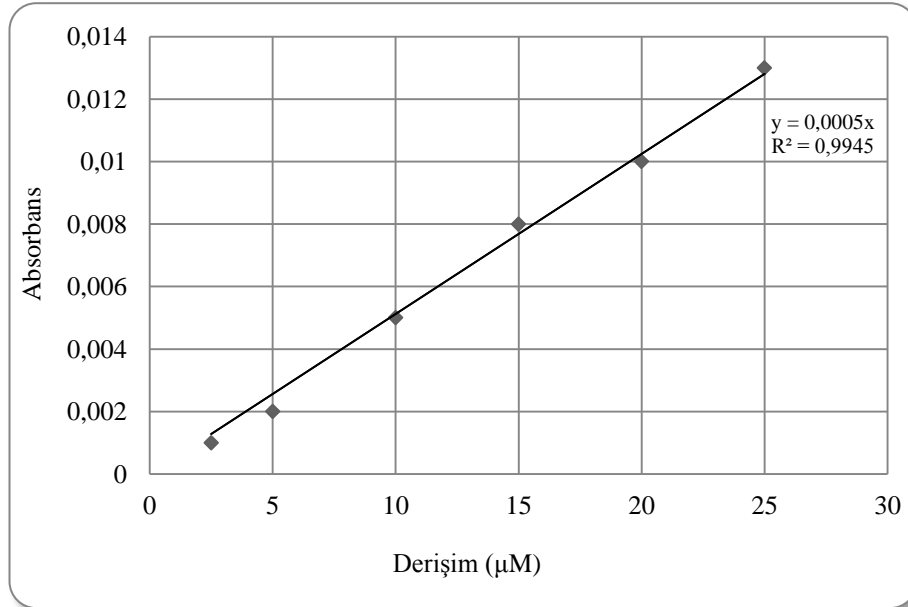
**Mutlak metil alkol:** Satın alınan ticari formu kullanılmıştır.

**%50'lik TCA hazırlanışı:** 5 g TCA tartılarak saf su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

### 3.2.3.5.1. Total Tiyol (T-SH)

#### Yöntem

100 µL homojenat ile 300 µL 0.2 M Tris tamponu karıştırılmıştır. Karışıma, mutlak metanolde çözülmüş olan 0.01 M'lık DTNB'den 20 µL eklenmiştir. Bu karışıma 1580 µL metanol eklenerek kuvvetli bir şekilde çalkalanmıştır. Son olarak 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Elde edilen süpernatantın absorbansı 412 nm dalga boyunda okunmuştur. Köre homojenat yerine Tris tamponu eklenmiştir. GSH ile hazırlanan standart grafikten hesaplamalar yapılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 11 Tiyol standart grafiği



**3.2.3.5.2. Non Protein Tiyol (NP-SH) ve Protein Bağlı Tiyol (PB-SH)****Yöntem**

100 µL homojenat, 80 µL saf su ve 20 µL %50'lik TCA ile iyice karıştırılmıştır. 15 dakika sonra 10000 x g'de 15 dakika süre ile +4 °C'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatanttan 100 µL alınarak, 200 µL 0.4 M pH 8.9 Tris tamponu ve 5 µL DTNB ile karıştırılmıştır. 5 dakika içinde absorbansı 412 nm'de köre karşı okunmuştur. Kör çözeltilisinde örnek yerine Tris tamponu kullanılmıştır.

Elde edilen absorbans değeri NP-SH derişiminin hesaplanmasında kullanılmıştır. T-SH absorbans değerinden NP-SH absorbans değeri çıkartılarak PB-SH derişimi hesaplanmıştır.

**3.2.3.6. Tiyobarbiturik Asit Reaktif Maddeleri Miktarı (TBARS)**

Tiyobarbiturik Asit Reaktif Maddeleri miktarı Jain [131] tarafından önerilen ve Do ve ark. [132] tarafından modifiye edilen yöntemle göre spektrofotometrik olarak analiz edilmiştir.

- 100 nm'lik tetrametoksipropan (TMP)
- %1'lik sülfürik asit
- %0.01 bütildihidroksitoluen (BHT)
- %1'lik tiyobarbitürük asit (TBA)

**100 nm'lik tetrametoksipropan (TMP):** 1.66 µL TMP alınarak 100 mL saf suya karıştırılmıştır.

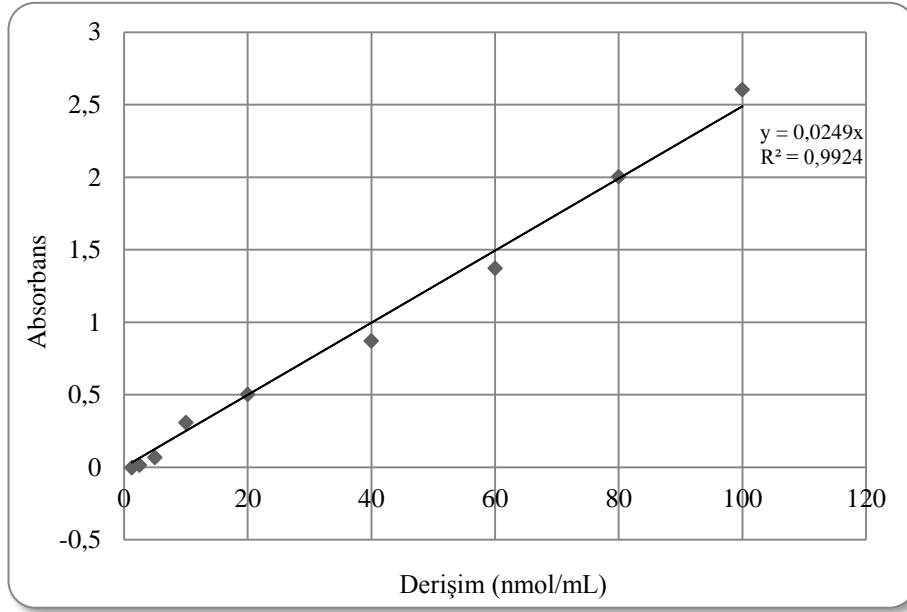
**%1'lik sülfürik asit:** %97 saflık ve 1.840 g/mL yoğunluktaki sülfürik asitten 5.603 mL alınarak saf su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır.

**%0.01'lik bütildihidroksitoluen (BHT):** 0.002 g BHT tartılarak 20 mL metanolde çözülmüştür.

**%1'lik tiyobarbitürük asit (TBA):** TBA'dan 1 g tartılarak %1'lik sülfürik asitle 100 mL'ye tamamlanmıştır.

**Yöntem**

1.66 µL TMP, 100 mL saf su içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan çözelti 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 100 nmol/mL'lik bu çözülden 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60 ve 80 nmol/mL'lik standartlar hazırlanarak TBARS standart grafiği çizilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 12 TBARS standart grafiği

Standart grafik eldesindeki yöntemle aynı şekilde, 100 µL homojenat, %0.01 BHT içeren 400 µL metanol ve 500 µL %1'lik sülfürik asit içerisinde çözülmüş %1'lik TBA ile karıştırılmıştır ve daha sonra vortekslenmiştir. Örnekler 100°C'de 15 dakika süre ile inkübe edilerek sürenin sonunda örnekler oda sıcaklığına soğutulmuş ve 20°C'lik santrifüj cihazında 16000 x g'de santrifüjlenmiştir. Örneklerin absorbansı 532 ve 600 nm'de mikropilaka kullanılarak ölçülmüştür. Kör için örnek yerine saf su konularak aynı işlemler yapılmıştır. Elde edilen absorbans değerleri standart grafik kullanılarak derişim değerlerine dönüştürülmüştür.

**3.2.3.7. Protein Yöntemi**

*Chara contraria* örneklerinde APx, DHAR, GPx, GST enzim aktiviteleri ve TBARS miktarını birim protein içindeki değer olarak sunabilmek için protein miktarı hesaplanmıştır [133].

**Belirteçler**

- %2 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- %1 CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O
- %2 Na-K tartarat
- %1'lik SDS
- 1 M NaOH
- Folin-Ciocalteu's fenol ayıracı
- Sığır serum albumini (BSA)

**Bakır ayıracı:** 300 mL saf su içine 20 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 0.4 g CuSO<sub>4</sub> ve 0.2 g Na-K tartarat eklenerek karıştırılmış ve Cu ayıracı hazırlanmıştır.

**%1'lik Sodyum dodesil sülfat (SDS):** 1 g SDS tartılarak saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

**1 M NaOH:** 4 g NaOH tartılarak 100 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır.

**Lowry ayıracı:** 3 mL Cu ayıracı, 1 mL SDS, 1 mL NaOH karıştırılarak hazırlanmıştır.

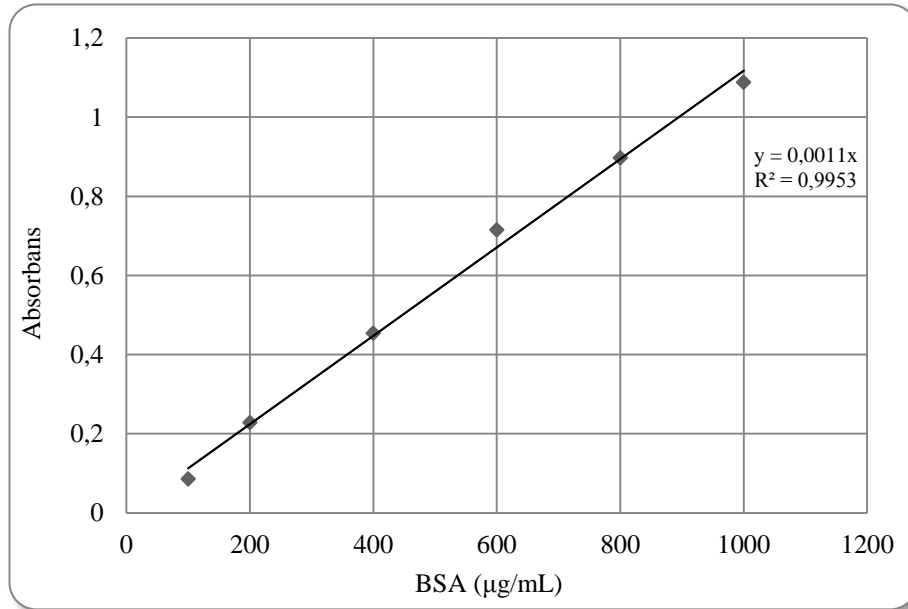
**Folin-Ciocalteu's ayıracı:** 100µL Folin-Ciocalteu's ile 900 µL saf su karıştırılarak hazırlanmıştır.

**Sığır serum albumini (BSA):** 0.01 g BSA tartılmış ve saf su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

**Yöntem**

BSA'dan 0.01 g tartılarak 10 mL saf su içinde çözülmüştür. Bu çözelti kullanılarak 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 µg/mL'lik standartlar hazırlanmıştır. Bu çözeltiler ile protein standart grafiği hazırlanmıştır (Şekil 3.3). Köre BSA yerine saf su konulmuştur. Aynı işlemler BSA yerine homojenat kullanılarak tüm uygulama grupları için yapılmış ve protein miktarları hesaplanmıştır.

Makrofitin toplam protein içeriği Lowry [133] yöntemine göre yapılmıştır. 100 µL homojenat üzerine 450 µL Lowry ayırıcı eklenmiş ve daha sonra vortekslenmiştir. Oda sıcaklığında karanlıkta 10 dakika bekletilmiştir. Sürenin sonunda 450 µL Folin-Ciocalteu's ayırıcı eklenmiş ve vortekslenmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletilmiştir. Süre bitiminde örneklerin absorbans değerleri 750 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur. Bütün uygulama gruplarında elde edilen değerler BSA ile hazırlanan standart grafiğe göre derişim değerlerine dönüştürülmüştür.



Şekil 13 Protein standart grafiği

#### 3.2.4. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi SPSS 20.0 paket programı kullanılarak  $P < 0.05$  düzeyinde yapılmıştır ( $N=6$ ). Verilerin normalitesi Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edilmiştir. Kolmogorov-Smirnov testi sonucuna göre normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal-Wallis testine tabi tutulmuştur. Normal dağılım göstermeyen veriler, Kruskal-Wallis non-parametrik testini takiben Mann-Whitney  $U$  *post hoc* testi ile analiz edilmiştir. OneWay ANOVA testine göre önemli olup

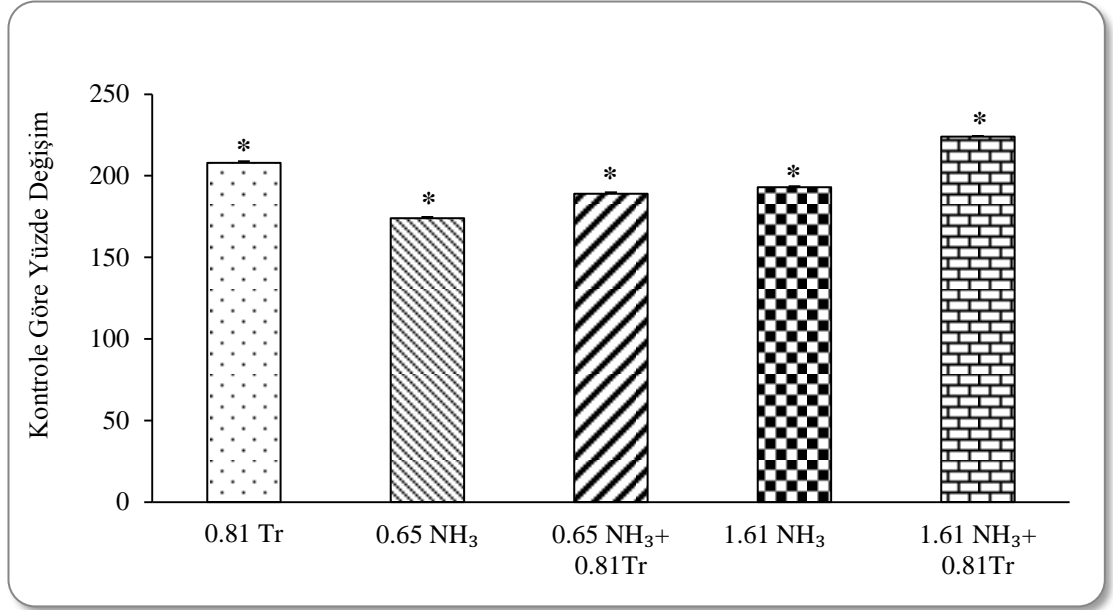
homojen dağılan veriler ise çalışma grupları arasında farklılık olup olmadığı Duncan testi ile değerlendirilmiştir. Gruplar arası korelasyon ise Pearson korelasyonu ile tespit edilmiştir. Tüm veriler aritmetik ortalama  $\pm$  standard hata şeklinde sunulmuştur.

**4. BULGULAR ve TARTIŞMA****4.1. BULGULAR**

Yapılan çalışmada tribenuron metil herbisidi ve amonyağın iki farklı derişiminin, ayrı ayrı ve birlikte subakut etkisinde bırakılan *C. contraria*'da APx, DHAR, GPx ve GST enzim aktiviteleeri ve T-SH, NP-SH, PB-SH, TBARS ve protein miktarlarına etkileeri araştırılmıştır.

**4.1.1. Tribenuron Metil ve Farklı Amonyak Derişimlerinin Etkisindeki *C. contraria*'da Antioksidan Enzim Aktiviteleeri****4.1.1.1. APx Enzim Aktiviteleesi**

Farklı amonyak derişimleri ve tribenuron metilin *C. contraria*'da APx enzim aktiviteleeri üzerine etkileesi Şekil 4.1 ve Çizelge 4.1'de verilmiştir. Farklı amonyak (0.65 mg/L ve 1.61 mg/L NH<sub>3</sub>) derişimleri ve tribenuron metil (0.81 µg/L) herbisitinin etkisindeki *C. contraria*'da APx enzim aktiviteleesi bütün gruplarda kontrole göre artmıştır ( $P<0.05$ ; Şekil 4.1 ve Çizelge 4.1). En yüksek APx enzim aktiviteleesi %124 oranında yüksek amonyak derişimi ve tribenuron metil içeren uygulama grubunda ölçülmüştür. Düşük amonyak derişimi tek başına uygulandığında enzim aktiviteleesindeki artış %74 iken, herbisit ile birlikte %89'a yükselmiştir. Yüksek amonyak derişiminin uygulandığı grupta ise %93'ten %124'e çıkmıştır (Şekil 4.1). APx aktiviteleesi ile TBARS ( $P<0.01$ ;  $r = -0.500$ ) miktarı arasında negatif korelasyon tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).



Şekil 14.1 Farklı amonyak derişimleri ve tribenuron metil etkisindeki *C. contraria*'da APx enzim aktivitesinin kontrole göre yüzde değişimi. Gruplar arası istatistiksel farklılık yıldız işareti (\*) ile gösterilmiştir. Tr = Tribenuron metil

Çizelge 4.1 Tribenuron metil ve farklı amonyak derişimlerinin etkisindeki *C. contraria* enzim aktiviteleri

Gruplar	APx (mmol/dak/mg protein)	DHAR (mmol/dak/mg protein)	GPx (mmol/dak/mg protein)	GST (mmol/dak/mg protein)
<b>Kontrol</b>	3.44±0.19 <sup>a</sup>	3.76±0.27 <sup>a</sup>	29.08±1.83 <sup>a</sup>	1.73±0.13 <sup>ab</sup>
<b>0.81 µg/L Tr</b>	7.14±0.86 <sup>b</sup>	2.19±0.18 <sup>b</sup>	25.91±1.12 <sup>b</sup>	1.05±0.15 <sup>a</sup>
<b>0.65 mg/L NH<sub>3</sub></b>	6.00±0.84 <sup>b</sup>	2.69±0.19 <sup>b</sup>	21.07±0.56 <sup>c</sup>	1.29±0.10 <sup>a</sup>
<b>0.65 mg/L NH<sub>3</sub>+ 0.81 µg/L Tr</b>	6.49±0.88 <sup>b</sup>	2.11±0.12 <sup>b</sup>	18.17±0.72 <sup>c</sup>	1.08±0.05 <sup>a</sup>
<b>1.61 mg/L NH<sub>3</sub></b>	6.64±0.52 <sup>b</sup>	2.59±0.22 <sup>b</sup>	25.11±0.89 <sup>b</sup>	2.42±0.21 <sup>b</sup>
<b>1.61 mg/L NH<sub>3</sub>+ 0.81 µg/L Tr</b>	7.72±0.40 <sup>b</sup>	3.27±0.18 <sup>a</sup>	25.56±0.73 <sup>b</sup>	3.35±0.62 <sup>c</sup>

Veriler aritmetik ortalama±standart hata şeklinde verilmiştir. Farklı harfler ile gösterilen veriler arasında istatistiksel ayırım bulunmaktadır ( $P<0.05$ ;  $N=6$ )



#### 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Barış TANRIVERDİ

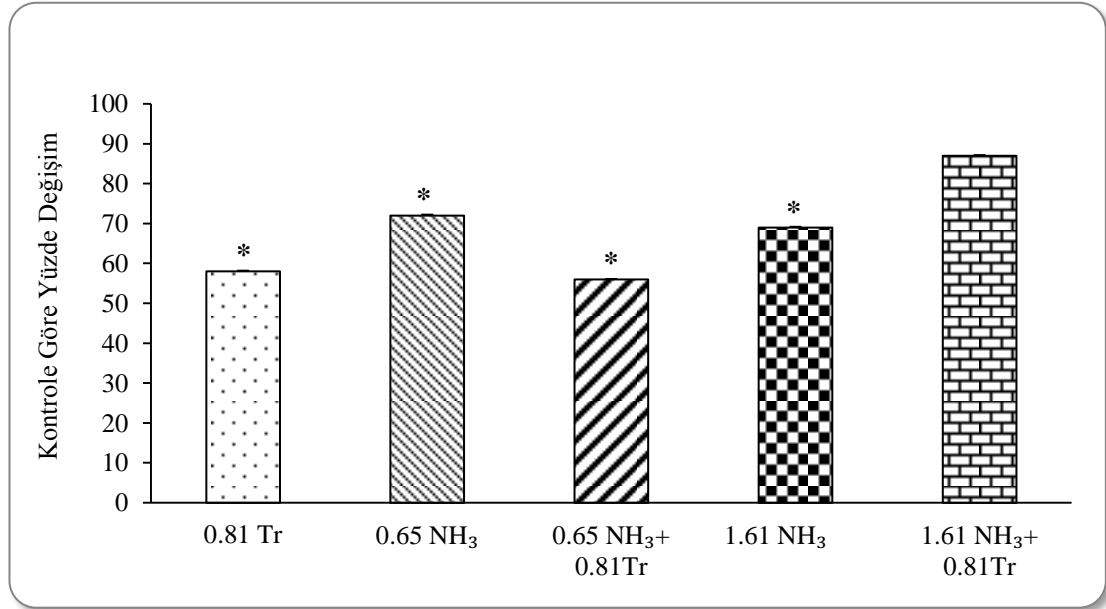
Çizelge 4.2 *C. contraria*'da enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar, TBARS ve protein düzeyleri arasındaki ilişkiler

	GPx	DHAR	APx	GST	TBARS	T-SH	NP-SH	PB-SH	Protein
<b>GPx</b>									
<b>DHAR</b>	.672**								
<b>APx</b>	-.141	-.267							
<b>GST</b>	.240	.277	.237						
<b>TBARS</b>	.274	.167	-.500**	-.426**					
<b>T-SH</b>	-.503**	-.428**	.020	.055	-.304				
<b>NP-SH</b>	.118	-.013	-.322	-.022	.331*	-.300			
<b>PB-SH</b>	-.495**	-.405*	.063	.055	-.334*	.992**	-.421*		
<b>Protein</b>	-.952**	-.601**	.017	-.344*	-.107	.455**	-.111	.447**	

\* ilişki düzeyi ( $P<0.05$ ). \*\* ilişki düzeyi ( $P<0.01$ )

## 4.1.1.2. DHAR Enzim Aktivitesi

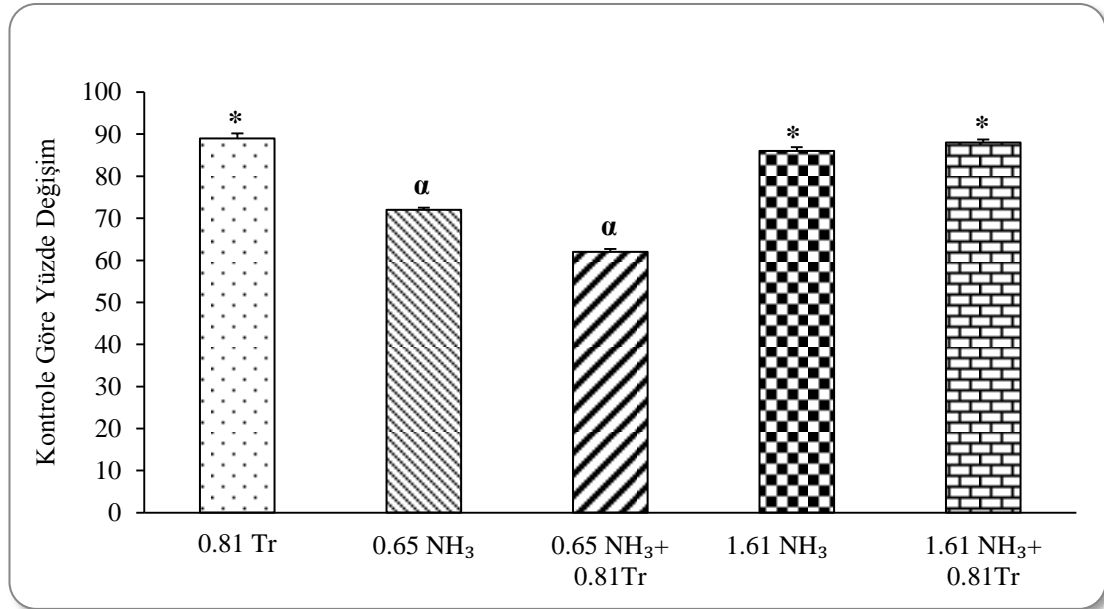
Tribenuron metil ve farklı amonyak derişimlerinin *C. contraria*'da DHAR enzim aktiviteleri üzerine etkisi Şekil 4.2 ve Çizelge 4.1'de verilmiştir. *Chara contraria*'da DHAR enzim aktivitesi, yüksek amonyak derişiminin herbisitle birlikte verildiği grup hariç bütün uygulamalarda kontrole göre azalmıştır ( $P<0.05$ ; Şekil 4.2 ve Çizelge 4.1). Düşük amonyak derişiminin tek başına uygulandığı grupta tespit edilen azalma, herbisitün kültür ortamına eklenmesiyle birlikte %28'den %44'e çıkmıştır. Tespit edilen bu azalma tüm gruplar içindeki en yüksek orandır. Yüksek amonyak derişiminin tek başına uygulandığı grupta saptanan azalma ise tribenuron metilin verilmesiyle %31'den %13'e gerilemiştir ( $P>0.05$ ; Şekil 4.2 ve Çizelge 4.1). DHAR aktivitesi ile T-SH ( $P<0.01$ ;  $r = -0.428$ ), PB-SH ( $P<0.05$ ;  $r = -0.405$ ) ve protein ( $P<0.01$ ;  $r = -0.601$ ) miktarları arasında negatif korelasyon tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).



Şekil 15.2 Farklı amonyak derişimleri ve tribenuron metil etkisindeki *C. contraria*'da DHAR enzim aktivitesinin kontrole göre yüzde değişimi. Gruplar arası istatistiksel farklılık yıldız işareti (\*) ile gösterilmiştir

## 4.1.1.3. GPx Enzim Aktivitesi

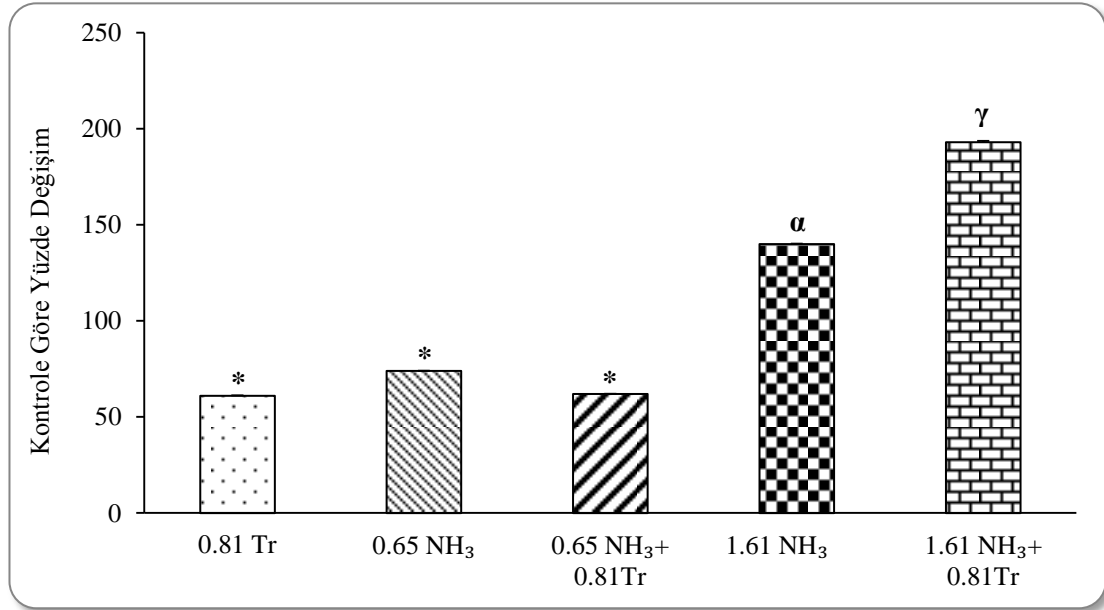
Farklı amonyak derişimleri ve tribenuron metilin *C. contraria*'da GPx enzim aktivitesi üzerine etkisi Şekil 4.3 ve Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Tribenuron metil ve farklı amonyak derişimlerine maruz bırakılan *C. contraria*'da GPx enzim aktivitesi, tüm uygulama gruplarında kontrole göre azalmıştır ( $P<0.05$ ; Şekil 4.3 ve Çizelge 4.1). Tribenuron metilin tek başına uygulandığı grupta %11 oranında en düşük azalma olmuştur. Düşük amonyak derişimi tek başına uygulandığında %28 oranında bir azalma görülürken herbisitinin de bu derişimle birlikte verilmesi durumunda tüm gruplar içindeki en yüksek oran olan %38'e yükselmiştir. Yüksek amonyak derişiminin tek başına uygulandığı grupta %14 düzeyinde azalırken, tribenuron metilin kültüre eklenmesiyle %12'ye düşmüştür. GPx aktivitesi ile DHAR ( $P<0.01$ ;  $r = 0.672$ ) aktivitesi arasında pozitif korelasyon, T-SH ( $P<0.01$ ;  $r = -0.503$ ), PB-SH ( $P<0.01$ ;  $r = -0.495$  ve protein ( $P<0.01$ ;  $r = -0.952$ ) miktarları ile arasında negatif korelasyon tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).



Şekil 163 Farklı amonyak derişimleri ve tribenuron metil etkisindeki *C. contraria*'da GPx enzim aktivitesinin kontrole göre yüzde değişimi. Yıldız (\*) ve alfa işareti (α) kontrol grubu ile aralarındaki istatistiksel ayrımı ifade etmektedir

## 4.1.1.4. GST Enzim Aktivitesi

*Chara contraria*'nın farklı amonyak (0.65 mg/L ve 1.61 mg/L NH<sub>3</sub>) derişimleri ve 0.81 µg/L tribenuron metil derişimi etkisinde ölçülen GST enzim aktivitesi Şekil 4.4 ve Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Tribenuron metilin tekbaşına, düşük amonyak derişimiyle karışımı ve bu derişimin tek başına uygulandığı gruplarda kontrole göre azalma olmuştur. Ancak 1.61 mg/L NH<sub>3</sub> ve 1.61 mg/L NH<sub>3</sub>+0.81 µg/L tribenuron metil gruplarında GST aktivitesinde artış olmuştur ( $P<0.05$ ; Şekil 4.4 ve Çizelge 4.1). En yüksek GST enzim aktivitesinin, kontrol grubuna göre %93 oranındaki artışla 1.61 mg/L NH<sub>3</sub>+0.81 µg/L tribenuron metil grubunda olduğu tespit edilmiştir. GST aktivitesi ile TBARS ( $P<0.01$ ;  $r = -0.426$ ) düzeyi arasında negatif korelasyon bulunmuştur (Çizelge 4.2).

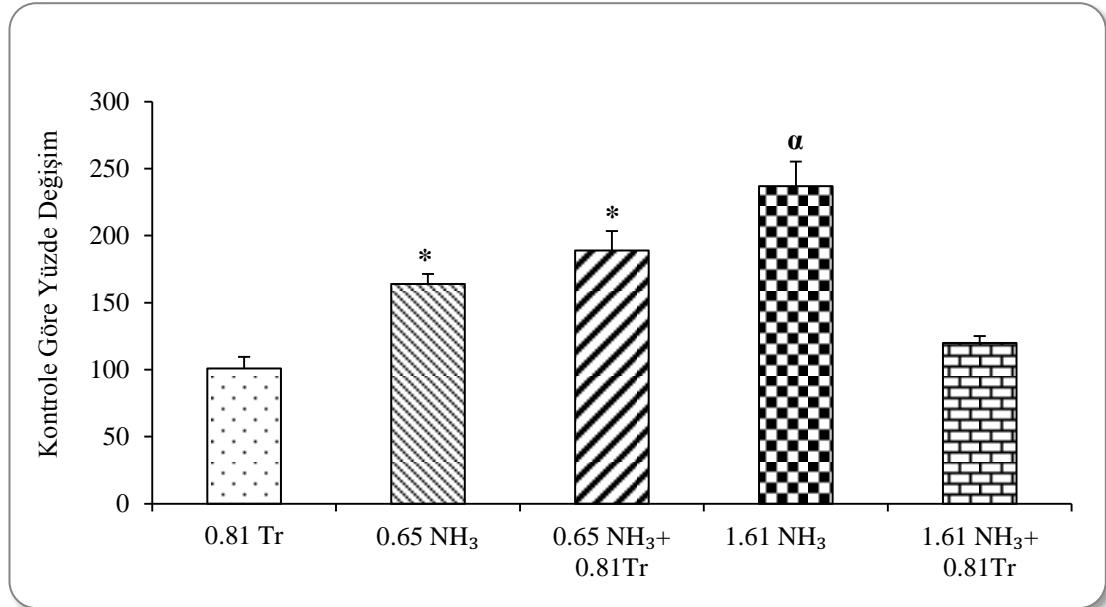


Şekil 174 Farklı amonyak derişimleri ve tribenuron metil etkisindeki *C. contraria*'da GST enzim aktivitesinin kontrole göre yüzde derişimi. Yıldız (\*), alfa (α) ve gama (γ) işaretleri kontrol grubu ile aralarındaki istatistiksel ayrımı ifade etmektedir

#### 4.1.2. *C. contraria*'da Antioksidan Tiyol Miktarındaki Değişimler

##### 4.1.2.1. Total Tiyol (T-SH) Düzeyi

Tribenuron metil ve farklı amonyak derişimlerinin etkisindeki *C. contraria*'da T-SH düzeyleri Şekil 4.5 ve Çizelge 4.3'te gösterilmiştir. Tribenuron metil tek başına ve yüksek amonyak derişimi ile birlikte uygulandığında, kontrole göre T-SH düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ( $P>0.05$ ; Şekil 4.5 ve Çizelge 4.3). Düşük amonyak derişiminin tek başına verildiği grupta kontrole göre T-SH miktarı %64 düzeyinde artarken, bu derişimin herbisitle verildiği grupta bu artış %89'a ulaşmıştır. Düşük amonyak derişimine göre yüksek amonyak derişiminde T-SH düzeyi %73'lük bir artışla %137'ye çıkararak en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Yüksek amonyak derişiminin tek başına uygulandığı grupta miktarı artan T-SH, herbisit verilmesiyle birlikte %117 oranında düşmüştür (Şekil 4.5). T-SH ile PB-SH ( $P<0.01$ ;  $r = 0.992$ ) ve protein ( $P<0.01$ ;  $r = 0.455$ ) miktarları arasında pozitif korelasyon tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).



Şekil 185 Farklı amonyak derişimleri ve tribenuron metil etkisindeki *C. contraria*'da T-SH miktarının kontrole göre yüzde değişimi. Yıldız (\*) ve alfa (α) işaretleri kontrol grubu ile aralarındaki istatistiksel ayrımı ifade etmektedir

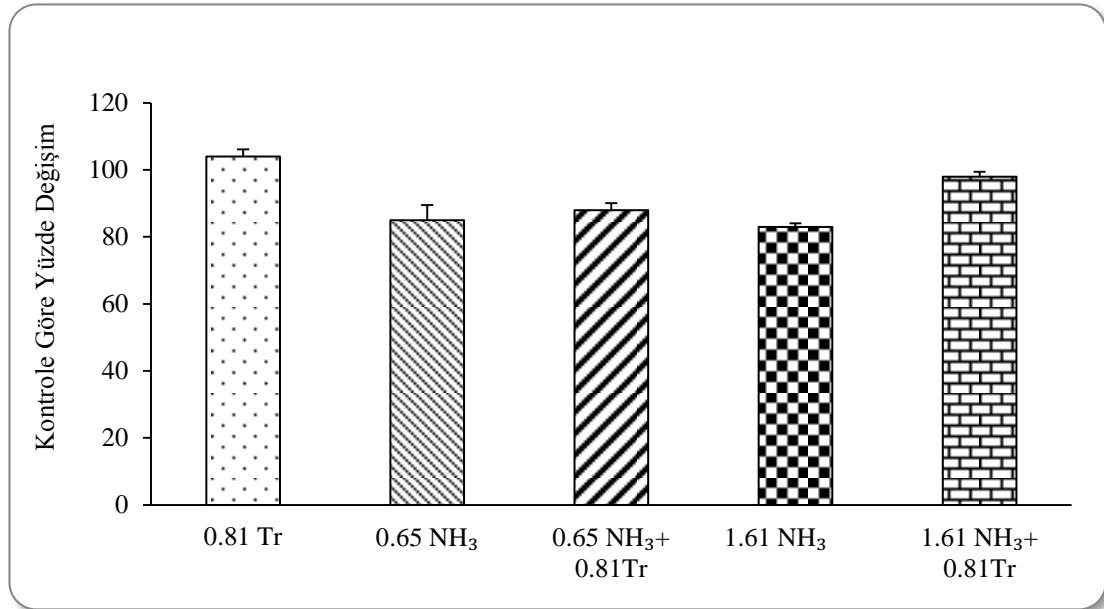
Çizelge 4.3 Tribenuron metil ve farklı amonyak derişimlerinin etkisindeki *C. contraria*'da T-SH, NP-SH, PB-SH, TBARS ve protein miktarlarındaki değişim

Gruplar	T-SH ( $\mu\text{M}$ / yaş ağırlık)	NP-SH ( $\mu\text{M}$ / yaş ağırlık)	PB-SH ( $\mu\text{M}$ / yaş ağırlık)	TBARS (nmol/mg protein)	Protein (mg/mL)
<b>Kontrol</b>	77.82 $\pm$ 9.05 <sup>a</sup>	40.44 $\pm$ 2.82	37.37 $\pm$ 8.73 <sup>a</sup>	13.79 $\pm$ 1.02 <sup>a</sup>	0.68 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
<b>0.81 <math>\mu\text{g/L}</math> Tr</b>	78.80 $\pm$ 8.68 <sup>a</sup>	42.20 $\pm$ 2.14	36.60 $\pm$ 8.29 <sup>a</sup>	12.33 $\pm$ 0.64 <sup>ab</sup>	0.75 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
<b>0.65 mg/L NH<sub>3</sub></b>	127.82 $\pm$ 7.36 <sup>b</sup>	34.54 $\pm$ 4.49	93.27 $\pm$ 8.76 <sup>b</sup>	9.66 $\pm$ 0.57 <sup>c</sup>	0.89 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>
<b>0.65 mg/L NH<sub>3</sub>+0.81 <math>\mu\text{g/L}</math> Tr</b>	147.14 $\pm$ 14.47 <sup>b</sup>	35.48 $\pm$ 2.09	111.66 $\pm$ 12.80 <sup>b</sup>	11.19 $\pm$ 0.86 <sup>bc</sup>	1.03 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>
<b>1.61 mg/L NH<sub>3</sub></b>	184.30 $\pm$ 18.20 <sup>c</sup>	33.68 $\pm$ 1.09	150.62 $\pm$ 18.91 <sup>c</sup>	9.29 $\pm$ 0.43 <sup>c</sup>	0.75 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
<b>1.61 mg/L NH<sub>3</sub>+ 0.81 <math>\mu\text{g/L}</math> Tr</b>	93.50 $\pm$ 5.00 <sup>a</sup>	39.63 $\pm$ 1.43	53.87 $\pm$ 4.24 <sup>a</sup>	9.41 $\pm$ 0.59 <sup>c</sup>	0.73 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>

Veriler aritmetik ortalama $\pm$ standart hata şeklinde verilmiştir. Aralarında istatistiksel olarak ayırım bulunan gruplar farklı harflerle gösterilmiştir ( $P<0.05$ ;  $N=6$ )

#### 4.1.2.2. Non Protein Tiyol (NP-SH) Düzeyi

Farklı amonyak derişimleri ve tribenuron metilin *C. contraria*'da NP-SH miktarı üzerine etkisi Şekil 4.6 ve Çizelge 4.3'te verilmiştir. *Chara contraria*'da NP-SH düzeyinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ( $P>0.05$ ; Şekil 4.6 ve Çizelge 4. 3). NP-SH miktarı ile PB-SH ( $P<0.05$ ;  $r = -0.421$ ) miktarı arasında negatif korelasyon tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

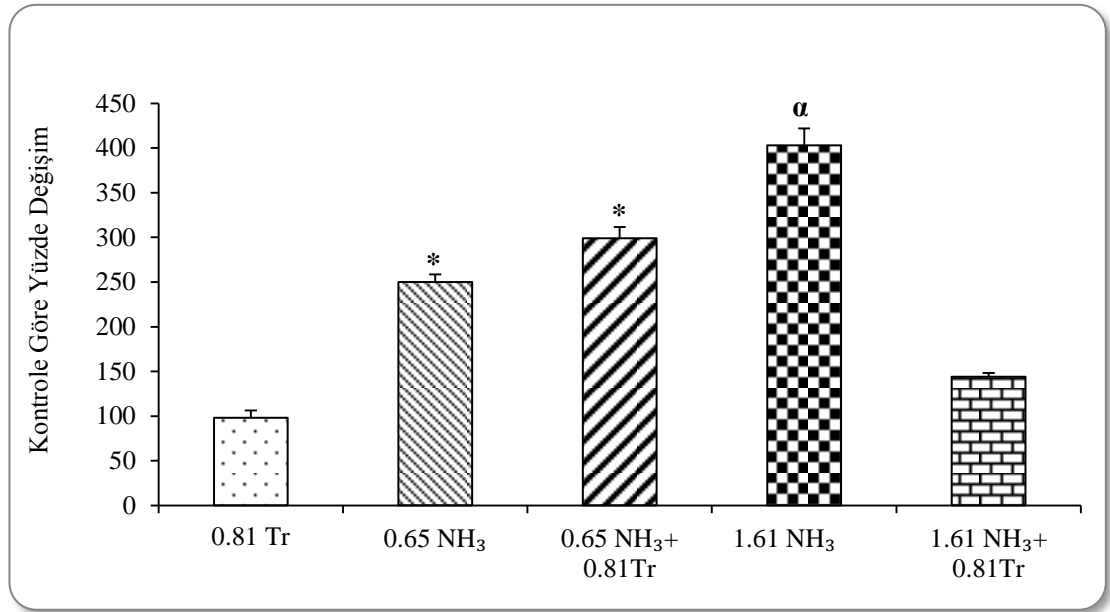


Şekil 19.6 Farklı amonyak derişimleri ve tribenuron metil etkisindeki *C. contraria*'da NP-SH miktarının kontrole göre yüzde değişimi

#### 4.1.2.3. Protein Bağlı Tiyol (PB-SH) Düzeyi

Tribenuron metil ve farklı amonyak derişimleri etkisindeki *C. contraria*'da PB-SH düzeyleri Şekil 4.7 ve Çizelge 4.3'te gösterilmiştir. PB-SH miktarlarında tribenuron metilin tek ve yüksek amonyak derişimiyle birlikte uygulandığı gruplarda kontrole göre anlamlı bir farklılık görülmemiştir ( $P>0.05$ ; Şekil 4.7 ve Çizelge 4.3). Amonyak derişiminin artmasıyla birlikte PB-SH miktarları da artmıştır. Düşük amonyak derişiminin ayrı verildiği grupta %150 oranında gözlenen artış, herbisit

verilmesiyle birlikte %199'a çıkmıştır. Yüksek amonyak derişiminin tek başına uygulandığı grupta %303 oranında artış meydana gelirken, tribenuron metilin aynı derişimle birlikte verilmesi sonucu PB-SH düzeyi kontrol düzeyine azalmıştır (Şekil 4.7). PB-SH miktarı ile protein ( $P<0.01$ ;  $r = 0.447$ ) miktarı arasında pozitif korelasyon tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).



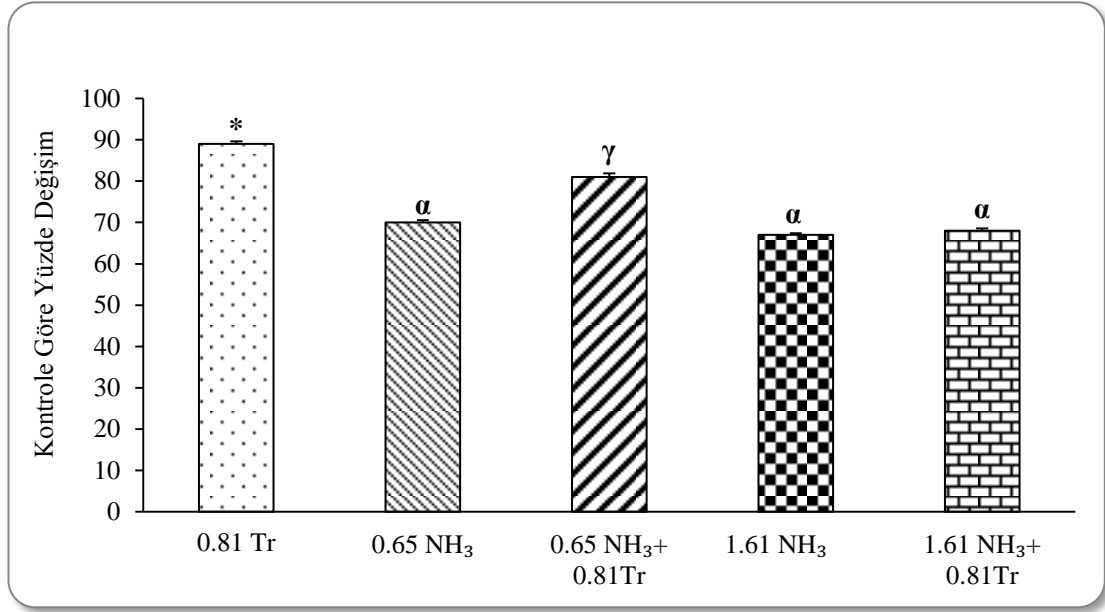
Şekil 207 Farklı amonyak derişimleri ve tribenuron metil etkisindeki *C. contraria*'da PB-SH miktarının kontrole göre yüzde değişimi. Yıldız (\*) ve alfa (α) işaretleri kontrol grubu ile aralarındaki istatistiksel ayırımı ifade etmektedir

#### 4.1.3. Tribenuron Metil ve Amonyakın Farklı Derişimlerinin *C. contraria*'da TBARS Miktarı Üzerine Etkileri

Tribenuron metil ve farklı amonyak derişimlerinin, *C. contraria* TBARS miktarı üzerine etkisi Şekil 4.8 ve Çizelge 4.3'te verilmiştir. TBARS miktarı, bütün uygulamalarda kontrole göre azalmıştır ( $P<0.05$ ; Şekil 4.8 ve Çizelge 4.3). En fazla azalma %33 oranında 1.61 mg/L NH<sub>3</sub> grubunda görülmüştür. En az düşüş ise %11 oranı ile herbisit tek başına verildiği grupta gözlenmiştir. Düşük amonyak derişiminin tek başına verildiği grupta TBARS miktarında %30 oranında azalma meydana gelirken, herbisit bu derişime eklenmesi sonucu TBARS miktarında %19



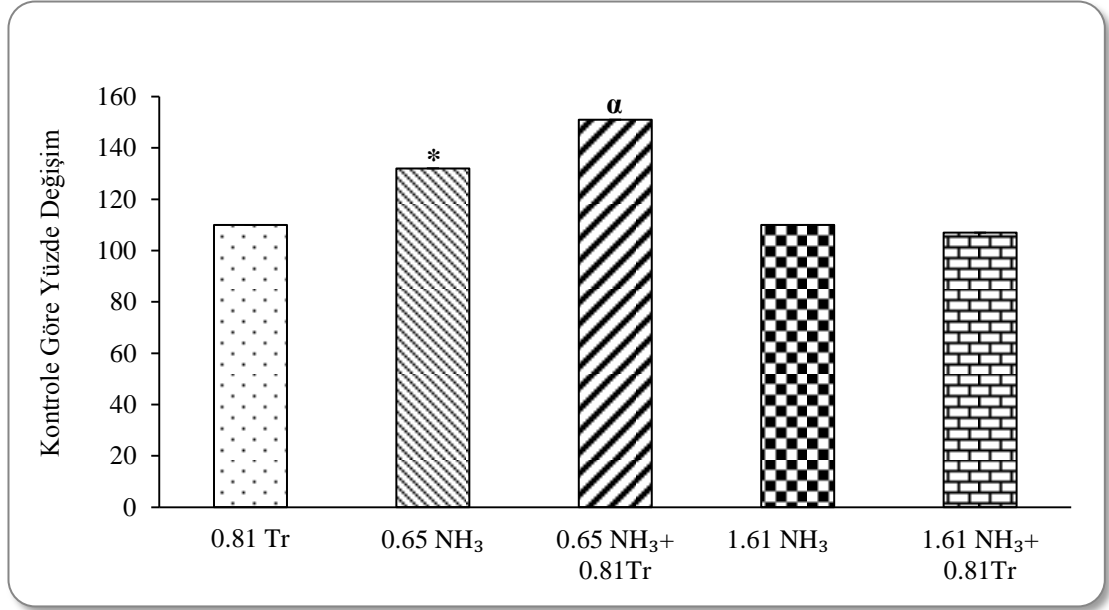
oranında bir azalma meydana gelmiştir. TBARS düzeyi ile NP-SH ( $P<0.01$ ;  $r = 0.331$ ) düzeyi arasında pozitif, PB-SH ( $P<0.01$ ;  $r = -0.334$ ) düzeyi ile negatif korelasyon tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).



Şekil 218 Farklı amonyak derişimleri ve tribenuron metil etkisindeki *C. contraria*'da TBARS miktarının kontrole göre yüzde değişimi. Yıldız (\*), alfa ( $\alpha$ ) ve gama ( $\gamma$ ) işaretleri kontrol grubu ile aralarındaki istatistiksel ayrımı ifade etmektedir

#### 4.1.4. Protein Düzeyi

Farklı amonyak derişimleri ve tribenuron metilin *C. contraria*'da protein miktarı üzerine etkisi Şekil 4.9 ve Çizelge 4.3'te gösterilmiştir. Düşük amonyak derişiminin tek başına uygulandığı grupta %32 oranındaki artış, herbisit kültür ortamına eklenmesiyle birlikte %51'e çıkmıştır ( $P<0.05$ ; Şekil 4.9). Yüksek amonyak derişiminin tek başına ve tribenuron metille birlikte uygulandığı gruplarda ve sadece herbisit uygulanan grupta *C. contraria*'da protein miktarında kontrole göre anlamlı bir farklılık görülmemiştir ( $P>0.05$ ; Şekil 4.9 ve Çizelge 4.3).



Şekil 229 Farklı amonyak derişimleri ve tribenuron metil etkisindeki *C. contraria*'da protein miktarının kontrole göre yüzde değişimi. Yıldız (\*) ve alfa (α) işaretleri kontrol grubu ile aralarındaki istatistiksel ayrımı ifade etmektedir

**4.2. TARTIŞMA**

Farklı amonyak derişimlerinin ve tribenuron metil herbisidinin *C. contraria* üzerindeki etkileri incelenmiştir. Yapılan ön çalışmalarda *Chara contraria* 3.22 mg/L NH<sub>3</sub> derişimine maruz bırakılmış ve uygulamanın 7. gününden itibaren makrofitin sarardığı ve çürümeye başladığı görülmüştür. NH<sub>3</sub> ve NH<sub>4</sub><sup>+</sup>'ün farklı derişimlerinin (3.5, 20, 50 ve 100 mg/L) *S. polyrrhiza* su mercimeğinin büyümesi üzerine etkisi çalışılmıştır [114]. Yüksek azot derişimleri su mercimeğinin büyümesini inhibe etmiştir. Aynı şekilde, toprağa amonyak uygulanmış ve alkali özelliğinden dolayı yüksek pH'ta hücresel solunumu inhibe ederek arpada toksik etki göstermiştir [115]. *Lemna gibba* kültür ortamına NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ilavesinde, amonyum hücre duvarında depolarizasyona neden olmuştur [134]. Bu nedenle, çevresel sularda en yüksek derişim olarak ölçülen 3.22 mg/L amonyak derişiminin yarısı (1.61 mg/L NH<sub>3</sub>) ve 0.65 mg/L NH<sub>3</sub> derişimi tercih edilmiştir.

Ekosistemlere çeşitli kirletici kaynaklardan geçen aşırı NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, makrofitler için toksik olmakta ve bunun sonucunda ROT oluşmaktadır. Oluşan ROT'lar pigment sentezini, azot ve protein metabolizmasını, membran bütünlüğünü, mineral alımını olumsuz etkilemektedir [117]. Makrofitler bu tür hücresel dejenerasyonları önlemek için de enzim aktivitelerini artırabilmektedir. Makrofitlerin, amonyağın neden olduğu serbest radikallerden (HO<sup>•</sup>, O<sub>2</sub><sup>-</sup> ve <sup>1</sup>O<sub>2</sub>) kendilerini korumak amacıyla enzim aktivitelerini artırdığı ifade edilmiştir [117]. Oksidatif hasarın azaltılmasında önemli bir yeri olan APx enzimi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi suya çeviren ve onu detoksifiye eden önemli bir antioksidandır. Çalışmamızda, tribenuron metil ve farklı amonyak derişimlerinin etkisindeki *C. contraria*'da APx enzim aktivitesinin, tüm uygulama gruplarında arttığı tespit edilmiştir. Kullanılan herbisit ve amonyak derişimleri serbest radikal oluşumunu uyarılmış ve oluşan serbest radikallerin uzaklaştırılabilmesi için de APx enzim aktivitesi artmıştır. Özellikle tribenuron metilin tek başına uygulandığı grup ve herbisit yüksek amonyak derişimi ile kombinasyonu olan gruplarda dikkat çeken bir artış olmuştur. Bu sonuç, muhtemelen herbisit amonyağın toksisitesini artırmasıyla ortaya çıkmıştır. *Hydrilla verticillata* makrofiti NH<sub>4</sub>Cl'ye maruz bırakılmış, uygulamanın 4. gününde O<sub>2</sub><sup>-</sup> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının arttığı ve bu durumun

da APx enzim aktivitesini uyardığı tespit edilmiştir [135]. Başka bir çalışmada ise *H. verticillata*'da, NH<sub>4</sub>Cl tek başına ve SNP ile birlikte uygulandığında APx aktivitesinde benzer şekilde anlamlı artışlar olmuştur [113]. Çalışmamızda, yüksek amonyak derişimindeki APx aktivitesi düşük amonyak derişimine göre daha fazla olmuştur. Derişime bağılı olarak aktivitenin artışı, yüksek derişimlerin daha toksik olduğunu göstermektedir. *Hydrilla verticillata* bitkisi NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N'nin 0.2, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 15.0 ve 20.0 mg/L derişimlerine maruz bırakıldığında, derişim artışına bağılı olarak APx aktivitesinin önemli bir artış sergilediği rapor edilmiştir [117].

Amonyak dışında yabancı ot mücadelesinde kullanılan herbisitler de APx artışına neden olabilmektedir. Çalışmada kullanılan *C. contraria*, tribenuron metil herbisitine maruz bırakıldığında, amonyakta olduğu gibi kontrole göre artış olmuştur. *Azolla microphylla* ile yapılan araştırmada [107], paraquat (PQ) herbisitinin zamana bağılı olarak APx aktivitesine etkisi incelenmiştir. Düşük PQ derişiminin bitkiyi etkilemediği fakat yüksek derişimlerin ROT birikimine neden olduğu belirtilmiştir. ROT birikimi, eğreltide APx antioksidan enzim aktivitesinin artışına neden olmuştur. Çalışma ile, herbisit kaynaklı canlılarda oluşan serbest radikalleri uzaklaştırmak için enzim aktivitesinin arttığı söylenebilir.

Kullanılan farklı amonyak derişimleri ve tribenuron metil kaynaklı oluşan aşırı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, membran peroksidasyonuna neden olan HO<sup>•</sup> radikalının oluşumuna neden olur [136]. Oluşan HO<sup>•</sup>'nun neden olduğu membran peroksidasyonunu önlemek için de bitkiler APx miktarını artırabilmektedir. APx'in oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi uzaklaştırarak gösterdiği koruyucu özellik sayesinde, LPO'nun önlenemediğini ve bu durumda TBARS düzeyinin azaldığını söyleyebiliriz. *Vallisneria natans* makrofiti NH<sub>4</sub>Cl'nin farklı derişimlerine maruz bırakılmış ve antioksidan enzimlerin (APx, SOD ve CAT), amonyağın etkisiyle oluşan serbest radikalleri detoksifiye etmesi sonucu membran bütünlüğünün korunduğu ve dolayısıyla TBARS içeriğinin azaldığı belirtilmiştir [136].

Çevresel stres koşullarında bitkiler, DHAR enzimi aracılığıyla dehidroaskorbati (DHA), askorbik aside (AsA) indirgeyerek oksidatif hasardan korunurlar. Enzimin aktivite gösterebilmesi için de ortamdaki DHA'nın belli bir oranda bulunması önemlidir. Aksi takdirde okside DHA, DHAR enzimini inhibe

edebilir ve bitkilerin antioksidan kapasiteleri de bu durumda azalabilir. Yüksek amonyak derişimi ve herbisit kombinasyonu olan grup hariç diğer uygulamalarda DHAR aktivitesi azalmıştır.

Tribenuron metil etkisinde *C. contraria*'da DHAR aktivitesinin azalmasında, tribenuron metilin enzimin aktif bölgesine veya tiyol bölgesine bağlanması ile enzimin aktif merkezinin ya da substrat bağlanma bölgesinin bozulması etkili olabilmektedir. *Lemna gibba*'nın gümüş metaline maruz kalması sonucu, enzimlerin inhibe olmasında kullanılan toksikantın enzimin tiyol bölgesine bağlanmasının etkili olduğu ifade edilmiştir [137]. Oxyfluorfen herbisitinin etkisindeki *Glycine max*'da, DHAR enziminin sentezini sağlayan gen baskılanmış ve enzimin inaktivasyonu veya yıkımı ile birlikte aktivitesi azalmıştır [138]. Aynı şekilde chrysotile asbestosuna maruz bırakılan *L. gibba*'da da DHAR aktivitesinin azaldığı ve bu sonucun oluşmasında Knörzer ve ark.[138]'nın ifade ettikleri mekanizmanın etkili olduğu vurgulanmıştır [139].

Çalışmamızda tribenuron metil grubunda olduğu gibi düşük amonyak derişimi ve bu derişimin herbisitle birlikte uygulandığı gruplarda da enzim aktivitesi kontrole göre azalmıştır. Bu gruplarda enzim aktivitesinin azalmasında, amonyak derişiminin toksisite için yeterli olmadığı ve bu nedenle aktivitenin azaldığı söylenebilir. 0.16–0.25 mg/L NH<sub>4</sub><sup>+</sup> derişimlerinin, *C. demersum*, *M. spicatum* ve *V. natans* makrofitlerinin büyümeleri üzerinde toksik olmadığı ve bunun NH<sub>4</sub><sup>+</sup>'ün azot kaynağı olarak kullanımının etkili olduğu ifade edilmiştir [118]. Bilindiği gibi DHA, DHAR katalizörlüğünde AsC-GSH döngüsünde AsA'ya indirgenerek bitkilerin antioksidan kapasitesini artırmaktadır [47]. Ancak DHA bazı durumlarda indirgenmeyerek ortamda birikebilmekte ve bu da DHAR'ın aktivitesini düşürebilmektedir. Kadmiyum etkisindeki *C. demersum*'da aşırı DHA birikimi nedeniyle DHAR aktivitesinde azalma olduğu bildirilmiştir [140]. Bu enzim oksidatif strese karşı bitkileri koruyan bir antioksidan olduğu için, aktivitesinin azalmasıyla birlikte organizmalar oksidatif hasara karşı açık hale gelebilmektedir [48]. DHAR aktivitesinin yetersiz olduğu koşullarda organizmalar, enzimatik olmayan antioksidan savunma bileşenleri olan tiyol miktarını artırabilmektedir. *Chara contraria*'da DHAR aktivitesinin azalması sonucu tiyol miktarı artmıştır.

Çelekli ve ark. [141] filamentli alglerle yaptıkları çalışmada, ortamda bulunan ağır metallerin oksidatif hasara neden olduğunu ve oksidatif hasarın etkilerini azaltmak için de total tiyol düzeyinin arttığını rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda yüksek amonyak derişiminde DHAR enzim aktivitesi azalmış ve bu derişimin herbisitle birlikteliği sonucunda aktivitesi artmıştır. Çünkü yüksek amonyak derişimlerinde herbisit de verilmesi ROT oluşumunu uyarmaktadır ve oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilebilmesi için enzim aktivitesi artmakta, bitki herbisit etkilerini azaltabilmektedir [55]. Kadmiyum etkisindeki *C. demersum*'da, , ortama çinko (Zn) ilavesiyle ROT türlerinin detoksifiye edildiği ve bunun sonucunda AsA ve GSH seviyelerinin korunması amacıyla aktivitesi azalan DHAR enziminin tekrardan arttığı bildirilmiştir [140].

Bitkilerde, bazı durumlarda enzimatik antioksidan kapasite, maruz kalınan toksikantın türüne göre yetersiz kalabilmektedir. Böyle durumlarda diğer bir enzimatik antioksidan veya enzimatik olmayan antioksidan etkili olabilmektedir. Çalışmamızda GPx enzim aktivitesi bütün uygulama gruplarında kontrole göre azalmıştır. Düşük amonyak derişimi ve bu derişimin tribenuron metille kombinasyonu olan gruptaki azalma diğer gruplara oranla daha fazla olmuştur. Herbisit ve oluşan aşırı miktardaki ROT'ların, enzim aktivitesinin azalmasında önemli birer faktör olmaları muhtemeldir. Enzim aktivitesinin azaldığı böyle bir durumda ise total tiyol ve protein bağlı tiyol antioksidan miktarlarının artması, bitkinin bu koşullara karşı dirençli hale gelmesini sağlamıştır. Aynı şekilde APx aktivitesinin artışı da, GPx'in yetersiz kaldığı bu koşullarda antioksidan kapasiteyi desteklemektedir.

Tribenuron metil etkisindeki *C. contraria*'da GPx aktivitesi azalmıştır. Herbisit kaynaklı ROT'lar veya radikal olmayan türler özellikle de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GPx aktivitesini inhibe edebilir. PQ etkisindeki *Azolla microphylla*'da PQ derişimine bağlı artan ROT nedeniyle GPx aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir [107]. PQ herbisiti etkisindeki marul tohumlarında, GPx aktivitesi herbisit etkisiyle güçlü bir şekilde inhibe edilmiştir [142]. PQ derişiminin artışında GPx aktivitesi görülmemiş, aktivitenin azalmasında ise kullanılan herbisit türlerine göre farklı radikaller etkili olmuştur. Metribuzin herbisiti *Zea mays* GPx aktivitesini inhibe etmiştir [143].

İsoproturona maruz bırakılan *Zea mays*'da GPx aktivitesi, etki süresinin artışına bağlı olarak azalmıştır [144].

Düşük amonyak derişimi ve bu derişimin herbisitle birlikte verildiği gruplarda aktivitenin kontrole göre önemli bir oranda düştüğü tespit edilmiştir. Aynı zamanda bu derişimin herbisitle birlikte verilmesi ile enzim aktivitesinin bu iki grup arasında değişmediği belirlenmiştir. Temel olarak GPx aktivitesinde tespit edilen azalmada etkili olan faktörlerin, yukarıda da anlatıldığı gibi herbisit toksisitesi veya herbisit enzimin aktif bölgesine bağlanmasının etkili olduğunu ifade edebiliriz [107,137,143].

Çalışmamızda kullandığımız düşük derişim amonyak miktarları GPx aktivitesini azaltırken, amonyak derişimlerinin artışıyla birlikte GPx aktivitesinin düşük derişimlere oranla arttığı tespit edilmiştir. Amonyagin yüksek derişimleri ROT oluşumunu uyarmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız yüksek amonyak derişimleri düşük derişimlere oranla GPx aktivitesini artırmıştır. *Myriophyllum mattogrossense* makrofiti NH<sub>4</sub>Cl'nin 0.1, 1.0, 10.0, 20 ve 30.0 mg/L derişimlerine 7 gün boyunca maruz bırakılmış ve makrofitin GPx aktivitesinde, sadece 20 mg/L derişiminde önemli bir artış olmuştur. GPx aktivitesindeki bu artışın ise LPO'nun toksik ürünü olan 4-HNE'nin detoksifikasyonunu sağlamaya yönelik olduğu bildirilmiştir [145]. Bu çalışmadan farklı olarak araştırmamızda, GPx aktivitesinin LPO'nun indikatörü olan TBARS miktarının azalmasında etkili olmadığı tespit edilmiştir. Enzim aktivitesinin etkili olmadığı bu durumda, TBARS miktarının azalmasında enzimatik olmayan antioksidanlar etkili olmuştur. GPx aktivitesi ile T-SH ve PB-SH arasında saptanan negatif korelasyon bu düşüncüyü doğrulamaktadır. *Ceratophyllum demersum* arseniğe maruz kaldığında tiyol içeriği çalışmamızda olduğu gibi önemli oranda artmıştır [146]. Dolayısıyla da enzim aktivitesindeki azalma, toksikantların neden olduğu ROT'ların uzaklaştırılabilmesi için T-SH ve PB-SH miktarlarının artmasını sağlamıştır. Çeşitli havuzlardan toplanan *Cladophora glomerata* örneklerindeki tiyol ve PB-SH içeriğindeki artışın artan oksidatif hasarı azaltmaya yönelik olduğu bildirilmiştir [147]. GPx aktivitesi ile DHAR aktivitesi arasında ise pozitif korelasyon tespit edilmiştir. Bu iki enzim kullanılan toksikant kaynaklı oluşan ROT'ların detoksifiye edilebilmesi için GSH kullanılmaktadır. GSH'nin, proteinlere

bağlanması ile birlikte tükenmesi sonucu GPx ve DHAR aktiviteleri azalabilmektedir [143]. DHAR ve GPx arasında tespit edilen pozitif ilişki, enzim aktivitesinin yeterli olmadığı koşullarda enzimatik olmayan antioksidan düzeylerinin artış nedeni olabilir.

Redükte glutatyon; bitki, mantar, hayvan ve alglerde detoksifikasyon mekanizmasında rol oynayan, düşük moleküler ağırlıklı protein olmayan önemli bir tripeptittir. Yapısında bulunan tiyol grupları sayesinde ağır metal, herbisit gibi ksenobiyotiklerle bağlantı kurarak onları detoksiye etmektedir ve bu tepkimeleri de GST katalizörlüğünde gerçekleştirmektedir. GST'nin aktivite gösterebilmesi için ortamda yeterli miktarda GSH bulunması gerekmektedir. GSH'nin yetersiz olduğu durumlarda ise GST aktivitesi azalmaktadır.

Tribenuron metilin uygulandığı grupta GST enzim aktivitesi azalmıştır. Bu durum, kullanılan herbisit, enzimin aktif bölgesine bağlanması ile birlikte enzimin inaktif olması şeklinde gerçekleşmektedir. Ayrıca GSH sentezini sağlayan enzimlerin ( $\gamma$ -glutamilsistein sentaz ve GSH-sentaz) inhibe olmasıyla da ilişkili olabilir. *Lemna gibba*'nın gümüş metaline maruz bırakılması sonucu enzim aktivitesinde belirlenen inhibisyonun, enzimin tiyol bölgesine, kullanılan toksikantın bağlanmasının etkili olabileceği bildirilmiştir [137] İsoproturon herbisitine maruz bırakılan *Zea mays* yapraklarında GSH sentezini sağlayan enzimlerin inhibisyonu ve GSH'nin tükenmesi sonucu GST aktivitesinin azaldığı ifade edilmiştir [144].

Düşük amonyak derişimi ve bu derişimin herbisitle birlikte uygulandığı gruplarda da GST aktivitesi düşmüştür. Bu gruplarda GST aktivitesi azalırken protein miktarının da arttığı belirlenmiştir. Bazı durumlarda amonyak derişimleri makrofitler için besi tuzu olduğundan dolayı organizmadaki protein miktarının artışında, bu amonyağın organizma tarafından azot kaynağı olarak kullanım şekline dönüştürülmesinin etkili olabileceği ifade edilmiştir [118]. *Lemna minor*'da, amonyağın azot kaynağı olarak kullanılması sonucu düşük derişimlerinin protein içeriğinin artışında etkili olduğu bildirilmiştir [148].

Çalışmamızda yüksek amonyak derişimi ve bu derişim ile birlikte herbisit uygulanması GST enzim aktivitesini artırmıştır. Makrofitin, herbisit veya yüksek amonyak derişimi kaynaklı oluşan ROT'ları detoksifiye etmek amacıyla GST enzim aktivitesini artırdığı söylenebilir. Kullanılan herbisit veya amonyağın yüksek



derişiminin etkisi ile LPO oluşmaktadır. Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan bileşenlere GST'nin bağlanması sonucu detoksifikasyon mekanizmasının arttığını ifade edebiliriz. Fluorodifen herbisiti etkisindeki *Myriophyllum* spp. makrofitinde oluşan serbest radikallerin uzaklaştırılması amacıyla GST aktivitesi artmıştır [63]. Aynı şekilde *Ulva pertusa* makrofitinde hem coumaphos insektisinin etkisi ile oluşan ROT'ların hem de herbisit detoksifiye edilebilmesi için GST aktivitesinin önemli oranda arttığı ifade edilmiştir [68]. Azoxystrobin fungusidi etkisindeki *M. quitense*'de artan GST aktivitesinin GSH'ın toksikantla konjugasyonu sonucu detoksifikasyonu ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir [111].

Çalışmamızda GST aktivitesi ile TBARS düzeyleri arasında negatif korelasyon bulunmuştur. Amonyak ve herbisit etkisi ile oluşan hidroperoksitlerin detoksifikasyonu için GST enzim aktivitesinin arttığını ve bu nedenle azalan TBARS düzeylerinin artan GST aktivitesi ile ilgili olduğunu önermekteyiz. GST bu şekilde lipit peroksidasyonu zincir tepkimesini durdurarak yüksek amonyak derişimi ve tribenuron metilin etkisinde bozulan membran bütünlüğünün korunmasına katkı sağlamaktadır. Coumaphos etkisindeki *U. pertusa*'da lipit peroksidasyonundaki azalmanın artan GST aktivitesi nedeni ile olabileceği bildirilmiştir [68]. *Hydrilla verticillata*'da, NH<sub>4</sub>Cl'nin etkisinde oluşan organik peroksitlerin uzaklaştırılması amacıyla GST aktivitesinin arttığı ifade edilmiştir [135].

Enzimatik antioksidanların inhibe edildiği veya yetersiz kaldığı koşullarda organizmalar, antropojenik veya doğal toksikantlara karşı enzimatik olmayan antioksidanlar; tiyoller, non protein tiyoller ve protein bağlı tiyoller aracılığıyla korunabilmektedir. Tiyoller; antioksidan kapasitelerini proteinlere bağlanarak, ortamda serbest bir halde bulunarak veya toksikantla bağlantı kurarak etki göstermektedir. Bu tepkimelerin bir sonucu olarak da miktarları azalabilmektedir.

Tribenuron metil bitkiler için düşük derişimlerde bile toksik olmuştur [30,34]. Dolayısıyla toksisitenin azaltılabilmesi için de herbisit detoksifiye edilmesi gereklidir. Detoksifikasyon mekanizmasının ise birçok organizmada olduğu gibi herbisit GST aracılığıyla GSH gibi tiyollere bağlanması ile gerçekleştiği bilinmektedir [149]. Herbisit tiyollere bağlanması ya da herbisit-indüklü ROT oluşumu da tiyollerin tükenmesine neden olmuştur [143]. Çalışmamızda herbisit

uygulanan grupta tiyol miktarının kontrole göre değişmemesi benzer mekanizma ile oluşan tiyollerin detoksifikasyon amacıyla herbisite bağlanması sonucu tükenmesi ve miktarı azalan tiyollerin *de novo* sentezi ile yeniden üretiminin etkili olduğunu söyleyebiliriz [79]. Metribuzin ve pretilachlor herbisitlerine maruz bırakılan mısırdaki total tiyol içeriğinin arttığı ve herbisitlerin detoksifikasyonunda GSH'ın herbisitlerle olan konjugasyonunun *de novo* sentezini uyarmış olabileceği bildirilmiştir. Ancak metribuzin ile muamelede tiyol içeriğinin ilk 4 gün içinde arttığı daha sonrasında sınırlandığı, pretilachlorun etkisinde ise deney boyunca tiyol düzeyinin arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca herbisit etkisindeki mısırdaki GSH'daki hafif artışın GSSG'ın GSH'a indirgenmesindeki başarısızlık olabileceği düşünülmüştür [143]. Dolayısıyla tiyol miktarının artabilmesi için de maruz kalma süresinin ve GSH'ın yeniden oluşumunun önemli birer kriter olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu düşünceden yola çıkarak tribenuron metilin etkisindeki *C. contraria*'da tiyol miktarlarının kontrole göre değişmemesinde, etki süresinin ve GSH'ın tekrardan oluşumunun etkili olabileceğini söylemek mümkündür.

Makrofitler protein sentezinde kullanılmak üzere azot kaynağı olarak nitrat yerine amonyumu tercih etmektedirler [114,150]. Azotun bu formda tercih edilmesinde nitrata oranla daha düşük enerji tüketimine neden olması etkilidir. Amonyum, düşük derişimlerde makrofitler için önemli bir besin kaynağıdır [150,151]. *Chara contraria* kültür ortamına eklenen  $NH_4Cl$ 'yi absorbe ederek azot kaynağı olarak kullandığı için T-SH düzeyi düşük amonyak derişimi uygulanan grupta yükselmiştir. Amonyakın düşük derişiminin toksik olmaması da yapısında bulunan azotun protein sentezinde kullanılma olasılığını artırmaktadır [118]. Yüksek amonyak derişimleri, bitki büyüme ve gelişmesinde etkili olan glutamin aminoasidinin sentezini inhibe etmektedir. Glutamin sentaz, glutamin sentezini ve azot alımını sağlayan bir enzim olup yüksek amonyak derişiminde aktivitesi inhibe edilmektedir [116]. Ancak çalışmamızda amonyağın düşük derişiminde (0.65 mg/L), azot metabolizmasında etkili olan enzim aktivitesinin inhibe edilmediğini bu araştırmanın ışığında ifade etmek mümkün olabilmektedir. Azotun sınırlı olduğu sulak alanlarda aminoasit sentezinin artmasıyla bitki biyoması arasında bir ilişki olduğu ve azotun ortamdaki optimum oranının önemli olduğu bildirilmiştir [150]. Bitki

hücrelerinde yüksek oranda biriken aminoasitler gelişmeyi olumsuz etkilemektedir. Dolayısıyla bu derişimde protein sentezini sağlayan enzimlerin inhibe olmaması nedeniyle protein ve tiyol miktarının arttığını söylemek mümkün olmuştur [116,148].

Yüksek amonyak derişimi, bitki kültür ortamına tek başına verildiğinde T-SH düzeyi kontrole göre önemli derecede artmıştır. Yüksek amonyak derişimlerinin bitkilerde ROT oluşumunu uyardığı çalışmalarda belirtilmiştir [116,117,150]. Dolayısıyla çalışmamızda yüksek amonyak derişiminde tiyol miktarının önemli oranda artışının, amonyak kaynaklı ROT'ların detoksifikasyonuna yönelik olduğunu düşünmekteyiz. Arpada tuz stresine karşı, kükürt varlığında tiyol miktarının arttığı ve bu gruptaki bitkilerin oksidatif strese karşı daha dayanıklı olduğu ifade edilmiştir [152]. Yapılan bu çalışma oksidatif hasarın tiyoller ile azaltıldığına dair bulgularımızı destekler niteliktedir. Ayrıca yüksek amonyak derişiminde T-SH düzeyinin, kullanılan amonyağın azot kaynağı olarak kullanılması sonucu artması da başka bir ihtimaldir. *Vallisneria natans* makrofiti  $\text{NH}_4^+$ 'ün farklı derişimlerine maruz bırakılmış ve artan amonyum miktarının toksisitesini azaltmak için bitkinin, amonyumu azot bakımından zengin aminoasitlere çevirdiği bildirilmiştir [150]. *Myriophyllum brasiliense* makrofitinin yüksek  $\text{NH}_4^+$  derişimlerinin toksisitesini azaltmak için, amonyum alımını arttırarak dokularda azot birikimini sağladığı ve bu azotu aminoasit sentezinde veya azotlu bileşiklerin sentezinde kullandığı bildirilmiştir [151].

Yüksek amonyak derişiminin tribenuronla verildiği grupta T-SH düzeyinin kontrole göre değişmemesine rağmen sadece yüksek amonyak derişiminde azaldığı görülmüştür. Amonyağın düşük derişimleri bitkiler için temel bir besin tuzu olduğu halde yüksek derişimleri toksik olmuştur. Amonyak kaynaklı oluşan ROT'lar oksidatif stresi uyarır, bitkide su kaybına neden olur ve fotosentezi inhibe eder [153]. Deney ortamına eklenen herbisit ise amonyağın toksisitesini daha da artırmaktadır [5]. Bakır elementinin orta ve yüksek seviyeleri amonyak toksisitesini artırmıştır [153]. Makrofit metabolizması sonucu oluşan tiyollerin, ROT'ların ve herbisitinin toksisitesini azaltabilmek için bu bileşenlere bağlanmasıyla birlikte miktarları azalabilmektedir. Toksikantların benzer bir mekanizma ile detoksifiye edildiği ifade edilmiştir [153]. Bu araştırmada aşırı amonyak ve bakır derişimlerinde *V.natans*'ın

bir antioksidan olan prolin sentezini artırdığını, oluşan prolinin de ağır metale bağlanarak bitkinin ağır metale karşı direnç kazandığını tespit etmişlerdir.

Bir tiyol olan GSH'ın ortamda yeterli düzeyde bulunması, GPx ve GST aracılığıyla ortamdaki serbest radikallerin ve herbisitlerin indirgenebilmesi için oldukça önemlidir [143]. T-SH ile DHAR ve GPx aktiviteleri arasında negatif korelasyon bulunmuştur. Görülen bu negatif korelasyon, yüksek amonyak derişimlerinde DHAR ve GPx aktivitelerinin azaldığının, GSH'ın yeterli düzeyde kullanılmadığının ve ortamda bulunan ROT veya herbisit uzaklaştırılmadığının bir göstergesi olabilir. Bu durumda ROT ve herbisitlerin detoksifiye edilebilmesi GST katalizörlüğünde gerçekleşecektir. İki farklı herbisite maruz bırakılan *Zea mays*'da tiyol miktarındaki artışın GST ve GPx aktiviteleri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [143]. 1.61 mg/L NH<sub>3</sub>+0.81µg/L grubundaki GST aktivitesinin artmasıyla herbisit GSH'la bağlantısının sağlandığı ve bu nedenle de tiyol miktarının azalmış olduğunu söylemek mümkün hale gelmiştir [143].

Bilindiği gibi çeşitli stres faktörlerinin etkisinde oluşan ROT'lar, membran bütünlüğünü ve geçirgenliğini bozarak oksidatif strese neden olabilmektedir [154]. Çalışmamızda oksidatif stresin azaltılabilmesi için tiyollerin, membran proteinlerine bağlanmasıyla PB-SH miktarları artmış olabilir. *Elsholtzia haichowensis* bitkisi aşırı Cu'ya maruz bırakılmış ve oluşan oksidatif stres nedeniyle tiyol miktarı artmıştır [78]. Oluşan tiyollerin büyük çoğunluğunun proteine bağlanarak bitkinin oksidatif stresten korunduğu bildirilmiştir. Ayrıca çalışmamızda tiyollerin antioksidan etkisinin bir sonucu olarak protein miktarlarının arttığı da tespit edilmiştir. Sonuç olarak, kullanılan toksikantların neden olduğu ROT'ların uzaklaştırılabilmesi için T-SH miktarının arttığı söylenebilir.

Tribenuron metil makrofitler için düşük derişimlerde bile toksik olabilmektedir [34]. Herbisit toksisitesi GSH'ın, GST katalizörlüğünde herbisite bağlanması ile giderilebilmekte veya azaltılabilmektedir. Çalışmamızda 0.81 µg/l tribenuron metil derişiminde NP-SH miktarında kontrole göre herhangi bir değişim meydana gelmemiştir. Bu sonucun ortaya çıkması, NP-SH olan GSH'ın, herbisit detoksifikasyonu amacıyla sentezinin artması ve daha sonra da kullanılmasıyla ilgili olduğu söylenebilir. GSH'ın, herbisit kaynaklı oluşan ROT'ların yıkıcı etkilerini

azaltabilmesi için bu moleküllere bağlanması sonucunda NP-SH miktarında önemli bir değişim olmamıştır. Nemat Alla ve ark. [143] mısırla ilgili yaptıkları araştırmada, GSH miktarındaki azalmanın, herbisit ve ROT'ların detoksifiye edilebildiğinin bir kanıtı olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda, NP-SH'ın miktarında anlamlı olmayan değişikliğin, GSH'ın tükenmesi sonucu başka tiyollerin sentezinin artmasıyla da ortaya çıkmış olabileceği diğer bir ihtimaldir. *Brassica napus*'ta Zn'nin düşük derişiminin yapraklarda NP-SH miktarını artırdığı, derişim artışının ise hem köklerde hem de yapraklarda NP-SH düzeyini azalttığı belirtilmiştir [155]. Aynı çalışmada GSH miktarının azalmasıyla birlikte fitoşelatin ve sistein gibi diğer tiyollerin miktarının artmasının da NP-SH düzeyinin yükselmesinde etkili olduğu belirtilmiştir. *Panax ginseng* bitkisi methyl jasmonate (MJ) ve salisilik asitin (SA) etkisi altında bırakıldığında NP-SH miktarının arttığı, NP-SH miktarının artışının ise bitkinin oksidatif stres koşullarına karşı dirençli hale gelmesini sağlamış olabileceği ifade edilmiştir [156]. *Cladophora glomerata* ile yapılan çalışmada NP-SH düzeyindeki artışın, algin GSH seviyelerini artırarak oksidatif strese tepki göstermesinden kaynaklandığı bildirilmiştir [147].

Çalışmamızda yüksek amonyak derişimi tiyol miktarını artırmıştır. Tiyol miktarındaki artışın, hücrelerin oksidatif stresi tolere edebilme yeteneğini artırdığı, tükenmesi durumunda hücrelerin oksidatif strese karşı savunmasız hale gelebildiği bilinmektedir [155]. Kullanılan amonyak derişimleri ve tribenuron metilin toksisitesi, tiyol düzeyini önemli oranda arttırmış ve oluşan tiyollerin proteinlere bağlanması sonucu miktarları azalmış, azalan tiyoller *de novo* sentezi ile üretilmiş olabilir [79]. Bunun bir sonucu olarak NP-SH miktarında tüm gruplarda önemli bir değişim olmamıştır. *Chara contraria*'da PB-SH miktarı ile NP-SH düzeyi arasındaki negatif korelasyon bu sonucu doğrulamaktadır. Kullanılan toksikant kaynaklı oluşan ROT'lar hücre membranında LPO'ya neden olmaktadır ve bu yıkıcı etkilere karşı membran bütünlüğünün korunabilmesi için tiyoller proteinlere bağlanabilmektedir. Bu durum NP-SH düzeyinin azalmasıyla sonuçlanmıştır.

Protein bağlı tiyol grubu antioksidanlar, hücreleri toksinlere karşı koruyan ve LPO'yu önleyen önemli ajanlardandır. Proteinlerde bulunan –SH (sülhidril) gruplarının oksidatif hasardan korunması ise GSH tarafından –SH oksidasyonu için

başka bir substrat sağlanmasıyla gerçekleşmektedir [147]. PB-SH miktarı ile TBARS arasında görülen negatif korelasyon, PB-SH gruplarının protein yapılar üzerindeki koruyucu etkisini doğrulamıştır. Aynı şekilde T-SH içeriği ile PB-SH miktarı arasında da pozitif korelasyon tespit edilmiştir. Oluşan serbest radikallerin tiyol içeriğini artırdığı ve tiyollerin büyük çoğunluğunun membran proteinlerine bağlanmasıyla PB-SH içeriğinin arttığı farklı makrofitlerde tespit edilmiştir [157].

PB-SH miktarı tribenuron metil ve 1.61 mg/L NH<sub>3</sub><sup>+</sup> 0.81 µg/L tribenuron metil grupları dışındaki uygulamalarda kontrole göre önemli oranda artmıştır. PB-SH düzeyindeki artışın, protein tiyollerinin O<sub>2</sub><sup>-</sup> temizleme yeteneği ve tiyol bölgelerine yakın HO<sup>•</sup> ile reaksiyona girme kabiliyetlerinden dolayı protein tiyollerinin serbest radikal saldırılarına karşı bu şekilde koruma sağlayabileceği belirtilmiştir [147]. Ayrıca bu çalışmada PB-SH düzeyinin artışında GSH'ın da önemli rolü bulunduğu belirtilmiştir. Tribenuron metil kaynaklı oluşan serbest radikallerin nötralize edilebilmesi için tiyol grupları herbisite bağlanabilmektedir. Borisova ve ark. [157] çeşitli makrofitlerle yaptıkları bir araştırmada, ağır metal kaynaklı oluşan serbest radikallerin, miktarı artan T-SH içeriğiyle etkisizleştirildiğini belirtmişlerdir. Oluşan bu tiyollerin büyük çoğunluğunun membran bütünlüğünün korunabilmesi için zar proteinlerine bağlandığını tespit etmişlerdir.

Düşük amonyak derişiminde PB-SH miktarında artış tespit edilmiştir. Bu derişimdeki PB-SH miktarının artışında, kullanılan amonyaktaki azotun tiyol sentezinde harcandığını ve bu tiyollerin protein yapıli bileşiklere katılmış olması nedeniyle gerçekleşmiş olduğunu söyleyebiliriz. Üç farklı makrofit üzerinde amonyumun etkileri incelenmiş ve makrofitlerin azotu asimile ederek bunu aminoasit sentezinde kullandığı belirtilmiştir [158]. Fakat amonyak derişimlerinin artması sonucu da toksik etkiyi azaltmak için amonyumdan serbest aminoasit sentezinin daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Dolayısıyla aminoasit sentezinin artmasıyla birlikte, yapısında aminoasit bulunduran tiyol miktarlarının arttığı ve bunun da PB-SH miktarlarını artırdığı söylenebilir. Araştırmamızda da yüksek amonyak derişimlerindeki PB-SH miktarının düşük amonyak derişimlerine göre artışında, yüksek derişimlerin neden olduğu olumsuz etkinin azaltılmasına yönelik olarak amonyaktaki azot kullanımının artışı etkili olmuştur [158].

DHAR ve GPx arasında görülen pozitif korelasyon tiyol miktarının artışı etkilemiş olabilir. GPx enzimi, toksikantların oluşumunu uyardığı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi, GSH'ı kullanarak suya indirgerken [49], DHAR ise GSH'ı kullanarak DHA'yı AsA'ya indirgemektedir [47]. Dolayısıyla bu enzimlerin aktivitesinin azalmasıyla GSH kullanımını azalmış ve miktarı da bundan dolayı artmış olabilir. PB-SH miktarının artışı, *C. contraria*'nın toksikantların neden olduğu ROT'larla başa çıkabildiğini göstermektedir.

Düşük amonyak derişimi ve herbisit kombinasyonu olan grupta PB-SH miktarı kontrole göre artmış fakat birbirleriyle kıyaslandığında önemli bir değişimin olmadığı görülmüştür. Bu sonucun ortaya çıkmasında, herbisit kaynaklı oluşan serbest radikallerin yıkıcı etkilerinden protein yapıların korunabilmesi için tiyollerin proteine bağlanması etkili olabilir. Fakat tribenuron metil ve yüksek amonyak derişiminin birlikte verildiği grupta PB-SH miktarı kontrole göre değişmemiş ancak bu derişimin tek başına verildiği gruba göre azalmıştır. Yüksek amonyak derişimiyle birlikte herbisit *C. contraria*'yı olumsuz etkilemiş, benzer sonuçlar farklı bitkilerde de görülmüştür [5]. Aşırı bakır derişiminin amonyak toksisitesini artırdığı, bunun da bakırın amonyum alımını artırmasıyla gerçekleştiği belirtilmiştir [153].

Bazı stres koşulları altında tiyol sentezini sağlayan enzim inhibisyonu da PB-SH'ın azalmasında etkili olabilir. Örneğin, tiyol yapısına katılan glutaminin sentezi, glutamin sentaz enzimi katalizörlüğünde gerçekleşmektedir. Bu enzimin her iki toksikantın kombinasyonu ile oluşan ROT'ların ve herbisit toksisitesi nedeniyle aktivitesinin engellendiği rapor edilmiştir [116]. Metolachlor herbisiti etkisindeki *Zea mays*'da GSH seviyesinin azaldığı ve bu azalmada GSH sentezinin ilk basamağında yer alan  $\gamma$ -glutamilsistein sentetaz enzim inhibisyonunun etkili olduğu bildirilmiştir [159].

Tiyobarbiturik Asit Reaktif Maddeleri, hücre membranlarının ROT'lar tarafından oksidasyona uğraması sonucu oluşan ve LPO'nun göstergesi olan önemli bir belirteçtir. TBARS düzeylerindeki artış, hücre zararının ROT'lar tarafından oksidasyona uğradığının kanıtıdır. Artan TBARS düzeylerinin, daha sonradan azalması ise antioksidan moleküllerin hücre membranını oksidatif hasardan korumasıyla gerçekleşmektedir. Bilindiği gibi toksikantlar bitkilerde ROT

oluşumunu uyardığıdır. Oluşan ROT'lar lipid peroksidasyonunu başlatarak, hücre zarının işlevselliğini ve bütünlüğünü bozabilmekte, ayrıca hücrel işlevlerde geri dönüşü olmayan hasarlara neden olabilmektedir. Lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olan TBARS miktarları da bu mekanizmayla artmaktadır [154].

Çalışmamızda tribenuron metil grubunda kontrole göre TBARS düzeyinde azalma tespit edilmiştir. TBARS düzeyinin azalmasında, etkisini araştırdığımız APx ve GST antioksidan enzimlerinin membran bütünlüğü üzerindeki koruyucu özelliklerinin etkili olduğunu önermekteyiz. *Nasturtium officinale* bitkisi 0.01 mg/L tribenuron metil derişimlerine maruz bırakılmış ve herbisitini, MDA miktarını önemli bir şekilde etkilemediği, derişimin artırılmasıyla birlikte de LPO'nun arttığı, bunun sonucunda enzimatik antioksidan aktivitenin artmış olabileceği ifade edilmiştir [154]. TBARS ile APx ve GST arasındaki negatif korelasyon, LPO'nun bu enzimlerin aktivitesinin etkinliğinde azaldığı şeklindeki düşüncemizi desteklemektedir. *Zea mays*'da bakırın etkileri incelenmiş, toksikant derişiminin artışıyla birlikte TBARS düzeyinin arttığı ve biyomembranın korunması yönünde enzimatik peroksidaz aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir [84].

Düşük amonyak derişimindeki TBARS miktarı da kontrole göre azalmıştır. Aynı derişim herbisitle birlikte uygulandığında ise TBARS düzeyinin bu iki grup arasında arttığı belirlenmiştir. Bir başka deyişle, antioksidan kapasite yeterli olmadığı için LPO'nun daha fazla olduğu ve TBARS düzeyinin de bundan dolayı arttığı söylenebilir. İsopturon herbisitinin *M. spicatum*'da antioksidan fenolik bileşenleri güçlü bir şekilde etkilemediği, bu tür antioksidanların yetersiz olduğu koşullarda da farklı antioksidanların etkili olabileceği ifade edilmiştir [160]. 1.61 mg/L NH<sub>3</sub>+0.81µg/L grubunda TBARS düzeyindeki azalma, 0.65 mg/L NH<sub>3</sub>+ 0.81µg/L grubundaki azalmaya göre daha fazladır. Kullanılan yüksek derişim amonyanın, *C. contraria*'da ROT oluşumunu uyardığını, makrofitin ROT'ların neden olduğu oksidatif stresin etkilerini azaltabilmek için enzimatik veya enzimatik olmayan yolla antioksidan kapasitelerini artırma yoluna gittiğini düşünmekteyiz. Aktivitesi artan antioksidanların etkinliğinde LPO önlenilmekte ve bu da TBARS düzeyinin azalmasını sağlayabilmektedir. Bu etki mekanizması, çalışmamızda kullandığımız organizmanın APx ve GST gibi enzimatik antioksidan kapasitelerinin artışına bağlı



olarak, TBARS düzeyinin azalmasıyla tespit edilmiştir. *Myriophyllum mattogrossense* makrofiti  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 'nin yüksek derişimlerine maruz bırakılmış, artan antioksidan enzimlerle serbest radikallerin detoksifiye edildiği, bunun sonucunda ise LPO'nun dolayısıyla da TBARS içeriğinin azaldığı rapor edilmiştir [145]. *Lemna minor* ile yapılmış başka bir çalışmada [148] da, bitki amonyumun farklı derişimlerine 14 gün süre ile maruz bırakılmış, amonyum etki süresinin artışına bağlı olarak ilk günlerde MDA düzeyinin arttığı fakat daha sonraki günlerde antioksidan enzimlerin aktivitesi nedeniyle MDA içeriğinin azaldığı belirtilmiştir. *Hydrilla verticillata* bitkisi, 12 saat-4 gün süre ile  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 'nin farklı derişimlerinin etkisinde bırakıldığında artan ROT miktarına rağmen MDA içeriğinin kontrole kıyasla önemli oranda azaldığı ve bu azalmanın antioksidan enzimlerin aktivitesine bağlı olarak gerçekleştiği bildirilmiştir [135].

Çalışmamızda kullandığımız toksikantlardan farklı olarak birçok çalışmada ağır metallerin de oksidatif stresi uyarabildiği belirtilmiştir. *Spirogyra pulchrifigurata*, *C. glomerata* ve *C. crispata* filamentli alglerindeki MDA içeriğinin, sudaki ağır metal artışı nedeniyle arttığı ifade edilmiştir [161]. Çalışmamızın aksine ortaya çıkan bu sonuç, araştırmacıların belirtmiş olduğu gibi farklı çevresel koşullarda stres faktörlerine verilen cevapların türden türe değişiklik gösterebileceği şeklinde açıklanmıştır. Bütün bu çalışmalardan elde edilen veriler ışığında, canlılardaki özellikle makrofitlerdeki antioksidan kapasitenin artması sonucunda TBARS miktarının belirli oranda azaldığı, kullanılan toksikantın çeşidi ve derişimine bağlı olarak ise TBARS düzeyinin arttığını söyleyebiliriz.

Tribenuron metil grubunda protein miktarı kontrole göre önemli bir değişim göstermemiştir. Daha önce belirtildiği gibi herbisitler ROT oluşumunu uyarmaktadır. Oluşan ROT'ların detoksifiye edilebilmesi için de tiyol miktarları artmaktadır. Tiyol yapısında aminoasitler bulunduğu için bu grupta protein miktarlarında önemli bir değişim olmadığı söylenebilir. Aynı zamanda maruz kalma süresi ve kullanılan derişim de bu sonucun ortaya çıkmasını etkilemiş olabilir. *Nasturtium officinale* bitkisi 0, 0.01, 0.05, 0.1 ve 0.5 mg/L tribenuron metile maruz bırakılmıştır [154]. Derişim ve maruz kalma süresinin artmasıyla birlikte protein miktarı azalmıştır. Dolayısıyla protein içeriğinde önemli bir değişim olmamasında, kullandığımız

derişim ve maruz kalma süresinin etkili olduğunu söyleyebiliriz. Tribenuron metil etkisindeki buğdayda gen ifadesinin değişmediği, ortaya çıkan bu sonucun, herbisitinin yarı ömrünün kısa olmasının ve hızlı bir şekilde detoksifiye edilmesinin etkili olabileceği bildirilmiştir [162].

Farklı makrofitlerde azotun belli derişimlerinin toksik olmadığı tam tersine protein sentezini uyardığı ifade edilmiştir [147]. Protein içeriklerinin 0.65 mg/L  $\text{NH}_3$ +0.81  $\mu\text{g/L}$  tribenuron metil ve 0.65 mg/L  $\text{NH}_3$  gruplarındaki artışının, antioksidan kapasitenin yeterli olmasından dolayı azotun kullanılabilirliğinin arttığını ve bu nedenle protein düzeylerinin yükseldiğini söyleyebiliriz. *Lemna minor* bitkisinde düşük  $\text{NH}_4^+$  derişimlerinde  $\text{NH}_4^+$  alımının fazla olduğu, derişim artışının ise alımı etkilemediği, bu nedenle de yüksek amonyak derişiminin protein içeriğini önemli bir şekilde değiştirmediği tespit edilmiştir [148]. Yüksek amonyak derişimlerinde azotun alım miktarının azalmasında bitkinin, membran polarizasyonunu düşürmesi etkilidir [151]. Çalışmamızda, düşük derişimlerde protein miktarının artması, yüksek derişimde ise kontrole göre farklılık olmaması, amonyumun alım miktarıyla ilgili olduğu bu çalışmalardaki sonuçlarla da desteklenmiştir. Ayrıca yüksek derişimin herbisitle birlikte verildiği grupta da kontrole göre önemli bir değişim tespit edilmemiştir. Tribenuron metilin amonyak toksisitesini artırması sonucu, protein sentezini sağlayan enzimlerin inhibe olmasıyla, protein düzeyi kontrole göre anlamlı olmamıştır [148,150].

**5. SONUÇ ve ÖNERİLER**

Dünya’da ve Türkiye’de hızlı ve kontrolsüz nüfus artışı, tarım ürünleri ve çeşitliliğinin artırılmasını zorunlu kılmıştır. Özellikle birim alanda en yüksek ürün alma kaygısı (verim), doğal gübrelemenin yanı sıra aşırı inorganik gübrelemeyi de beraberinde getirmiştir. Kullanılan bu gübreler, yağmurla birlikte sucul ekosistemlere karıştığı gibi aynı zamanda bu havza içerisindeki yabancı otların gelişimine de katkı sağlamaktadır. Bilindiği gibi istenmeyen bu türler, ürün verimini oldukça düşürmektedir. Bu durumda yabancı otları yok etmek amacıyla herbisitler kullanılmaya başlanmıştır. Adıyaman’da yaptığımız ön çalışmalarda tribenuron metilin yaygın bir şekilde kullanıldığı tespit edilmiştir. Hem herbisit hem de amonyağın yağmur sularıyla sucul ekosistemlere karışıp etkileşime girmeleri, bu toksikantların sucul organizmalar üzerindeki toksik etkilerini artırmaktadır. Bu iki toksikantın hedef organizmalar dışında hedef olmayan canlılar, özellikle de suyu filtreleyerek temizleyen makrofitler için ne derece etkili olduğunu tespit etmemiz oldukça önemli olmuştur. Ayrıca makrofitlerin sucul ekosistemlerin rehabilitasyonu ve ıslah çalışmalarında oldukça önemli bir yer tuttuğu, daha önceki çalışmalarımızda da görülmüştür. Dolayısıyla sucul ekosistemlerin devamlılığı için makrofitlerin ortamda var olması suyun yenilenebilir olması açısından önemli bir durum haline gelmiştir. Dünya üzerinde kullanılabilir su kaynaklarının oldukça sınırlı olması, makrofitlerin önemini daha da artırmaktadır. Kullanılabilir bu su kaynakları; evsel, endüstriyel ve tarımsal alanlardan gelen çok çeşitli kirleticilere maruz kaldığında, doğal yollardan suyun rehabilitasyonu, önemli bir biyorestatör olan bu makrofitler tarafından gerçekleştirilmektedir. Su bitkilerinin bu tarz kirleticileri filtreleme işlemi, onların direnç mekanizmalarıyla ilgilidir. Bu doğal arıtıcıların direnç mekanizmaları ise, antioksidan savunma sistemleri gibi mekanizmalarının etkinliği sonucu hayatta kalmayı başarabilmeleri ile ilgilidir.

Makrofitlerin sucul ekosistemlerde varlıklarını sürdürebilmelerini mümkün hale getiren antioksidan kapasiteleri, enzimatik ve enzimatik olmayan yollarla düzenlenmektedir. Bu tür antioksidan moleküllerin artması veya azalması, bitkilerin kirleticilere maruz kaldığının bir göstergesi olarak değerlendirilebilmektedir. Erken

uyarı parametresi olarak kullanılabilir bu moleküllerin analizi sayesinde, gerekli önlemler alınabilmekte ve suyun geri dönüşüm işlemleri çok geç olmadan sağlanabilmektedir. Bu düşünceden yola çıkarak, yukarıda da belirttiğimiz gibi daha önceden yaptığımız çalışmalarda güçlü bir biyorestoratör tür olduğunu tespit ettiğimiz *C. contraria* makrofiti, çalışmamızda model organizma olarak kullanılmıştır. Güçlü bir filtreleme özelliği olan bu su bitkisinin antioksidan kapasitesinin, herbisit ve amonyak kaynaklı kirleticilerin varlığında yeterli olup olmadığını ölçmek, bundan sonra yapılacak olan suyun geri kazanılabilirliği ile ilgili çalışmalarda, bu bitkinin önemini ön plana çıkaracaktır.

Bitkilerde bulunan enzimatik antioksidanlar, hücresel organellerde, stoplazmada veya tilakoit membranlarda bulunabilmektedir. Bu antioksidanlar, herbisit, ağır metal, fungusit veya azot kaynaklı ksenobiyotikler nedeniyle açığa çıkan ROT'ların olumsuz etkilerine karşı koymaktadır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, *C. contraria*'da APx ve GPx enzim aktiviteleri ile TBARS ve tiyol düzeyleri amonyak, tribenuron metil herbisiti ve bunların karışımları için biyomarkır olarak kullanılabilirler. Bu çalışma, sucul ekosistemlerde var olan toksik maddelere karşı makrofitlerde aktivitesi artan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların etki mekanizmasını ve bunların birer biyomarkır olup olamayacağı konusunda yeni ve önemli bilgiler sunmaktadır. Bu erken uyarı parametreleri, bundan sonra yapılacak ekolojik restorasyon yöntemlerine ilişkin fikirler sunacaktır. Özellikle de yüksek amonyak miktarlarının detoksifikasyonunda *C. contraria*'nın önemi ortaya çıkacaktır. Amonyakın hangi derişimlerinde makrofitin yaşayabileceği konusunda daha kapsamlı araştırmaların yapılması, bu makrofitin restorasyon çalışmalarında kullanılabilirliği konusunda da bilim dünyasına önemli katkılar sağlayacaktır. *Chara contraria*'nın restorasyon çalışmalarında kullanılabilmesi için, makrofitin yaşayabileceği amonyak derişimlerinin tespitinden sonra, atık suların ön arıtmadan geçirilmesi ve amonyak içeriklerinin makrofitin yaşayabileceği seviyelere indirgenmesi gerekmektedir. Ayrıca çalışmamız, tarımsal alanlarda kullanılan farklı herbisitlerin etki mekanizmalarının tespit edilmesi konusunda yapılacak araştırmalara da önemli veri parametreleri sağlayacaktır.

Sonuç olarak bu çalışma, herbisitlerin ve amonyağın, hedef olmayan ama sistemde ve arıtımda önemli bir yere sahip olan su bitkileri ve bu habitatlarda yaşayan diğer organizmalar üzerindeki etkilerinin ne derece olduğunu tespit edebilmek için yararlı olabilecektir. Elde edilen veriler, rehabilite çalışmalarında, amonyak derişimlerinin sistemdeki düzeylerinin belirlenmesine önemli katkılar sağlayacaktır. Çünkü amonyak derişimlerinin olması gerekenden fazla miktarda bulunması, sudaki alg sayılarının aşırı şekilde çoğalmasına (ötrifikasyon) neden olmaktadır. Bu durum sucul sistemlerin bulanık hale gelmesine ve bunun neticesinde de ışık geçirgenliğinin azalmasına zemin hazırlayacaktır. Işık geçirgenliğinin azalması da sistemde önemli derecede anoksik koşulların ortaya çıkmasına neden olacaktır. Sistemdeki zincirin bozulması bu havzalarda yaşayan bütün organizmaları etkileyecektir. Bu nedenle sucul habitatlardaki amonyak derişimlerinin optimum değerde tutulması son derece önemlidir.

Suyun antropojenik ve doğal kirlilik kaynakları tarafından ne şekilde kirlendiği bilincine varmamız, bu konuda alacağımız önlemler konusunda bizlere yol gösterecektir. Sahip olacağımız bu kültür, Dünya'mızın ilk oluşundan atalarımıza, atalarımızdan bizlere ve bizlerden gelecek nesillere bırakılacak olan bu eşsiz mirası korumamızı sağlayacaktır.

**KAYNAKLAR**

- [1] A. Azizullah, M. Jamil, P. Richter ve D.-P. Häder, “Fast bioassessment of wastewater and surface water quality using freshwater flagellate *Euglena gracilis*—a case study from Pakistan”, *Journal Applied Phycology*, vol. 26, no. 1, pp. 421-431, 2014.
- [2] D. Majumdar ve N Gupta, “Nitrate pollution of groundwater and associated human health disorders”, *Indian Journal of Environmental Health*, vol.42, no.1, pp.28-39, 2000
- [3] G. D. Agrawal, “Diffuse agricultural water pollution in India”, *Water Science and Technology*, vol. 39, no. 3, pp. 33-47, 1999.
- [4] B. Tanriverdi, M. F. Gikli, D. Koc ve E. R. Sivaci, “Evulation effects of *Cryptocoryne walkerii* (Schott) as a biorestorer on elimination of turbidity”, *Journal of Environmental Protection and Ecology*, vol. 17, no. 1, pp. 191–198, 2016.
- [5] D. S. Kim, E. J. P. Marshall, J. C. Caseley ve P. Brain, “Modelling interactions between herbicide and nitrogen fertiliser in terms of weed response”, *Weed Research*, vol. 46, no. 6, pp. 480-491, 2006.
- [6] S. Graham ve C. Parkinson, “The water cycle”, *NASA Earth Observatory*, 2010.
- [7] D. Dudgeon vd., “Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges”, *Biological Reviews*, vol. 81, no. 02, pp. 163-182, 2006.
- [8] P. K. Goel, *Water Pollution: Causes, Effects and Control*. New Age International, 2006.
- [9] A. Agrawal, R. S. Pandey ve B. Sharma, “Water Pollution with Special Reference to Pesticide Contamination in India”, *Journal of Water Resource and Protection*, vol. 02, no. 05, pp. 432-448, 2010.
- [10] S.A. Khan, M. Suleman ve M Asad, “Assessment of Pollution Load in Marble Waste Water in Khairabad, District Nowshera, Khyber Pukhtunkhwa,

- Pakistan” *International Journal of Economic and Environmental Geology*, vol. 8, no. 2, pp. 35-39, 2017.
- [11] K. P. Singh, A. Malik ve S. Sinha, “Water quality assessment and apportionment of pollution sources of Gomti River (India) using multivariate statistical techniques—a case study”, *Analytica Chimica Acta*, vol. 538, no. 1, pp. 355-374, 2005.
- [12] M. Peters, Q. Guo, H. Strauss, R. Wei, S. Li ve F. Yue, “Contamination patterns in river water from rural Beijing: A hydrochemical and multiple stable isotope study”, *Science of The Total Environment*, vol. 654, pp. 226-236, 2019.
- [13] J. D. Allan, “Landscapes and Riverscapes: The Influence of Land Use on Stream Ecosystems”, *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, vol. 35, no. 1, pp. 257-284, 2004.
- [14] J. A. Bethke ve R. A. Cloyd, “Pesticide use in ornamental production: what are the benefits?”, *Pest Management Science*, vol. 65, no. 4, pp. 345-350, 2009.
- [15] A. Srivastava, N. K. Jangid, M. Srivastava ve V. Rawat, “Pesticides as Water Pollutants”, *Environment & Agriculture Book Chapter I, IGI Global*. no.436, pp. 1-19, 2019.
- [16] A. C. Alexander, A. T. Luis, J. M. Culp, D. J. Baird ve A. J. Cessna, “Can nutrients mask community responses to insecticide mixtures?”, *Ecotoxicology*, vol. 22, no. 7, pp. 1085-1100, 2013.
- [17] K. E. Murray, S. M. Thomas ve A. A. Bodour, “Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment”, *Environmental Pollution*, vol. 158, no. 12, pp. 3462-3471, 2010.
- [18] N. Li, P. F. Du, X. C. Huang ve Z. P. Shu, “Access the Change of Water Quality in the Sponge City of LCTIP”, *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, vol. 291, pp. 1-6, 2019.
- [19] T. X. Nguyen vd., “The interactive effect of the season and estuary position on the concentration of persistent organic pollutants in water and sediment

- from the Cua Dai estuary in Vietnam”, *Environmental Science And Pollution Research* vol. 26, no. 11, pp. 10756-10766, 2019.
- [20] L. Soriano ve J. Rubió, “Impacts of Combined Sewer Overflows on surface water bodies. The case study of the Ebro River in Zaragoza city”, *Journal of Cleaner Production*, vol. 226, pp. 1-5, 2019.
- [21] J. A. Camargo ve Á. Alonso, “Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment”, *Environment International*, vol. 32, no. 6, pp. 831-849, 2006.
- [22] P. Poole, V. Ramachandran ve J. Terpolilli, “Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts”, *Nature Reviews Microbiology*, vol. 16, no. 5, pp. 291-303, 2018.
- [23] R. C. Aller ve J. K. Cochran, “The Critical Role of Bioturbation for Particle Dynamics, Priming Potential, and Organic C Remineralization in Marine Sediments: Local and Basin Scales”, *Frontiers in Earth Science.*, vol. 7, no. 157, pp. 1-14, 2019.
- [24] V. H. Smith, “Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems a global problem”, *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 10, no. 2, pp. 126-139, 2003.
- [25] A. Sivaci, E. R. Sivaci ve M. Sökmen, “Changes in antioxidant activity, total phenolic and abscisic acid constituents in the aquatic plants *Myriophyllum spicatum* L. and *Myriophyllum triphyllum* Orchard exposed to cadmium”, *Ecotoxicology*, vol. 16, no. 5, pp. 423-428, 2007.
- [26] J. Grochowska, R. Augustyniak, M. Łopata, K. Parszuto, R. Tandyrak ve A. Płachta, “From Saprotrophic to Clear Water Status: the Restoration Path of a Degraded Urban Lake”, *Water, Air, and Soil Pollution*, vol. 230, no. 4, pp. 1-14, 2019.
- [27] R. E. Namara, M. A. Hanjra, G. E. Castillo, H. M. Ravnborg, L. Smith ve B. Van Koppen, “Agricultural water management and poverty linkages”, *Agricultural Water Management*, vol. 97, no. 4, pp. 520-527, 2010.
- [28] H. El-Ramady vd., “Plant Nano-nutrition: Perspectives and Challenges”, *Nanotechnology, Food Security and Water Treatment*, 2018, pp. 129-161.



- [29] R. van der Oost, J. Beyer ve N. P. E. Vermeulen, “Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review”, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 13, no. 2, pp. 57-149, 2003.
- [30] S. Polati, M. Bottaro, P. Frascarolo, F. Gosetti, V. Gianotti ve M. C. Gennaro, “HPLC-UV and HPLC-MSn multiresidue determination of amidosulfuron, azimsulfuron, nicosulfuron, rimsulfuron, thifensulfuron methyl, tribenuron methyl and azoxystrobin in surface waters”, *Analytica Chimica Acta*, vol. 579, no. 2, pp. 146-151, 2006.
- [31] C. Yu, S. Hu, P. He, G. Sun, C. Zhang ve Y. Yu, “Inducing male sterility in *Brassica napus* L. by a sulphonylurea herbicide, tribenuron-methyl”, *Plant Breeding*, vol. 125, no. 1, pp. 61-64, 2006.
- [32] S. Jovic, G. Malidza, S. Cvejic, N. Hladni, V. Miklic ve D. Skoric, “Development of sunflower hybrids tolerant to tribenuron methyl”, *Genetika*, vol. 43, no. 1, pp. 175-182, 2011.
- [33] K. R ve D. K, “The role of the growth stage of weeds in their response to reduced herbicide doses”, *Acta Agrobotanica*, vol. 64, no. 4, pp. 259-266, 2011.
- [34] J. L. Bernal, J. J. Jime ve J. Atienza, “ Determination of chlorsulfuron and tribenuron-methyl residues in agricultural soils. ”, *Journal of Chromatography A*, vol.778, no.(1-2), pp. 119-125, 1997.
- [35] A. K. Bhattacharjee ve P. Dureja, “Light-induced transformations of tribenuron-methyl in aqueous solution”, *Pesticide Science*, vol. 55, no. 2, pp. 183-188, 1999.
- [36] M. Bottaro vd., “Hydrolytic and photoinduced degradation of tribenuron methyl studied by HPLC-DAD-MS/MS”, *American Society For Mass Spectrometry*, vol. 19, no. 8, pp. 1221-1229, 2008.
- [37] P. Ahmad, C. A. Jaleel, M. M. Azooz ve G. Nabi, “Generation of ROS and Non-Enzymatic Antioxidants During Abiotic Stress in Plants”, *Botany Research International.*, vol. 2, no. 1, pp. 11-20, 2009.

- [38] S. S. Gill ve N. Tuteja, “Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants”, *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 48, no. 12, pp. 909-930, 2010.
- [39] A. Sivaci, E. Elmas, F. Gümüş ve E. R. Sivaci, “Removal of Cadmium by *Myriophyllum heterophyllum* Michx. and *Potamogeton crispus* L. and Its Effect on Pigments and Total Phenolic Compounds”, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 54, no. 4, pp. 612-618, 2008.
- [40] J. G. Scandalios, “Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses”, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 38, no. 7, pp. 995-1014, 2005.
- [41] K. Asada, “Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants”, *Physiologia Plantarum*, vol. 85, no. 2, pp. 235-241, 1992.
- [42] S. Davletova vd., “Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*”, *Plant Cell*, vol. 17, no. 1, pp. 268-281, 2005.
- [43] S. Singh, S. Mishra, R. Kumari ve S. Agrawal, “Response of ultraviolet-B and nickel on pigments, metabolites and antioxidants of *Pisum sativum* L”, *Journal of Environmental Biology / Academy of Environmental Biology, India*, vol. 30, pp. 677-684, 2009.
- [44] S. Shigeoka vd., “Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes”, *Journal of Experimental Botany*, vol. 53, no. 372, pp. 1305-1319, 2002.
- [45] J. Durner ve D. F. Klessig, “Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses”, *Proceedings of the National Academy of Sciences* vol. 92, no. 24, pp. 11312-11316, 1995.
- [46] D. Clark, J. Durner, D. A. Navarre ve D. F. Klessig, “Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase”, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 13, no. 12, pp. 1380-1384, 2000.

- [47] M. Hasanuzzaman vd., “Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress”, *Antioxidants*, vol. 8, no. 9, no. 384, pp. 1-50, 2019.
- [48] B. Krishna Das vd., “Non-native ligands define the active site of *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br dehydroascorbate reductase”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 473, no. 4, pp. 1152-1157, 2016.
- [49] K. Apel ve H. Hirt, “Reactive Oxygen Species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction”, *Annual Review of Plant Biology.*, vol. 55, no. 1, pp. 373-399, 2004.
- [50] M. A. Akbudak, E. Filiz, R. Vatansever ve K. Kontbay, “Genome-wide identification and expression profiling of ascorbate peroxidase (APx) and glutathione peroxidase (GPx) genes under drought stress in Sorghum (*Sorghum bicolor* L.)”, *Journal of Plant Growth Regulation*, vol. 37, no. 3, pp. 925-936, 2018.
- [51] S. Goswami ve S. Das, “*Eichhornia crassipes* mediated copper phytoremediation and its success using catfish bioassay”, *Chemosphere*, vol. 210, pp. 440-448, 2018.
- [52] I. I. Ozyigit vd., “Identification and comparative analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-scavenging enzymes (Ascorbate Peroxidase and Glutathione Peroxidase) in Selected plants employing bioinformatics approaches”, *Frontiers in Plant Science*, vol. 7, no. 301, pp. 1-23, 2016.
- [53] A. Chafik, A. Essamadi, S. Y. Çelik, K. Solak ve A. Mavi, “Characterization of an interesting selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) protecting cells against environmental stress: The *Camelus dromedarius* erythrocytes Se-GPx”, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 18, pp. 1-9, 2019.
- [54] H. Luo, Q. Wang, Z. He, Y. Wu, A. Long ve Y. Yang, “Protection of dietary selenium-enriched seaweed *Gracilaria lemaneiformis* against cadmium toxicity to abalone *Haliotis discus hannai*”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 171, pp. 398-405, 2019.

- [55] M. V. Monferrán, J. A. Sánchez Agudo, M. L. Pignata ve D. A. Wunderlin, “Copper-induced response of physiological parameters and antioxidant enzymes in the aquatic macrophyte *Potamogeton pusillus*”, *Environmental Pollution*, vol. 157, no. 8-9, pp. 2570-2576, 2009.
- [56] N. Garg ve G. Manchanda, “ROS generation in plants: Boon or bane?”, *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, vol. 143, no. 1, pp. 81-96, 2009.
- [57] R. K. Upadhyay ve S. K. Panda, “Salt tolerance of two aquatic macrophytes, *Pistia stratiotes* and *Salvinia molesta*”, *Biologia Plantarum*, vol. 49, no. 1, pp. 157-159, 2005.
- [58] A. A. Ghafarizadeh, G. Vaezi, M. A. Shariatzadeh ve A. A. Malekirad, “Effect of in vitro selenium supplementation on sperm quality in asthenoteratozoospermic men”, *Andrologia*, vol. 50, no. 2, pp. 1-7, 2018.
- [59] Y. Eshdat, D. Holland, Z. Faltin ve G. Ben-Hayyim, “Plant glutathione peroxidases”, *Physiologia Plantarum*, vol. 100, no. 2, pp. 234-240, 1997.
- [60] Y. Gueta-Dahan, Z. Yaniv, B. A. Zilinskas ve G. Ben-Hayyim, “Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in Citrus”, *Planta*, vol. 203, no. 4, pp. 460-469, 1997.
- [61] H. Willekens vd., “Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C3 plants”, *The EMBO Journal*, vol. 16, no. 16, pp. 4806-4816, 1997.
- [62] V. P. Roxas, R. K. Smith, E. R. Allen ve R. D. Allen, “Overexpression of glutathione S-transferase/glutathioneperoxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress”, *Nature Biotechnology*, vol. 15, no. 10, pp. 988-991, 1997.
- [63] J. Nimptsch ve S. Pflugmacher, “Substrate specificities of cytosolic glutathione-S transferases in five different species of the aquatic macrophyte *Myriophyllum*”, *Journal of Applied Botany and Food Quality*, vol. 79, no. 2, pp. 94-99, 2005
- [64] D. P. Dixon, A. Laphorn ve R. Edwards, “Plant glutathione transferases”, *Genome Biology*, vol. 3, no. 3, pp. 1-9, 2002.

- [65] R. Edwards, D. P. Dixon ve V. Walbot, "Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health", *Trends in Plant Science*, vol. 5, no. 5, pp. 193-198, 2000.
- [66] C. Frova, "The plant glutathione transferase gene family: genomic structure, functions, expression and evolution", *Physiologia Plantarum*, vol. 119, no. 4, pp. 469-479, 2003.
- [67] J. Rossjohn vd., "A mixed disulfide bond in bacterial glutathione transferase: functional and evolutionary implications", *Structure*, vol. 6, no. 6, pp. 721-734, 1998.
- [68] K. Schweikert ve D. J. Burritt, "The organophosphate insecticide Coumaphos induces oxidative stress and increases antioxidant and detoxification defences in the green macroalgae *Ulva pertusa*", *Aquatic Toxicology*, vol. 122-123, pp. 86-92, 2012.
- [69] S. V. Ivanov ve P. I. Kerchev, "Separation and quantification of the cellular thiol pool of pea plants treated with heat, salt and atrazine", *Phytochemical Analysis*, vol. 18, no. 4, pp. 283-290, 2007.
- [70] P. Faure ve J.-L. Lafond, "Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation", *Analysis of Free Radicals in Biological Systems*, pp. 237-248, 1995.
- [71] N. Haugaard, "Reflections on the role of the thiol group in biology", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 899, no. 1, pp. 148-158, 2000.
- [72] L. Zagorchev, C. Seal, I. Kranner ve M. Odjakova, "A central role for thiols in plant tolerance to abiotic stress", *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 14, no. 4, pp. 7405-7432, 2013.
- [73] T. Leustek ve K. Saito, "Sulfate transport and assimilation in plants", *Plant Physiology*, vol. 120, no. 3, pp. 637-644, 1999.
- [74] C. Vieira Dos Santos, S. Cuiné, N. Rouhier ve P. Rey, "The *Arabidopsis* plastidic methionine sulfoxide reductase B proteins. sequence and activity characteristics, comparison of the expression with plastidic methionine sulfoxide reductase A, and induction by photooxidative stress", *Plant Physiology*, vol. 138, no. 2, pp. 909-922, 2005.

- [75] R. Alcázar vd., “Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance”, *Planta*, vol. 231, no. 6, pp. 1237-1249, 2010.
- [76] D. Wesenberg, G.-J. Krauss ve D. Schaumlöffel, “Metallo-thiolomics: Investigation of thiol peptide regulated metal homeostasis in plants and fungi by liquid chromatography-mass spectrometry”, *International Journal of Mass Spectrometry*, vol. 307, no. 1-3, pp. 46-54, 2011.
- [77] M. E. V. Schmöger, M. Oven ve E. Grill, “Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants”, *Plant Physiology*, vol. 122, no. 3, pp. 793-802, 2000.
- [78] M. Qian, X. Li ve Z. Shen, “Adaptive copper tolerance in *Elsholtzia haichowensis* involves production of cu-induced thiol peptides”, *Plant Growth Regulation*, vol. 47, no. 1, pp. 65-73, 2005.
- [79] A. J. Meyer ve M. D. Fricker, “Control of demand-driven biosynthesis of glutathione in green *Arabidopsis* suspension culture cells”, *Plant Physiology*, vol. 130, no. 4, pp. 1927-1937, 2002.
- [80] M. A. Iannelli, F. Pietrini, L. Fiore, L. Petrilli, ve A. Massacci, “Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants”, *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 40, no. 11, pp. 977-982, 2002.
- [81] Y. Meyer, C. Belin, V. Delorme-Hinoux, J.-P. Reichheld ve C. Riondet, “Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants: Molecular mechanisms, crosstalks, and functional significance”, *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 17, no. 8, pp. 1124-1160, 2012.
- [82] E. Yeung, J. Bailey-Serres ve R. Sasidharan, “After The Deluge: Plant revival post-flooding”, *Trends in Plant Science*, vol. 24, no. 5, pp. 443-454, 2019.
- [83] J. M. Gutteridge, “Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage”, *Clinical Chemistry*, vol. 41, no. 12, pp. 1819-1828, 1995.
- [84] J. J. Liu, Z. Wei ve J. H. Li, “Effects of copper on leaf membrane structure and root activity of maize seedling”, *Botanical Studies*, vol. 55, no. 1, pp. 1-6, 2014.

- [85] F. V. A. Guimarães vd., “Calcium can moderate changes on membrane structure and lipid composition in cowpea plants under salt stress”, *Plant Growth Regulation*, vol. 65, no. 1, pp. 55-63, 2011.
- [86] F. Yurekli ve Z. B. Porgali, “The effects of excessive exposure to copper in bean plants”, *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, vol. 48, no. 2, pp. 7-13, 2006.
- [87] J. de D. Alché, “A concise appraisal of lipid oxidation and lipoxidation in higher plants”, *Redox Biology*, vol. 23, pp. 1-11, 2019.
- [88] A. W. Girotti, “Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems”, *Journal of Lipid Research*, vol. 39, no. 8, pp. 1529-1542, 1998.
- [89] A. Catalá, “An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay”, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 38, no. 9, pp. 1482-1495, 2006.
- [90] O. Özcan, H. Erdal, G. Çakırca ve Z. Yönden, “Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA”, *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, vol. 6, no. 3, pp. 331-336, 2015.
- [91] R. M. McCourt, K. G. Karol, M. Guerlesquin ve M. Feist, “Phylogeny of extant genera in the family Characeae (Charales, Charophyceae) based on rbcL, sequences and morphology”, *American Journal of Botany*, vol. 83, no. 1, pp. 125-131, 1996.
- [92] M. Pełechaty, A. Pukacz, K. Apolinarska, A. Pełechata ve M. Siepak, “The significance of *Chara* vegetation in the precipitation of lacustrine calcium carbonate”, *Sedimentology*, vol. 60, no. 4, pp. 1017-1035, 2013.
- [93] S. C. Schneider, D. E. Pichler, T. Andersen ve A. Melzer, “Light acclimation in submerged macrophytes: The roles of plant elongation, pigmentation and branch orientation differ among *Chara* species”, *Aquatic Botany*, vol. 120, pp. 121-128, 2015.

- [94] L. Caisova ve M. Gabka, “Charophytes (Characeae, Charophyta) in the Czech Republic: taxonomy, autecology and distribution.”, *Fottea*, vol. 9, no. 1, pp. 1-43, 2009.
- [95] M. T. Casanova, “Oospore variation in three species of Chara (Charales, Chlorophyta)”, *Phycologia*, vol. 36, no. 4, pp. 274-280, 1997.
- [96] G. Mulderij, E. Van Donk ve J. G. M. Roelofs, “Differential sensitivity of green algae to allelopathic substances from *Chara*”, *Hydrobiologia*, vol. 491, no. 1, pp. 261-271, 2003.
- [97] A. Çelekli ve F. Geyik, “Artificial neural networks (ANN) approach for modeling of removal of Lanaset Red G on *Chara contraria*”, *Bioresource Technology*, vol. 102, no. 10, pp. 5634-5638, 2011.
- [98] N. J. Diba, S. Naz ve S. Md. G. Gousul Azam, “*Chara contraria* Braun ex Kütz. (Characeae): A new record for Bangladesh”, *Algological Studies*, vol. 141, pp. 3-9, 2013.
- [99] “*Chara contraria* A.Braun ex Kützing: Algaebase”. [https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species\\_id=27150&sk=0&from=results](https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=27150&sk=0&from=results) [Erişim Mar. 03, 2020].
- [100] A. Çelekli, B. Tanrıverdi ve H. Bozkurt, “Predictive modeling of removal of Lanaset Red G on *Chara contraria*; kinetic, equilibrium, and thermodynamic studies”, *Chemical Engineering Journal*, vol. 169, no. 1-3, pp. 166-172, 2011.
- [101] L. Geoffroy, H. Teisseire, M. Couderchet ve G. Vernet, “Effect of oxyfluorfen and diuron alone and in mixture on antioxidative enzymes of *Scenedesmus obliquus*”, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 72, no. 3, pp. 178-185, 2002.
- [102] A. Coors, J. Kuckelkorn, M. Hammers-Wirtz ve T. Strauss, “Application of in-situ bioassays with macrophytes in aquatic mesocosm studies”, *Ecotoxicology*, vol. 15, no. 7, pp. 583-591, 2006.
- [103] L. Geoffroy, C. Frankart ve P. Eullaffroy, “Comparison of different physiological parameter responses in *Lemna minor* and *Scenedesmus obliquus* exposed to herbicide flumioxazin”, *Environmental Pollution*, vol. 131, no. 2, pp. 233-241, 2004.



- [104] D. S. Garanzini ve M. L. Menone, “Azoxystrobin causes oxidative stress and DNA damage in the aquatic macrophyte *Myriophyllum quitense*”, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 94, no. 2, pp. 146-151, 2015.
- [105] S. L. Rezende-Silva vd., “*Pouteria torta* is a remarkable native plant for biomonitoring the glyphosate effects on Cerrado vegetation”, *Ecological Indicators*, vol. 102, pp. 497-506, 2019.
- [106] N. Liu vd., “Separate and combined effects of glyphosate and copper on growth and antioxidative enzymes in *Salvinia natans* (L.) All”, *Science of The Total Environment*, vol. 655, pp. 1448-1456, 2019.
- [107] A. Sood, S. Pabbi ve P. L. Uniyal, “Effects of paraquat on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in aquatic fern *Azolla microphylla*”, *Russian Journal of Plant Physiology*, vol. 58, no. 4, pp. 667-673, 2011.
- [108] K. Mitsou, A. Koulianou, D. Lambropoulou, P. Pappas, T. Albanis ve M. Lekka, “Growth rate effects, responses of antioxidant enzymes and metabolic fate of the herbicide Propanil in the aquatic plant *Lemna minor*”, *Chemosphere*, vol. 62, no. 2, pp. 275-284, 2006.
- [109] P. C. Wilson ve R. Koch, “Influence of exposure concentration and duration on effects and recovery of *Lemna minor* exposed to the herbicide norflurazon”, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 64, no. 2, pp. 228-234, 2013.
- [110] R. L. Dalton, C. Nussbaumer, F. R. Pick, ve C. Boutin, “Comparing the sensitivity of geographically distinct *Lemna minor* populations to atrazine”, *Ecotoxicology*, vol. 22, no. 4, pp. 718-730, 2013.
- [111] D. S. Garanzini, S. Medici, L. D. Moreyra ve M. L. Menone, “Acute exposure to a commercial formulation of Azoxystrobin alters antioxidant enzymes and elicit damage in the aquatic macrophyte *Myriophyllum quitense*”, *Physiology and Molecular Biology of Plants*, vol. 25, no. 1, pp. 135-143, 2019.
- [112] J. J. Cunningham, W. M. Kemp, M. R. Lewis ve J. C. Stevenson, “Temporal responses of the macrophyte, *Potamogeton perfoliatus* L., and its associated

- autotrophic community to atrazine exposure in estuarine microcosms”, *Estuaries*, vol. 7, no. 4, pp. 519-530, 1984.
- [113] C. Wang, S. H. Zhang, W. Li, P. Fang Wang ve L. Li, “Nitric oxide supplementation alleviates ammonium toxicity in the submerged macrophyte *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 74, no. 1, pp. 67-73, 2011.
- [114] J. R. Caicedo, N. P. van der Steen, O. Arce ve H. J. Gijzen, “Effect of total ammonia nitrogen concentration and pH on growth rates of duckweed (*Spirodela polyrrhiza*)”, *Water Research*, vol. 34, no. 15, pp. 3829-3835, 2000.
- [115] H. M. Vines ve R. T. Wedding, “Some effects of ammonia on plant metabolism and a possible mechanism for ammonia toxicity 1234”, *Plant Physiology*, vol. 35, no. 6, pp. 820-825, 1960.
- [116] P. Zhao, Y. Wang, Z. Lin, J. Zhou, H. Chai, Q. He, Y. Li ve J. Wang, “The alleviative effect of exogenous phytohormones on the growth, physiology and gene expression of *Tetraselmis cordiformis* under high ammonia-nitrogen stress”, *Bioresource Technology*, vol. 282, pp. 339-347, 2019.
- [117] K. Zhuang, D. Shi, Z. Hu, F. Xu, Y. Chen ve Z. Shen, “Subcellular accumulation and source of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in submerged plant *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle under NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N stress condition”, *Aquatic Toxicology*, vol. 207, pp. 1-12, 2019.
- [118] T. Cao, L. Ni, P. Xie, J. Xu ve M. Zhang, “Effects of moderate ammonium enrichment on three submersed macrophytes under contrasting light availability: Effects of ammonium on macrophytes”, *Freshwater Biology*, vol. 56, no. 8, pp. 1620-1629, 2011.
- [119] L. Bertrand, M. V. Monferrán, M. E. Valdés ve M. V. Amé, “Usefulness of a freshwater macrophyte (*Potamogeton pusillus*) for an environmental risk assessment in a multi-source contaminated basin.”, *Chemosphere*, vol. 222, pp. 1003-1016, 2019.
- [120] C. Li, M. Wang, X. Luo, L. Liang, X. Han ve X. Lin, “Accumulation and effects of uranium on aquatic macrophyte *Nymphaea tetragona* Georgi:

- Potential application to phytoremediation and environmental monitoring”, *Journal of Environmental Radioactivity*, vol. 198, pp. 43-49, 2019.
- [121] B. Zhang, X. Li, D. Chen ve J. Wang, “Effects of 1-octyl-3-methylimidazolium bromide on the antioxidant system of *Lemna minor*”, *Protoplasma*, vol. 250, no. 1, pp. 103-110, 2013.
- [122] S. Sinha, R. Saxena ve S. Singh, “Chromium induced lipid peroxidation in the plants of *Pistia stratiotes* L.: role of antioxidants and antioxidant enzymes”, *Chemosphere*, vol. 58, no. 5, pp. 595-604, 2005.
- [123] M. L. Menone ve S. Pflugmacher, “Effects of 3-chlorobiphenyl on photosynthetic oxygen production, glutathione content and detoxication enzymes in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum*”, *Chemosphere*, vol. 60, no. 1, pp. 79-84, 2005.
- [124] “Media Recipes and Preparation”. <http://www.marine.csiro.au/microalgae/methods/Media%20CMARC%20recipes.htm#MBL>. [Erişim: 04-Mar-2020].
- [125] R. V. Thurston, *Aqueous Ammonia Equilibrium: Tabulation of Percent Un-ionized Ammonia*. Environmental Research Laboratory-Duluth, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, 1979.
- [126] Y. Nakano ve K. Asada, “Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts”, *Plant and Cell Physiology*, vol. 22, no. 5, pp. 867-880, 1981.
- [127] M. C. D. Tullio, L. D. Gara, C. Paciolla ve O. Arrigoni, “Dehydroascorbate-reducing proteins in maize are induced by the ascorbate biosynthesis inhibitor lycorine”, *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 6, no. 36, pp. 433-440, 1998.
- [128] N. Nagalakshmi ve M. N. V. Prasad, “Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*”, *Plant Science*, vol. 160, no. 2, pp. 291-299, 2001.
- [129] W. H. Habig, M. J. Pabst ve W. B. Jakoby, “Glutathione S-Transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation”, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 249, no. 22, pp. 7130-7139, 1974.

- [130] J. Sedlak ve R. H. Lindsay, "Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent", *Analytical Biochemistry*, vol. 25, pp. 192-205, 1968.
- [131] S. K. Jain, "Evidence for membrane lipid peroxidation during the in vivo aging of human erythrocytes", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 937, pp. 205-210, 1988.
- [132] T. Q. Do, J. R. Schultz ve C. F. Clarke, "Enhanced sensitivity of ubiquinone-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae* to products of autoxidized polyunsaturated fatty acids", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 93, no. 15, pp. 7534-7539, 1996.
- [133] E. F. Hatree, "Determination of protein : a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response", *Analytical Biochemistry.*, vol. 48, pp. 422-427, 1972.
- [134] B. Ingemarsson, P. Oscarson, M. af Ugglas ve C.-M. Larsson, "Nitrogen utilization in *Lemna*: III. Short-term effects of ammonium on nitrate uptake and nitrate reduction", *Plant Physiology*, vol. 85, no. 3, pp. 865-867, 1987.
- [135] C. Wang, S. H. Zhang, P. F. Wang, W. Li ve J. Lu, "Effects of ammonium on the antioxidative response in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle plants", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 73, no. 2, pp. 189-195, 2010.
- [136] C. Wang, S. Zhang, P. Wang, J. Hou, W. Li ve W. Zhang, "Metabolic adaptations to ammonia-induced oxidative stress in leaves of the submerged macrophyte *Vallisneria natans* (Lour.) Hara", *Aquatic Toxicology*, vol. 87, no. 2, pp. 88-98, 2008.
- [137] M. Varga vd., "Physiological and biochemical effect of silver on the aquatic plant *Lemna gibba* L.: Evaluation of commercially available product containing colloidal silver", *Aquatic Toxicology*, vol. 207, pp. 52-62, 2019.
- [138] O. C. Knörzer, J. Burner ve P. Boger, "Alterations in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress", *Physiologia Plantarum*, vol. 97, no. 2, pp. 388-396, 1996.

- [139] A. K. Trivedi, I. Ahmad ve M. Ashquin, “Effects of chrysotile asbestos exposure on certain biochemical parameters of *Lemna gibba*.”, *Indian Journal of Plant Physiology*, vol. 15, no. 1, pp. 80-83, 2010.
- [140] P. Aravind ve M. N. V. Prasad, “Cadmium-Zinc interactions in a hydroponic system using *Ceratophyllum demersum* L.: adaptive ecophysiology, biochemistry and molecular toxicology”, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, vol. 17, no. 1, pp. 3-20, 2005.
- [141] A. Çelekli, E. Kapı, Ç. Soysal, H. Arslanargun ve H. Bozkurt, “Evaluating biochemical response of filamentous algae integrated with different water bodies”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 142, pp. 171-180, 2017.
- [142] D. Štajner, M. Popović ve M. Štajner, “Herbicide induced oxidative stress in lettuce, beans, pea seeds and leaves”, *Biologia Plantarum*, vol. 47, no. 4, pp. 575-579, 2003.
- [143] M. M. Nemat Alla, A.-H. M. Badawi, N. M. Hassan, Z. M. El-Bastawisy ve E. G. Badran, “Herbicide tolerance in maize is related to increased levels of glutathione and glutathione-associated enzymes”, *Acta Physiologiae Plantarum*, vol. 30, no. 3, pp. 371-379, 2008.
- [144] M. M. Nemat Alla ve N. M. Hassan, “Changes of antioxidants and GSH-associated enzymes in isoproturon-treated maize”, *Acta Physiologiae Plantarum*, vol. 29, no. 3, pp. 247-258, 2007.
- [145] J. Nimptsch ve S. Pflugmacher, “Ammonia triggers the promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Myriophyllum mattogrossense*”, *Chemosphere*, vol. 66, no. 4, pp. 708-714, 2007.
- [146] S. Mishra, S. Srivastava, R. D. Tripathi ve P. K. Trivedi, “Thiol metabolism and antioxidant systems complement each other during arsenate detoxification in *Ceratophyllum demersum* L.”, *Aquatic Toxicology*, vol. 86, no. 2, pp. 205-215, 2008.
- [147] C. Johnstone, “Using Algae as Environmental Impact Indicators in Urban Freshwater Ponds”, Doktora Tezi, University of Abertay Dundee, 2003.

- [148] L. Huang vd., “Ammonium-induced oxidative stress on plant growth and antioxidative response of duckweed (*Lemna minor* L.)”, *Ecological Engineering*, vol. 58, pp. 355-362, 2013.
- [149] D. M. Stamper ve O. H. Tuovinen, “Biodegradation of the acetanilide herbicides alachlor, metolachlor, and propachlor”, *Critical Reviews in Microbiology*, vol. 24, no. 1, pp. 1-22, 1998.
- [150] T. Cao vd., “The role of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> toxicity in the decline of the submersed macrophyte *Vallisneria natans* in lakes of the Yangtze River basin, China”, *Marine and Freshwater Research*, vol. 58, no. 6, s. 581, 2007.
- [151] P. Saunkaew, P. Wangpakapattanawong ve A. Jampeetong, “Growth, morphology, ammonium uptake and nutrient allocation of *Myriophyllum brasiliense* Cambess. under high NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentrations”, *Ecotoxicology*, vol. 20, no. 8, pp. 2011-2018, 2011.
- [152] S. Astolfi ve S. Zuchi, “Adequate S supply protects barley plants from adverse effects of salinity stress by increasing thiol contents”, *Acta Physiologiae Plantarum*, vol. 35, no. 1, pp. 175-181, 2013.
- [153] Z. Zhu vd., “Growth and physiological responses of submerged plant *Vallisneria natans* to water column ammonia nitrogen and sediment copper”, *PeerJ*, vol. 4, pp. 1-15, 2016
- [154] F. Duman, E. Urey, R. Temizgul ve F. Bozok, “Biological responses of a non-target aquatic plant (*Nasturtium officinale*) to the herbicide, tribenuron-methyl: Effect of tribenuron-methyl on watercress”, *Weed Biology and Management*, vol. 10, no. 2, pp. 81-90, 2010.
- [155] C. Wang vd., “The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings”, *Chemosphere*, vol. 75, no. 11, pp. 1468-1476, 2009.
- [156] M. Ali, E.-J. Hahn ve K.-Y. Paek, “Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* bioreactor root suspension cultures”, *Molecules*, vol. 12, no. 3, pp. 607-621, 2007.

- [157] G. Borisova, N. Chukina, M. Maleva, A. Kumar ve M. N. V. Prasad, “Thiols as biomarkers of heavy metal tolerance in the aquatic macrophytes of Middle Urals, Russia”, *International Journal of Phytoremediation*, vol. 18, no. 10, pp. 1037-1045, 2016.
- [158] J. Gao, P. Ren, Q. Zhou ve J. Zhang, “Comparative studies of the response of sensitive and tolerant submerged macrophytes to high ammonium concentration stress”, *Aquatic Toxicology*, vol. 211, pp. 57-65, 2019.
- [159] S. Farago, K. Kreuz ve C. Brunold, “Decreased glutathione levels enhance the susceptibility of maize seedlings to metolachlor”, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 47, no. 3, pp. 199-205, 1993.
- [160] A. Nuttens, S. Chatellier, S. Devin, C. Guignard, A. Lenouvel, ve E. M. Gross, “Does nitrate co-pollution affect biological responses of an aquatic plant to two common herbicides?”, *Aquatic Toxicology*, vol. 177, pp. 355-364, 2016.
- [161] A. Çelekli, H. Arslanargun, Ç. Soysal, E. Gültekin ve H. Bozkurt, “Biochemical responses of filamentous algae in different aquatic ecosystems in South East Turkey and associated water quality parameters”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 133, pp. 403-412, 2016.
- [162] F. Pasquer, U. Ochsner, J. Zarn ve B. Keller, “Common and distinct gene expression patterns induced by the herbicides 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, cinidon-ethyl and tribenuron-methyl in wheat”, *Pest Management Science*, vol. 62, no. 12, pp. 1155-1167, 2006.

**KİŞİSEL BİLGİLER**

Adı Soyadı : Barış TANRIVERDİ  
Doğum Yeri : Adıyaman  
Doğum Tarihi : 12.08.1978  
Medeni Hali : Evli  
Yabancı Dili : İngilizce  
E-posta : barhatberk@gmail.com

**Eğitim Durumu**

Derece	Alan	Üniversite	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Biyoloji	Gaziantep Üniversitesi	2010
Lisans	Biyoloji	Ankara Üniversitesi	1998
Lise	Matematik	Adıyaman Lisesi	1993

**Yayınlar**

- [1] A. Çelekli, B. Tanrıverdi ve H. Bozkurt, “Predictive modeling of removal of Lanaset Red G on *Chara contraria*; kinetic, equilibrium, and thermodynamic studies”, *Chemical Engineering Journal*, vol. 169, no. 1-3 , pp. 166-172, 2011.
- [2] A. Çelekli, B. Tanrıverdi ve H. Bozkurt, “Lentil Straw: a novel adsorbent for removing of hazardous dye–Sorption behavior studies”, *Clean–Soil, Air, Water*, vol. 40, no. 5, pp. 515-522, 2012.
- [3] B. Tanrıverdi, M. F Gikli, D. Koc ve E. R. Sivaci, “Evulation effects of *Cryptocoryne walkerii* (Schott) as a biorestorer on elimination of turbidity”, *Journal of Environmental Protection and Ecology*, vol. 17, no. 1, pp. 191-198, 2016.