

In vitro Koşullarda *Ceratophyllum demersum* L.'un Krom (III) Akümülyasyonunun Araştırılması

Muhammet DOĞAN¹, Mehmet KARATAŞ², Muhammad Aasım²

¹Karamanođlu Mehmetbey Üniversitesi, Kamil Özdađ Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Karaman, Türkiye, ²Necmettin Erbakan Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü, Konya, Türkiye.

✉ : mtdogan1@gmail.com

ÖZET

Bu çalışma, farklı konsantrasyon (0-12 mg/L) ve sürelerde (1, 3 ve 5 gün) kroma (Cr) maruz bırakılan *Ceratophyllum demersum* L. 'un ağır metal akümülyasyon seviyelerini ve Cr toksisitesinin taze ve kuru ağırlıklar, fotosentetik pigmentasyon (klorofil a, klorofil b, toplam klorofil ve karotenoid), protein içeriği ve lipid peroksidasyonu üzerine etkilerini sunmaktadır. Cr akümülyasyonu, metal konsantrasyonu ve uygulama süresinin artışı ile artış göstermiştir. En fazla Cr akümülyasyon değeri 12 mg/L Cr uygulamasında ve 5 gün sonunda tespit edilmiştir. Cr toksisitesinden kaynaklı fotosenteik pigment ve protein içeriklerinde önemli azalışlar kaydedilmiştir. Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, minimum fotosentetik pigment seviyeleri 5 gün sonra 12 mg/L kromda belirlenmiştir. Protein içeriğindeki maksimum azalma %35.84 olarak tespit edilmiştir. Malondialdehit (MDA) içeriği, lipid peroksidasyonunun bir ürünü olarak ölçülmüştür. Konsantrasyon ve uygulama süresindeki artış ile doğru orantılı olarak MDA içeriği de artmıştır ($p<0,05$). Bitkideki maksimum MDA seviyesi 12 mg/L kromda 15,58 nmol/g olarak ölçülmüştür.

DOI:10.18016/ ksudobil.332980

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 06.08.2017

Kabul tarihi : 09.09.2017

Anahtar Kelimeler

Ağır metal,
Biyoakümülyasyon,
Cr toksisitesi,
Fitoremediasyon

Araştırma Makalesi

Investigation of Chromium (III) Accumulation of *Ceratophyllum demersum* L. under *In vitro* Conditions

ABSTRACT

This study presents heavy metal accumulation levels of *Ceratophyllum demersum* L. exposed to chromium (Cr) at different concentrations (0-12 mg/L) and durations (1, 3 and 5 days) and effects of Cr toxicity on fresh and dry weights, photosynthetic pigmentation (chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll and carotenoid), protein contents and lipid peroxidation. Cr accumulation increased with increasing metal concentration and exposure time. The highest Cr accumulation value was determined at 12 mg/L Cr application and after 5 days. Significant reductions in photosynthetic pigment and protein contents from Cr toxicity were noted. Compared with the control groups, minimum photosynthetic pigment levels were determined at 12 mg/L Cr after 5 days. The maximum reduction in the protein content was determined to be 35.84%. Malondialdehyde (MDA) content was measured as a product of lipid peroxidation. MDA content has also increased in direct proportion to the increase in concentration and application time ($p<0.05$). The maximum MDA level in the plant was measured as 15.58 nmol/g at 12 mg L Cr..

Article History

Received : 06.08.2017

Accepted : 09.09.2017

Keywords

Heavy metal,
Bioaccumulation,
Cr toxicity,
Phytoremediation

Research Article

To Cite : Doğan M, Karataş M, Aasım M 2018. In vitro Koşullarda *Ceratophyllum demersum* L.'un Krom (III) Akümülyasyonunun Araştırılması. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 21(3): 277-285. DOI:10.18016/ ksudobil.332980

GİRİŞ

Dünya yüzeyinin $\frac{3}{4}$ 'ünün sularla kaplı olması, dünyada su bolluğu olduğu görünümünü veriyorsa da, içilebilir nitelikteki su oranı ancak % 0.74 civarındadır (Eryılmaz ve ark., 2014). Sanayi Devrimi başlarında 1 milyar olan dünya nüfusu, 1950 yılında 2.5 milyar, 2005 sonunda ise ortalama 6.5 milyara ulaşmıştır. Hızlı nüfus artışı, kentleşme ve sanayileşme gibi faktörlerle doğanın eşik değerinin aşılmasına başlanması ve insanlar arasında çevre bilincinin yeterince yerleşmemesi, içilebilir suyu tükenme tehlikesiyle karşı karşıya bırakmıştır. Ayrıca, su ekosistemleri ve içilebilir su kaynaklarının sorumsuzca kirletilmesi, geri dönüşümü olanaksız problemlere ortam hazırlamaktadır (Akın ve Akın, 2017).

Su ve çevre kirliliğinin oluşmasına neden olan etkenlerden başında sanayi faaliyetleri gelmektedir. Sanayi atıksuyu toplam deşarj edilen atıksuyun yaklaşık %1'i kadar olsa da içeriğindeki yüksek zehirlilik oranına sahip civa (Hg), kurşun (Pb), krom (Cr) ve çinko (Zn) gibi ağır metaller ile çok büyük tehdit oluşturmaktadır. Yani sanayi faaliyetlerinden kaynaklanan ağır metal kirliliği, diğer faaliyetlerden kaynaklanan olumsuz etkilerden daha fazla çevreye zarar vermektedir (Muluk ve ark., 2013).

Ağır metaller düşük konsantrasyonlarda bile insan sağlığı üzerinde toksik ve zehir etkisi göstererek ciddi sorunlara yol açabilir (Arora ve ark., 2008; Memon ve Schröder, 2009; Yousefi ve ark., 2016). Canlı sistemlerinde bulunan toksik ve mutajenik metal iyonu olan Cr'da, insan sağlığı üzerine ciddi zararlara neden olan ağır metallerin başında gelmektedir. Uzun periyotlarda Cr maruziyetinde karaciğer ve böbrekler zarar görülebileceği gibi kan dolaşım sistemi ve solunum sistemi de büyük zarar görebilir. Kısa süre ve düşük oranda krom maruziyetinde ise mide ve deri rahatsızlığı görülebilmektedir. Cr daha çok sulu ortamlarda birikerek çoğalır. Bu durum Cr ile kirlenmiş ortamdaki su canlılarının tüketimi ile kroma maruz kalılabileceğini göstermektedir (Yüce, 2011). Kişinin genetik yatkınlığına bağlı olarak Cr, farklı organlarda kansere yol açabilmektedir ve en temel kanserojen etkisi akciğerler üzerinde gözlenmiştir (Costa ve Klein, 2006).

Kirlenmiş alanların ve atık suların arıtımında biyolojik, kimyasal ve fiziksel birçok metot kullanılmaktadır. Biyolojik arıtma yöntemleri arasında bulunan fitoremediasyon diğer arıtım tekniklerine göre güncel, düşük maliyetli, etkili, çevre dostu ve *in situ* uygulanabilir bir tekniktir ve ağır metal sorunu için en önemli çözümlerin başında gelmektedir. Fitoremediasyon, temelde bitkiler kullanılarak ortamdaki kontaminantların konsantrasyonlarını ve toksik etkilerini azaltmak anlamına gelmektedir (Ali ve ark., 2013; Favas ve ark., 2014). Bu çalışmada, *in vitro* koşullarda

Ceratophyllum demersum L.'un Cr (III) akümülyasyonunun araştırılması ve Cr'un toksik etkilerinin (taze ve kuru ağırlık, fotosentetik pigmentasyon, protein içeriği ve lipit peroksidasyonu üzerine) değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Bitki Büyütme Koşulları ve Bitkilerin Deneye Hazırlanması

Fitoremediasyon çalışmalarında kullanılan *C. demersum*, bitki doku kültürü teknikleri ile üretilmiştir. *In vitro* üretim için bitkinin sürgün ucu eksplantları 0,40 mg/L benzilamino pürin (BAP) içeren sıvı Murashige ve Skoog (MS) temel besin ortamında (Murashige ve Skoog, 1962) sekiz hafta süre ile kültüre alınmıştır. *In vitro* üretilen bitkilerin dış koşullara alıştırmaları için üzerindeki besin ortamı uzaklaştırılmış ve ardından bitkiler %10'luk Hoagland besin çözeltisi (Hoagland ve Arnon, 1950) içeren su bulunan kaplar içerisine yerleştirilmiş ve iki hafta süre ile iklimlendirme dolabına kaldırılmıştır. İklimlendirme kabini, 24°C sıcaklık, %80 bağıl nem ve 16 saat floresan aydınlatma 8 saat karanlık olacak şekilde kurulmuştur.

Bitkilerin Muamele Ortamı ve Deneysel Düzenek

Fitoremediasyon deneylerinde ağır metal olarak krom (Cr) için $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (Sigma) kullanılmıştır. Çözeltiler hazırlanmadan önce her bir ağır metal uygulaması için stok solüsyonlar oluşturulmuş ve diğer derişimler bu stok çözeltiden seyreltilerek hazırlanmıştır. 400 ml su içeren beherglaslar içerisine 5 g bitki (yaklaşık 5-6 cm) ve %10'luk Hoagland besin çözeltisi eklenmiştir (pH:7). Bitkiler 3, 6, 9, 12 mg/L Cr içeren su ortamlarında 1, 3 ve 5 gün süre ile bekletilmiştir. Ayrıca bitkiler kontrol amaçlı ağır metal eklenmemiş su ortamına da aktarılmıştır. Denemeler, 25°C sıcaklık, %80 bağıl nem, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmış iklimlendirme dolabında ve 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür.

Bitki Örneklerinin Alımı ve Analizi

Laboratuvarda belirlenen koşullar altında 1, 3 ve 5 gün boyunca Cr etkisine bırakılan bitki örnekleri bu süreler sonunda ortamlarından çıkarılmıştır. Bitkilerin kaba filtre kağıdı ile suları alındıktan sonra taze ağırlıkları tartılmış ve etüve (70°C) yerleştirilerek kurutulmuştur. Ardından 10 ml %65'lik HNO_3 (Merck) eklenerek, SINEO MDS-10 model mikrodalga (Microwave Chemistry Technology, Çin) fırında çözülmüştür. Bitkilerdeki Cr tayini için örnekler Atomik Absorpsiyon Spektrofotometre (AAS) cihazında (Perkin Elmer PinAAcle 900T) okutulmuştur. Cr varlığının doğruluğu ve kontrolü için sertifikalı referans materyal (SRM, NIST 1547) kullanılmıştır. AAS her bir örneği 3 okumanın ortalamasını verecek şekilde ayarlanmıştır. AAS'da Cr

element ölçümlerinin dalga boyu 357,87 nm, slitalarlığı 0,7 nm ve akım şiddeti 25 mA'dir. Cihazın stabilitesini değerlendirmek için her 10 örnekte bir standart okuması yapılmıştır.

Biyokonsantrasyon Faktörünün (BKF) Hesaplanması

Biyokonsantrasyon faktörü (BKF) fitoremediasyon çalışmalarında kullanılan bitkilerdeki ağır metal derişiminin, uygulanan ağır metal derişimlerine bölünmesiyle hesaplanmaktadır. Fitoremediasyon için kullanılan bitkilerin Cr ağır metal uygulamalarından sonra BKF oranı aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (Zayed ve ark., 1998).

BKF = Fitoremediasyondan sonra alınan bitkilerdeki ağır metal konsantrasyonu (mg/kg) / başlangıçta su ortamına eklenen metal konsantrasyonu (mg/L).

Taze ve Kuru Ağırlık Miktarının Ölçülmesi

Farklı sürelerde ve konsantrasyonlarda ağır metal içeren ortamlardaki bitkiler ve kontrol grubu bitkileri tartılarak taze ağırlıkları alındıktan sonra 70°C etüvde bekletilmiş ve ardından tartılarak kuru ağırlıkları tespit edilmiştir.

Fotosentetik Pigment Analizi

Yıkanmış taze bitki örnekleri (100 mg) 5 ml %80'lik asetonla homogenize edilmiştir. Daha sonra ekstraktın son hacimi 10 ml olacak şekilde %80'lik (v/v) asetonla tamamlanmış ve 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Klorofil *a* için 663 nm, klorofil *b* için 646 nm ve karotenoid için 470 nm'de spektrofotometrede (Thermo Fisher Scientific, Multiskan Go) asetona karşı absorbans değerleri okunmuştur. Klorofil *a*, klorofil *b* ve karotenoid hesaplamaları Lichtenthaler ve Wellburn (1983)'e göre yapılmıştır. Toplam klorofil içeriği klorofil *a* + klorofil *b* olarak verilmiştir.

Protein Analizi

Protein analizi Lowry ve ark. (1951)'nin saptadıkları yöntemle göre yapılmıştır. 0,5 g taze bitki materyali 5 mL 0,1 M fosfor tamponunda (pH 7.4) homojenize edildikten sonra 12.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatanttan 0,3 mL alınarak, üzerine 3 ml alkali çözelti ilave edilmiş ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonra 0,3 ml Folin-Ciocalteu ayırıcı eklenerek 30 dk oda sıcaklığında bekletilmiş ve absorbans 750 nm dalga boyunda okutulmuştur. Aynı işlem 0,3 ml saf su kullanılarak tank için de uygulanmıştır. Standart eğri çizimi için de aynı yöntem farklı derişimlerde hazırlanan sığır serum albumin çözeltileri kullanılarak yapılmıştır.

Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi

Lipit peroksidasyonu Heath ve Packer (1968) tarafından anlatılan yöntemle göre malondialdehit (MDA) konsantrasyonu ölçülerek belirlenmiştir. Bitki örnekleri 0,5 g alınarak 5 ml %0,1'lik trikloro asetik

asit (TCA) içerisinde homojenize edilmiştir. Homojenat 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantın 1 ml'sine 4 ml %20 TCA içerisinde hazırlanmış %0,5'lik tiobarbitirik asit (TBA) ilave edilmiştir. Hazırlanan karışım 95°C 30 dk ısıtıldıktan sonra hızlı bir şekilde buz içerisinde soğutulmuştur. Soğutulan tüpler 10.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantların absorbansı 532 ve 600 nm'de spektrofotometrede okutulmuştur. Spesifik olmayan absorpsiyon için 600 nm'de okunan değer 532 nm'de okunan değerden çıkarılmış ve aktivite hesaplaması yapılmıştır.

İstatistiksel Analizler

Tüm denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Elde edilen veriler SPSS 21 for Windows (Statistical Package for the Social Sciences version 21.0, IBM Corporation, Armonk, NY, USA) programı ile analiz edilmiş ve Post Hoc testleri için de Duncan testleri uygulanmıştır.

BULGULAR

C. demersum farklı konsantrasyonlarda Cr (3-12 mg/L) ile 1, 3 ve 5 gün süre ile muamele edilmiş ve ardından bitkilerin Cr akümülyasyonları değerlendirilmiştir (Şekil 1A). Ortamdaki Cr konsantrasyonu ve uygulama süresi arttıkça bitkide tespit edilen Cr miktarı da artış göstermiştir ($p<0,05$). En yüksek Cr akümülyasyon değeri 4035,83 mg/kg k.a ile 5 gün sonunda 12 mg/L Cr uygulamasındaki bitkilerde tespit edilmiştir. 1 ve 3 gün sonunda ise en yüksek Cr akümülyasyonları sırasıyla 2533,67 ve 3609,17 mg/kg k.a olarak belirlenmiştir. Cr akümülyasyonu bakımından 1 gün sonundaki veriler, 3 ve 5 gün uygulamasındaki verilere göre oldukça düşük bulunmuştur. 1, 3 ve 5 gün sonunda en düşük Cr akümülyasyonları ise 3 mg/L Cr uygulamasında sırasıyla 1642,75, 2604,25 ve 2996,67 mg/kg k.a olarak tespit edilmiştir.

Farklı sürelerde ve konsantrasyonlarda Cr uygulanan *C. demersum*'un BKF değeri hesaplanmıştır (Şekil 1B). BKF değerleri, uygulama süresi ve uygulanan Cr konsantrasyonuna bağlı olarak azalış göstermiş olup, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). En yüksek BKF değerleri 3 mg/L Cr içeren ortamda sırası ile 5 gün sonunda 998,89, 3 gün sonunda 868,08 ve 1 gün sonunda 547,58 olarak tespit edilmiştir. En düşük BKF değerleri ise 12 mg/L Cr içeren ortamda 1 gün sonunda 211,14, 3 gün sonunda 300,76 ve 5 gün sonunda 336,32 olarak tespit edilmiştir. Genel olarak en düşük BKF değerleri 1 gün uygulamasında, en yüksek BKF değerleri 5 gün uygulamasında hesaplanmıştır.

Cr etkisi altında *C. demersum*'un taze ağırlıkları Şekil 1C'de verilmiştir. 1, 3 ve 5 gün sonunda bitkilerde artan Cr konsantrasyonuna bağlı olarak taze ağırlıklarında azalmalar tespit edilmiştir. En yüksek taze ağırlık, 5 gün sonunda 5,29 g ile kontrol

grubundaki bitkilerde tespit edilirken, en düşük taze ağırlık ise 4,81 g ile 12 mg/L Cr uygulanan bitkilerden tespit edilmiştir. 3 gün sonunda 3 mg/L Cr uygulanan bitkilerin taze ağırlıkları kontrole kıyasla %1,74 oranında artarken, 3 mg/L'den fazla uygulanan Cr maruziyetinde ise bitkilerin taze ağırlıkları azalmıştır. 5 gün sonunda artan Cr konsantrasyonuna bağlı olarak kontrole göre bitkilerin taze ağırlıklarında sırasıyla %4,54, %6,87, %8,00 ve %9,14 oranında azalışlar kaydedilmiştir.

Şekil 1D'de görüldüğü gibi farklı sürelerde artan Cr maruziyetinde *C. demersum*'un kuru ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir ($p<0,05$). 1 gün sonunda ortamdaki Cr konsantrasyonunun artışına bağlı olarak kuru ağırlıklarda artışlar kaydedilmiş olup, kontrole göre en yüksek kuru ağırlık artışı %26,90 ile 12 mg/L Cr uygulanan bitkilerde görülmüştür. 3 gün sonunda kontrole göre en fazla kuru ağırlık artışı %12,84 ile en az oranda Cr içeren (3 mg/L) ortamdaki bitkilerde tespit edilirken, en fazla azalış ise %5,26 ile 9 mg/L Cr içeren ortamdaki bitkilerde tespit edilmiştir. 5 gün sonunda uygulanan Cr konsantrasyonunun artışına bağlı olarak kuru ağırlıklarda azalmalar kaydedilmiş olup, en fazla azalma %10,56 ile 12 mg/L Cr içeren ortamdaki bitkilerde görülmüştür.

Farklı sürelerde Cr etkisinde bırakılan bitkilerin fotosentetik pigment içerikleri incelenmiş ve Şekil 2'de klorofil *a*, klorofil *b*, toplam klorofil ve karotenoit içerikleri gösterilmiştir. Bitkiye uygulanan Cr konsantrasyonu ve uygulama süresi arttıkça bitkide tespit edilen fotosentetik pigment içerikleri düşüş göstermiş ve bu içerikler $p<0,05$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Klorofil *a* içerikleri bakımından en yüksek değer 1 gün sonunda 0,78 mg/g t.a ile 3 mg/L Cr uygulanan ortamdaki bitkilerde tespit edilmiş ve kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ($p>0,05$) bulunmamıştır (Şekil 2A). 3 ve 5 gün sonunda da yine en yüksek klorofil *a* içeriği 3 mg/L Cr içeren ortamdaki bitkilerden sırası ile 0,70 mg/g t.a ve 0,66 mg/g t.a olarak tespit edilmiştir. Kontrole kıyasla klorofil *b* içeriğinde en fazla düşüş oranları 1, 3 ve 5 gün sonunda sırasıyla %37,31, %61,40 ve %78,32 ile 12 mg/L Cr içeren ortamdaki bitkilerde tespit edilmiştir (Şekil 2B).

Uygulanan Cr konsantrasyonu ve uygulama süresine bağlı olarak bitkilerde tespit edilen toplam klorofil içerikleri arasındaki değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Klorofil *a* ve klorofil *b*'de olduğu gibi uygulama süresi ve uygulanan Cr konsantrasyonu arttıkça bitkideki toplam klorofil içeriği de azalış göstermiştir (Şekil 2C).

1, 3 ve 5 gün sonunda bitkilerin toplam klorofil içeriklerinde kontrole göre en fazla düşüş oranları sırasıyla %46,40, %58,42 ve %69,07 ile 12 mg/L Cr içeren ortamdaki bitkilerde kaydedilirken, en az

düşüş oranları ise sırasıyla %8,19, %17,65 ve %22,25 ile 3 mg/L Cr içeren ortamdaki bitkilerde kaydedilmiştir. Kromun farklı konsantrasyonlarına 1, 3 ve 5 gün boyunca maruz kalan bitkilerde belirlenen karotenoit miktarı Şekil 2D'de verilmiştir. Genel olarak bitkilerin maruz kaldığı Cr konsantrasyonu ve uygulama süresi arttıkça bitkideki karotenoit içerikleri düşüş göstermiştir. Karotenoit içerikleri arasında değişimler $p<0,05$ seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 1 günlük uygulamada 3 ve 6 mg/L Cr'a maruz kalan bitkilerin karotenoit içerikleri ile kontrol grubu bitkilerinin karotenoit içerikleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiş olup, 9 ve 12 mg/L Cr'a maruz kalan bitkilerdeki karotenoit içerikleri önemli derecede düşüş göstermiştir ($p<0,05$). Cr etkisindeki bitkilerin karotenoit içeriğinde kontrole göre en yüksek düşüş oranları 1 gün sonunda %44,05, 3 gün sonunda %48,58 ve 5 gün sonunda %60,03 ile 12 mg/L Cr içeren ortamdaki bitkilerde tespit edilmiştir.

C. demersum bitkisindeki protein içeriği değişimleri Şekil 3A'da verilmiş olup, bitkiye uygulanan Cr konsantrasyonu ve uygulama süresi arttıkça protein içeriğinde önemli azalışlar belirlenmiştir ($p<0,05$). 1, 3 ve 5 gün boyunca Cr'a maruz kalan bitkilerde kontrole göre protein içeriğinde en fazla azalışlar sırasıyla %18,42, %29,69 ve %35,84 ile 12 mg/L Cr bulunan ortamdaki bitkilerde tespit edilmiştir. Cr uygulanan ortamlarda en yüksek protein içerikleri 1 gün sonra 9,36 mg/g t.a, 3 gün sonra 8,67 mg/g t.a ve 5 gün sonra 8,12 mg/g t.a ile Cr'un en düşük konsantrasyonundaki (3 mg/L) bitkilerde elde edilmiştir.

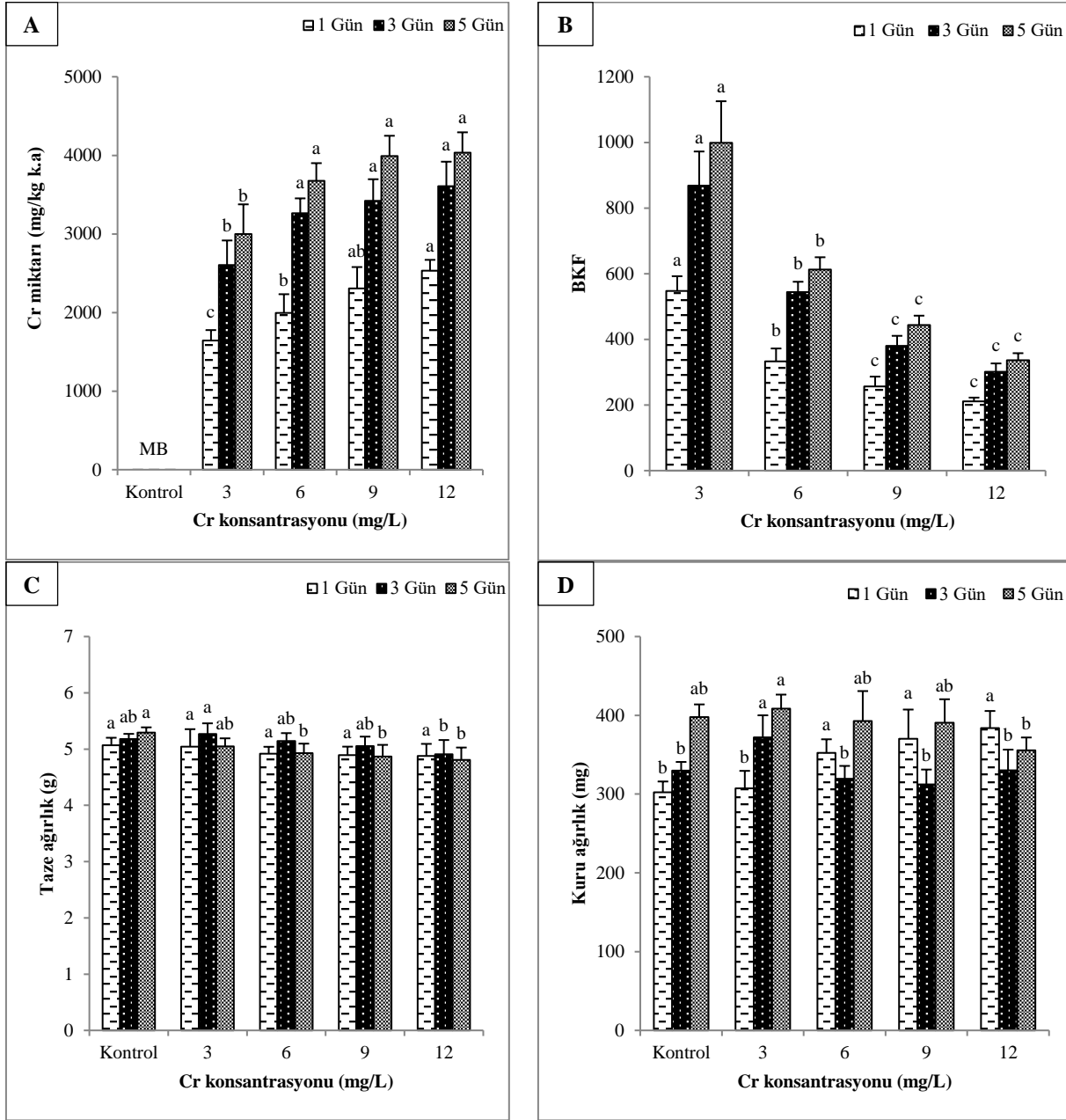
Cr stresi altında bırakılan *C. demersum* bitkisindeki lipid peroksidasyonunu belirlemek için MDA miktarı araştırılmıştır (Şekil 3B). Genel olarak Cr konsantrasyonu ve maruziyet süresinin artışıyla, MDA içeriği de artış göstermiş ve istatistiksel olarak $p<0,05$ seviyesinde önemli bulunmuştur. Kontrole göre maksimum MDA içeriği Cr'a 5 gün boyunca maruz kalan bitkilerde tespit edilmiş olup, 3 mg/L Cr'da %26,75, 6 mg/L Cr'da %31,51, 9 mg/L Cr'da %46,51 ve 12 mg/L Cr'da %58,23 artış ile kaydedilmiştir. 1 ve 3 gün sonunda kontrole göre en yüksek MDA içerikleri 12 mg/L Cr uygulamasında sırasıyla %23,08 ve %39,99 artış ile tespit edilmiştir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

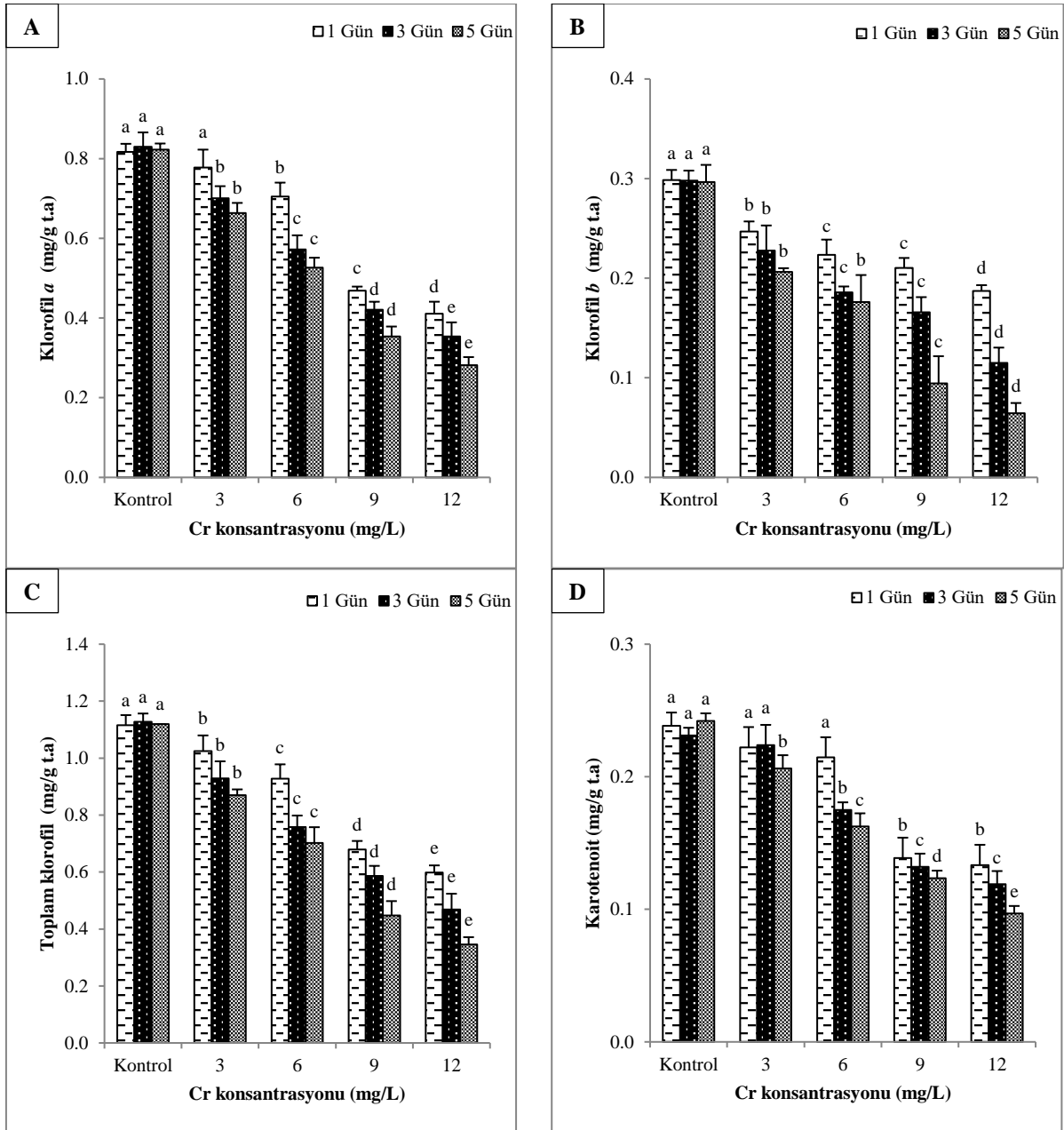
C. demersum, 3-12 mg/L Cr bulunan su ortamlarında 1, 3 ve 5 gün süre ile muamele edilmiş ve bitkilerin ortamdaki Cr metalleri yüksek oranda akümüle ettikleri tespit edilmiştir. Benzer şekilde ağır metallerin *C. demersum* tarafından akümülyasyonu daha önce de bildirilmiştir (Tripathive ark., 1995; Yaowakhan ve ark., 2005; Duman ve ark., 2010). *C. demersum*'un akümülyasyon yeteneği, bitkinin ağır metali hücre duvarına bağlaması veya diğer glutatyon, fitoşelatin sentetaz gibi ligantlara bağlaması sağlamış olabilir (Yang ve ark., 2005). Ayrıca önceki çalışmalar

ağır metallerin bitkinin hücre duvarı veya vakuollerine bağlı formda kaldığını göstermiştir (Mishra ve ark., 2006). Uygulama süresi ve uygulanan metal konsantrasyonu

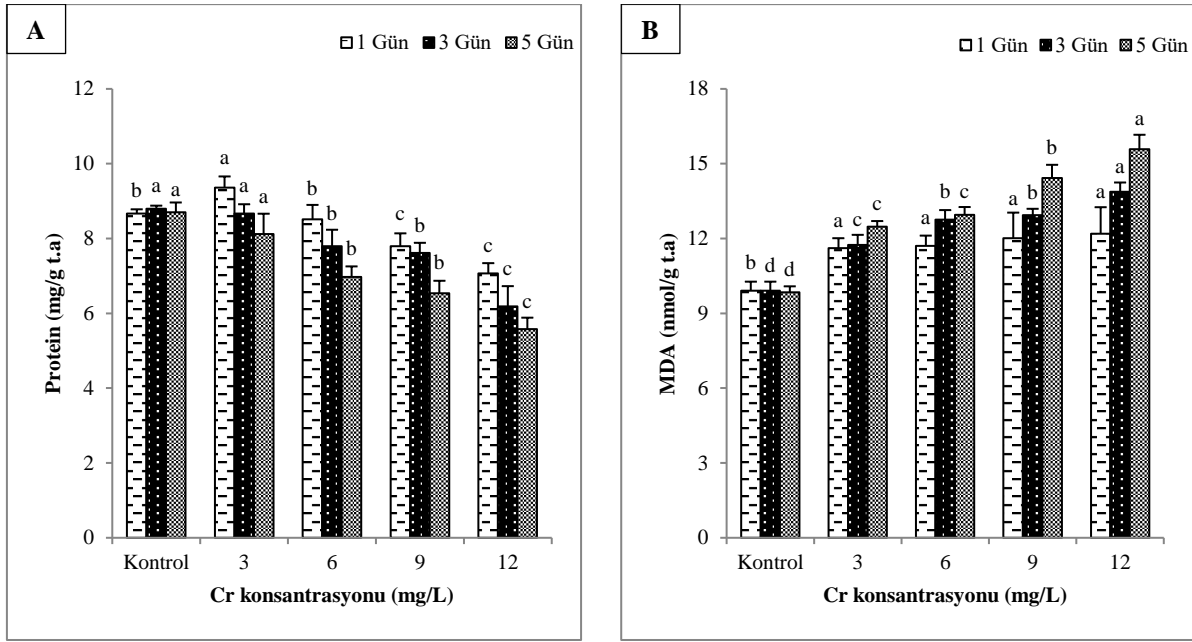
arttıkça bitkide tespit edilen Cr miktarı da artış göstermiştir. Yani tüm metal uygulamalarında en yüksek metal birikimi 12 mg/L Cr uygulamasında ve 5 gün sonunda elde edilmiştir.



Şekil 1. Farklı konsantrasyon ve sürede Cr uygulanan *C. demersum*'un (A) Cr miktarı, (B) BKF değeri, (C) taze ve (D) kuru ağırlıkları. Tüm değerler üç tekrarın ortalamasını ifade etmektedir (Ortalama \pm Standart sapma $n=3$). Farklı konsantrasyonlardaki aynı gün için farklı harfler ile gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (Duncan test, $p<0,05$) (MB: Metal Belirlenmedi)



Şekil 2. Farklı konsantrasyon ve sürelerde Cr uygulanan *C. demersum*'un (A) klorofil a, (B) klorofil b, (C) toplam klorofil ve (D) karotenoid içerikleri. Tüm değerler üç tekrarın ortalamasını ifade etmektedir (Ortalama \pm Standart sapma $n=3$). Farklı konsantrasyonlardaki aynı gün için farklı harfler ile gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (Duncan test, $p<0,05$).



Şekil 3. Farklı konsantrasyon ve sürelerde Cr uygulanan *C. demersum*'un (A) protein ve (B) MDA içerikleri. Tüm değerler üç tekrarın ortalamasını ifade etmektedir (Ortalama \pm Standart sapma $n=3$). Farklı konsantrasyonlardaki aynı gün için farklı harfler ile gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (Duncan test, $p<0,05$).

Benzer şekilde Duman ve ark. (2010) *C. demersum* bitkilerini 6 gün boyunca 1, 5 ve 10 mM kroma maruz bırakmış ve *C. demersum*'un önemli miktarda kromu akümüle edebildiği ve maksimum Cr içeriğini 10 mM Cr uygulamasında elde edildiğini bildirmiştir. Al-Ubaidy ve Rasheed (2015) *C. demersum*'u kullanarak su ortamından kadmiyumun uzaklaştırılması ile ilgili bir çalışmada kadmiyuma 3, 6, 9 gün boyunca maruz bırakılan bitkilerin hızlı bir şekilde kadmiyumu absorbe ettiği ve zamanla da absorbe edilen Cd miktarında artış olduğu bildirilmiştir. Chen ve ark. (2015) *C. demersum*'u kurşunun farklı konsantrasyonlarında (5-80 μ M) 7, 14 ve 21 gün boyunca maruz bırakarak, bitkinin biyoakümülyasyon potansiyelini araştırmışlardır. Pb akümülyasyonu, uygulanan Pb konsantrasyonuna bağlı olarak artış göstermiş ve maksimum akümülyasyon 4016,4 mg/kg k.a. olarak tespit edilmiştir. Singh ve ark. (2010) sucül bitki *Najasindica*'nın Pb biyoakümülyasyon potansiyelini araştırmak için içerisinde 1-100 μ M Pb bulunan ortamlarda 1, 2, 7 ve 14 gün boyunca bitkileri bekletmiş ve bitkilerdeki Pb miktarının ağır metal dozuna bağlı olarak artışı bildirilmiştir.

Biyokonsantrasyon faktörü bitkiye uygulanan metal konsantrasyonun bitki tarafından akümüle edilme yeteneklerinin bir göstergesidir (Kara ve Zeytinluoglu, 2007). Uygulanan metal konsantrasyonu ve uygulama süresi bitkilerin BKF değerini önemli derecede etkilemiştir. Çalışmamızda bitkilere uygulanan Cr derişimi arttıkça bitkide hesaplanan BKF değeri gittikçe azalmıştır. Benzer şekilde Bunluesin ve ark. (2004) farklı Cd toksisitesi (0,1-10,0 mg/L) altındaki *C. demersum*'un BKF

üzerine yaptıkları çalışmada en yüksek BKF değerinin uygulanan Cd konsantrasyonu ile azaldığını bildirmişlerdir. Das ve ark. (2016) *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms bitkilerine uygulanan Cd konsantrasyonu (5-20 mg/L) ve uygulama süresi (0-21 gün) ile birlikte BKF değerlerinin genel olarak azaldığını tespit etmiştir.

Cr ağır metalinin etkisinde bırakılan *C. demersum*'un taze ve kuru ağırlıkları, fotosentetik pigmentasyonu, protein içeriği ve lipit peroksidasyonu incelenmiş ve yüksek oranda kullanılan Cr metalinin toksik etkiler gösterdiği belirlenmiştir. Benzer şekilde Cr ağır metalinin bitkiler üzerindeki toksik etkileri daha önce bazı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Satyakala ve Jamil, 1992; Gaur ve ark., 1994 ; Sharma ve ark., 1995).

Bu çalışmada artan Cr konsantrasyonuyla beraber taze ağırlıklarında azalış görülmüştür. Ayrıca Cr konsantrasyonu ve uygulama süresi arttıkça bitkinin fotosentetik pigment içeriklerinde önemli ölçüde azalışlar tespit edilmiştir. En düşük klorofil *a*, klorofil *b* ve karotenoid içerikleri 12 mg/L Cr uygulamasında ve 5 gün sonunda kaydedilmiştir. Bu azalmanın nedenini demir (Fe) içeriğindeki azalma, klorofil biyosentezinde görevli enzimlerin inaktivasyonu ve klorofil molekülünde bulunan Mg'un Cr ile yer değiştirmesi nedeniyle olabileceğini düşünülmektedir. Benzer şekilde Koca (2012), *C. demersum* bitkileri farklı sürelerde (1, 2, 4 ve 7 gün) içerisinde farklı konsantrasyonlarda Cr bulunan (1-10 mM) su ortamında bekletmiş ve fotosentetik pigment (klorofil *a*, *b* ve karotenoid) içeriklerinin hem süre hem de konsantrasyonun önemli oranda fotosentetik

pigmentasyonu azalttığı belirlenmiştir. Nath ve ark. (2005) *Raphanus sativus* L.'u 2-10 mg/L Cr etkisinde 10 ve 20 gün bekletmiş ve uygulanan Cr konsantrasyonu ve süresiyle klorofil *a* ve klorofil *b* içeriğinde azalmayı raporlamışlardır.

C. demersum 1, 3 ve 5 gün süresince Cr'un farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılmış ve bitkinin protein içerikleri analiz edilmiştir. Genel olarak bitkilere uygulanan ağır metal konsantrasyonu ve uygulama süresi arttıkça bitkide tespit edilen protein içerikleri de azalış göstermiştir. Protein içeriğindeki bu düşüşün sebebi ROS (reaktif oksijen türleri) miktarının artışı ile birçok proteinin zarar görmesi ve ağır metal toksisitesi ile birlikte aktif hale geçen proteaz veya diğer katabolik enzimler ile proteinlerin parçalanması neden olmuş olabilir (Koca, 2012). Yüksek konsantrasyonlu metal stresi altında protein içeriğinde azalmalar ise daha önce *C. demersum* (Mishra ve ark., 2006; Chen ve ark., 2015), *N. indica* (Singh ve ark., 2010) *W. arrhiza* (Piotrowska ve ark., 2009) bitkilerinde bildirilmiştir.

Lipit peroksidasyonu membran lipitlerinin oksidatif bozulması olarak tanımlanır. Canlı sistemlerde MDA üreten tek mekanizma lipit peroksidasyonudur. MDA, lipit peroksidasyonunun temel ürünü değildir, fakat genel parçalanma ürünüdür (Doğan, 2005; Zhang ve ark., 2007). *C. demersum*'da en yüksek MDA içerikleri 12 mg/L Cr maruziyetindeki bitkilerde kontrole göre %58,23 artış ile belirlenmiştir. Yüksek Cr konsantrasyonu ve uygulama süresi MDA içeriğinde önemli artışa neden olmuştur. Duman ve Koca, (2014) *C. demersum*'u 1-10 mM Cr etkisinde 1-7 gün süre ile bırakmış ve bitkinin MDA içeriğini artan Cr derişimi ve uygulama süresi ile arttığını bildirmiştir. Gill ve ark. (2015) *Brassica napus*'un dört kültüvatörünü farklı derişimlerde Cr etkisinde bırakmış ve en yüksek Cr maruziyetindeki bitkilerde MDA içeriğini daha yüksek bulmuşlardır.

Sonuç olarak, çalışmamızda Cr ağır metalinin *C. demersum* ile sulu ortamdan akümüasyonu araştırılmış ve *C. demersum*'un Cr metalini yüksek oranda aküme ettiği belirlenmiştir. Ayrıca bitkinin akümüasyon yeteneği üzerine süre ve konsantrasyonun önemli etkileri olduğunu tespit edilmiştir. En yüksek Cr akümüasyonunu 12 mg/L Cr uygulamasında ve 5 gün sonunda elde edilmiştir. Sanayi faaliyetlerinin neden olduğu ağır metal kirliliğinin gün geçtikçe artması, ağır metal kirliliğine karşı düşük maliyetli, etkili, çevre dostu ve güncel teknoloji olan fitoremediasyonun önemini daha da artırmıştır. Diğer arıtım tekniklerine alternatif biyolojik kaynakların sağlanması açısından bu çalışma datalarının, ileride yapılacak fitoremediasyon çalışmalarına önemli katkılar sunacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Akın M, Akın G 2017. Suyun Önemi, Türkiye'de Su Potansiyeli, Su Havzaları ve Su Kirliliği. Ankara Üniversitesi Dil ve Tarih-Coğrafya Fakültesi Dergisi, 47: 105-118.
- Ali H, Khan E, Sajad MA 2013. Phytoremediation of Heavy Metals-Concepts and Applications. Chemosphere, 91: 869-881.
- Al-Ubaidy HJ, Rasheed KA 2015. Phytoremediation of Cadmium in River Water by *Ceratophyllum demersum*. World Journal Of Experimental Biosciences, 3: 14-17.
- Arora M, Kiran B, Rani S, Rani A, Kaur B, Mittal N 2008. Heavy Metal Accumulation in Vegetables Irrigated with Water from Different Sources. Food Chemistry, 111: 811-815.
- Bunluesin S, Kruatrachue M, Pokethitiyook P, Lanza GR, Upatham ES, Soonthornsarathool V 2004. Plant Screening and Comparison of *Ceratophyllum demersum* and *Hydrilla verticillata* for Cadmium Accumulation. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 73: 591-598.
- Chen M, Zhang L, Li J, He X, Cai J 2015. Bioaccumulation and Tolerance Characteristics of a Submerged Plant (*Ceratophyllum demersum* L.) Exposed to Toxic Metal Lead. Ecotoxicology and Environmental Safety, 122: 313-321.
- Costa M, Klein KB 2006. Toxicity and Carcinogenicity of Chromium Compounds in Humans. Critical Reviews in Toxicology, 36: 155-163.
- Das S, Goswami S, Talukdar AD 2016. Physiological Responses of Water Hyacinth, *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms, to Cadmium and Its Phytoremediation Potential. Turkish Journal of Biology, 40: 84-94.
- Doğan M 2005. *Ceratophyllum demersum* L.'de Kadmiyum Klorür, Sodyum Klorür ve Bunların Kombinasyonlarının Fizyolojik ve Morfolojik Etkileri. Ç.Ü. Fen Bil. Ens., Biyoloji ABD, Doktora Tezi, 137 s.
- Duman F, Koca FD 2014. Single and Combined Effects of Exposure Concentration and Duration on Biological Responses of *Ceratophyllum demersum* L. Exposed to Cr Species. International Journal of Phytoremediation, 16: 1192-1208.
- Duman F, Şahan S, Ceylan A, Koca FD 2010. Biological Responses of *Ceratophyllum demersum* L. Exposed to Chromium (Cr⁺⁶). SDU Journal of Science (E-Journal), 5: 163-171.
- Eryılmaz H, İpek Şİ, Çelik BY 2014. Investigation of Water Quality of Borçka Dam Lake (Artvin). Journal of Science and Technology of Dumlupınar University, 33: 1-8.
- Favas PJC, Pratas J, Varun M, D'Souza R, Paul MS 2014. Phytoremediation of Soils Contaminated with Metals and Metalloids at Mining Areas: Potential of Native Flora. (Environmental Risk Assessment of

- Soil Contamination, InTech Press: Ed. Hernandez-Soriano MC) 485-517.
- Gaur JP, Noraho N, Chauhan YS 1994. Relationship Between Heavy Metal Accumulation and Toxicity in *Spirodela polyrrhiza* L. Schleid. and *Azolla pinnata* R. Br.. Aquatic Botany, 49: 183-192.
- Gill RA, Zang L, Ali B, Farooq MA, Cui P, Yang Su, Ali S, Zhou W 2015. Chromium-Induced Physio-Chemical and Ultrastructural Changes in Four Cultivars of *Brassica napus* L.. Chemosphere, 120: 154-164.
- Heath RL, Packer L 1968. Photoperoxidation in Isolated Chloroplasts I. Kinetic and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics, 125: 189-198.
- Hoagland DR, Arnon DI 1950. The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil. California Agricultural Experiment Station, Circular, 347: 1-32.
- Kara Y, Zeytinluoglu A 2007. Bioaccumulation of Toxic Metals (Cd and Cu) by *Groenlandia densa* (L.) Fourr.. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 79: 609-612.
- Koca FD 2012. Cr(III) ve Cr(VI) Maruziyetinde *Ceratophyllum demersum* L.'nin Biyolojik Cevabi: Konsantrasyon ve Uygulama Periyodunun Etkisi. E.Ü., Fen Bil. Ens., Biyoloji ABD, Yüksek Lisans Tezi, 75 s.
- Lichtenthaler HK, Wellburn AR 1983. Determinations of Total Carotenoids and Chlorophylls *a* and *b* of Leaf Extracts in Different Solvents. Biochemical Society Transactions, 11: 591-592.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ, 1951. Protein Measurement with Folin Phenol Reagent. Journal of Biological Chemistry, 193: 265-275.
- Memon AR, Schröder P 2009. Implications of Metal Accumulation Mechanisms to Phytoremediation. Environmental Science and Pollution Research, 16: 162-175.
- Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, Kumar R, Seth CD, Gupta DK 2006. Lead Detoxification by Coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) Involves Induction of hytochelatins and Antioxidant System in Response to Its Accumulation. Chemosphere, 65: 1027-1039.
- Muluk ÇB, Kurt B, Turak A, Türker A, Çalışkan MA, Balkız Ö, Gümrükçü S, Sarıgül G, Zeydanlı U 2013. Türkiye'de Suyun Durumu ve Su Yönetiminde Yeni Yaklaşımlar: Çevresel Perspektif. İş Dünyası ve Sürdürülebilir Kalkınma Derneği - Doğa Koruma Merkezi.
- Murashige T, Skoog F 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays With Tobacco Tissue Cultures. Plant Physiology, 15: 473-497.
- Nath K, Saini S, Sharma YK 2005. Chromium in Tannery Industry Effluent and Its Effect on Plant Metabolism and Growth. Journal of Environmental Biology, 26: 197-204.
- Piotrowska A, Bajguz A, Godlewska-Zylkiewicz B, Czerpak R, Kaminska M 2009. Jasmonic Acid as Modulator of Lead Toxicity in Aquatic Plant *Wolffia arrhiza* (Lemnaceae). Environmental and Experimental Botany, 66: 507-513.
- Satyakala G, Jamil Q 1992. Chromium Induced Biochemical Changes in *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms and *Pistia stratiotes*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 48: 921-928.
- Sharma DC, Chatterjee C, Sharma CP 1995. Chromium Accumulation and Its Effect on Wheat (*Triticum aestivum* L. Cv. Dh2204) Metabolism. Plant Science, 111: 145-151.
- Singh R, Tripathi RD, Dwivedi S, Kumar A, Trivedi PK, Chakrabarty D 2010. Lead Bioaccumulation Potential of an Aquatic Macrophyte *Najas indica* are Related to Antioxidant System. Bioresource Technology, 101: 3025-3032.
- Tripathi RD, Rai RN, Gupta M, Yunus M, Chandra P 1995. Cadmium Transport in Submerged Macrophyte *Ceratophyllum demersum* L. in Presence of Various Metabolic Inhibitors and Calcium Channel Blockers. Chemosphere, 31: 3783-3791.
- Yang X, Feng Y, He Z, Stoffella PJ 2005. Molecular Mechanisms of Heavy Metal Hyperaccumulation and Phytoremediation. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 18: 339-353.
- Yaowakhan P, Kruatrachue M, Pokethitiyook P, Soonthornsarathool V 2005. Removal of Lead Using Some Aquatic Macrophytes. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 75: 723-730.
- Yousefi N, Meserghani M, Bahrami H, Mahvi AH 2016. Assessment of Human Health Risk for Heavy Metals in Imported Rice and Its Daily Intake in Iran. Research Journal of Environmental Toxicology, 10: 75-81.
- Yüce M 2011. Bazı Ağır Metallerin Tayininde Kullanılmak Üzere Mikrobiyal Biyosensör Geliştirilmesi. A.Ü., Biyoteknoloji Ens., Doktora Tezi, 113 s.
- Zayed A, Gowthaman S, Terry N 1998. Phytoremediation of Trace Elements by Wetland Plants: I. Duckweed. Journal of Environmental Quality, 27: 715-721.
- Zhang FQ, Wang YS, Lou ZP, Dong JD 2007. Effect of Heavy Metal Stres on Antioxidative Enzymes and Lipid Peroxidation in Leaves and Roots of Two Mangrove Plant Seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*). Chemosphere, 67: 44-50.