

**GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***SPIRULINA SP.*'de CuCl₂, NaCl ve
BUNLARIN KOMBİNASYONLARININ
FİZYOLOJİK ETKİLERİ**

**BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**FATİH DENİZ
NİSAN 2008**

***SPIRULINA SP.*'de CuCl₂, NaCl
ve BUNLARIN KOMBİNASYONLARININ
FİZYOLOJİK ETKİLERİ**

**Gaziantep Üniversitesi
Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans Tezi**

**Danışman
Prof. Dr. Saadet D. SAYGIDEĞER**

**Fatih DENİZ
NİSAN 2008**

T.C.
GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Tezin Adı: *Spirulina* sp.'de CuCl_2 , NaCl ve Bunların Kombinasyonlarının
Fizyolojik Etkileri

Öğrencinin, Adı Soyadı: Fatih DENİZ

Tez Savunma Tarihi: 10.04.2008

Prof. Dr. Sadettin ÖZYAZICI
FBE Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

Prof. Dr. Saadet D. SAYGIDEĞER
Enstitü ABD Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Saadet D. SAYGIDEĞER
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri:

İmzası

Prof. Dr. Saadet D. SAYGIDEĞER(Jüri Başkanı) _____

Prof. Dr. Fahrettin GÖĞÜŞ _____

Yrd. Doç. Dr. Abuzer ÇELEKLİ _____

Yrd. Doç. Dr. Ayşegül İYİDOĞAN _____

Öğr. Gör. Dr. Muhittin DOĞAN _____

ÖZET

***SPIRULINA SP.*'de CuCl₂, NaCl ve BUNLARIN KOMBİNASYONLARININ FİZYOLOJİK ETKİLERİ**

DENİZ, Fatih

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Saadet D. SAYGIDEĞER

Nisan 2008, 51 sayfa

Bu çalışmada bakır klorür (CuCl₂, 0.1 ve 1.0 ppm), sodyum klorür (NaCl, 0.2 ve 0.4 M) ve bunların karışımlarının *Spirulina sp.*'de meydana getirdiği bazı fizyolojik etkiler araştırılmıştır. Bu kapsamda öncelikle mikroalg besin ortamına adaptasyona bırakılmıştır. Sonra mikroalg belirli derişimde stres çözültisi içeren besin yerlerine aktarılmıştır. Yedi günlük deney süresi sonunda mikroalglerin büyüme oranları, biyomas (kuru ağırlık üzerinden) miktarları, Cu ve K derişimleri, klorofil-a, karoten, prolin ve malondialdehit (MDA) miktarları belirlenmiştir.

1.0 ppm Cu derişiminin *Spirulina sp.*'nin gelişimi ile biyomas miktarını, K derişimi, klorofil-a ve karoten miktarlarını oldukça düşürdüğü, diğer yandan, Cu, prolin ve MDA miktarlarını ise artırdığı belirlenmiştir. Bununla birlikte 1.0 ppm Cu'a göre 0.1 ppm Cu, bu değişkenleri daha az olumsuz etkilemiştir ve *Spirulina sp.*'de daha az hasara yol açmıştır. Benzer şekilde NaCl de prolin ve MDA miktarlarını artırmış, diğer değişkenin miktarlarını ise azaltmıştır. Ayrı ayrı NaCl ve Cu uygulamasında karoten miktarındaki azalma klorofil-a'ya göre daha düşük olmuştur. CuCl₂ ve NaCl karışımı uygulandığında ise ortama NaCl eklenmesinin *Spirulina sp.*'nin Cu içeriğinde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca CuCl₂ ve NaCl'nin birlikte uygulanmasının diğer değişkenlere etkileri ayrı ayrı CuCl₂ ve NaCl uygulamasından daha fazla olmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Spirulina sp.*, CuCl₂, NaCl, stres, fizyolojik etkiler.

ABSTRACT

PHYSIOLOGICAL EFFECTS of CuCl₂, NaCl and THEIR COMBINATIONS on *SPIRULINA SP.*

DENİZ, Fatih

M.Sc. Thesis, In Biology

Supervisor: Prof. Dr. Saadet D. SAYGIDEĞER

April 2008, 51 pages

In this study some physiological effects of copper chloride (CuCl₂, 0.1 and 1.0 ppm), sodium chloride (NaCl, 0.2 and 0.4 M) and both of them on *Spirulina* sp. were investigated. In this content, firstly microalga was adapted to culture medium. Then microalga was inoculated into erlen flasks containing both of stress and culture solutions. Growth rate, biomass values (dry mass), Cu and potassium (K) concentrations, chlorophyll-a, caroten, proline and malondialdehyde (MDA) contents of microalga were determined at the end of seven days.

It was determined that 1.0 ppm Cu decreased the growth rate, biomass, K, chlorophyll-a and caroten contents of *Spirulina* sp., while causing increase in the contents of Cu, proline and MDA. However 0.1 Cu ppm affected these variables weakly and resulted less damage in *Spirulina* sp. with respect to 1.0 ppm Cu. Similarly, NaCl also increased proline and MDA contents, but decreased others. Decrease in the amount of caroten was less than that of chlorophyll-a in applications of Cu and NaCl separately. Concerning the application of NaCl and CuCl₂ mixture, it was determined that adding NaCl into the medium decreased Cu content of *Spirulina* sp. In addition, application of CuCl₂ and NaCl mixture affected other parameters more than the application of Cu and NaCl separately.

Key words: *Spirulina* sp., CuCl₂, NaCl, stress, physiological effects.

TEŞEKKÜR

İyi bir akademisyen olma yolunda her türlü desteğiyle her zaman yanımda olan değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Saadet D. SAYGIDEğER'e,

Çalıőmalarımda karőılaőılan problemlerin çözümünde ve sonuçların değerlendirilmesinde önemli katkıları olan ve önerileriyle değerli fikirler veren Sayın Öğr. Gör. Dr. Muhittin DOğAN'a,

Üzerimde emeği olan tüm hocalarıma,

Değerli biyolog arkadaşlarım, R. Aysun KEPEKÇİ, Mustafa PEHLİVAN'a, Önder YUMRUTAő'a ve Uğur ÇOLAK'a

Manevi desteklerinden güç kazandığım sevgili eőime, aileme ve değerli dostlarıma

En içten teőekkürlerimi sunuyorum...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	viii
BÖLÜM 1: GİRİŞ.....	1
1.1. Ağır Metaller.....	2
1.2. Bakır (Cu).....	3
1.2.1. Bakır Klorürün Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	4
1.2.2. Bakırın Önemi.....	5
1.2.3. Bakır Eksikliği.....	5
1.2.4. Bakır Toksisitesi.....	6
1.3. NaCl stresi.....	7
1.3.1. Tuz Toleransının Mekanizması.....	7
1.3.2. İyon Düzenlenmesi ve Lokalizasyonu.....	8
1.3.3. Uyuşabilir Bileşiklerin Biyosentezi.....	8
1.3.4. Antioksidan Enzimlerin İndüksiyonu.....	10
BÖLÜM 2: LİTERATÜR ÖZETLERİ.....	13
2.1. Bakır Stresi ile İlgili Çalışmalar.....	13
2.2. NaCl Stresi ile İlgili Çalışmalar.....	14
2.3. Cu ve NaCl Etkileşimi ile İlgili Çalışmalar.....	15
BÖLÜM 3: MATERYAL VE METOD.....	17
3.1. Materyal.....	17
3.1.1. Çalışma Materyali.....	17
3.1.2. Stres Uygulama Çözeltileri.....	19
3.2. Yöntem.....	19

3.2.1. Kültür Ortamı.....	19
3.2.2. Deney Ortamı ve Düzenegi.....	19
3.2.3. Büyüme Hızının Belirlenmesi.....	20
3.2.4. Biyomas Miktarının Belirlenmesi	20
3.2.5. Fotosentetik Pigment Analizi.....	20
3.2.6. Serbest Prolin Tayini.....	21
3.2.7. Malondialdehit Miktarının Belirlenmesi.....	21
3.2.8. <i>Spirulina</i> sp. 'nin Cu ve K Derişiminin Belirlenmesi.....	22
3.2.9. İstatistiksel Yöntem.....	22
BÖLÜM 4: ARAŞTIRMA BULGULARI.....	23
4.1. Büyüme Oranları.....	23
4.2. Biyomas Miktarları.....	25
4.3. Bakır ve Potasyum Derişimleri.....	27
4.4. Klorofil-a Miktarları.....	29
4.5. Karoten Miktarları.....	31
4.6. Prolin Miktarları.....	33
4.7. Malondialdehit Miktarları.....	35
BÖLÜM 5: TARTIŞMA.....	37
KAYNAKLAR.....	45

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1.1 Bakır klorürün fiziksel görünümü	4
Şekil 3.1 <i>Spirulina</i> sp.'nin mikroskopik görünüş	18
Şekil 3.2 Deney düzeneği.....	20
Şekil 4.1 Cu, NaCl ve Cu+NaCl karışımlarının etkisine bırakılan <i>Spirulina</i> sp.'nin büyüme oranları.....	24
Şekil 4.2 Cu, NaCl ve Cu+NaCl karışımlarının etkisine bırakılan <i>Spirulina</i> sp.'nin biyomas miktarları.....	26
Şekil 4.3 Cu, NaCl ve Cu+NaCl karışımlarının etkisine bırakılan <i>Spirulina</i> sp.'nin bakır ve potasyum derişimleri.....	28
Şekil 4.4 Cu, NaCl ve Cu+NaCl karışımlarının etkisine bırakılan <i>Spirulina</i> sp.'nin klorofil-a miktarları.....	30
Şekil 4.5 Cu, NaCl ve Cu+NaCl karışımlarının etkisine bırakılan <i>Spirulina</i> sp.'nin karoten miktarları.....	32
Şekil 4.6 Cu, NaCl ve Cu+NaCl karışımlarının etkisine bırakılan <i>Spirulina</i> sp.'nin prolin miktarları.....	34
Şekil 4.7 Cu, NaCl ve Cu+NaCl karışımlarının etkisine bırakılan <i>Spirulina</i> sp.'nin MDA miktarları.....	36

ÇİZELGE LİSTESİ

		Sayfa No
Çizelge 1.1	Tuz stresine cevapta biriktirilen ürünler ve bunların toleranstaki fonksiyonları.....	12
Çizelge 3.1	<i>Spirulina</i> sp.'nin sistematığı.....	18
Çizelge 3.2	<i>Spirulina</i> sp.'ye uygulanan Cu, NaCl ve bunların karışımları.....	19
Çizelge 3.3	<i>Spirulina</i> besin ortamı.....	19

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ABS	: Absorbans
APX	: Askorbat peroksidaz
BHT	: Bütillenmiş hidroksi toluen
Ca	: Kalsiyum
Cu	: Bakır
GR	: Glutasyon redüktaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HCl	: Hidroklorik asit
Hg	: Cıva
HNO ₃	: Nitrik asit
K	: Potasyum
KA	: Kuru ağırlık
KAT	: Katalaz
μ	: Mikro
M	: Molar
MDA	: Malondialdehit
Mg	: Magnezyum
NaCl	: Sodyum klorür
nm	: Nanometre
O ₂ ⁻	: Süperoksit
OH ⁻	: Hidroksil radikal
Pb	: Kurşun
PC	: Fitoşelatin
POD	: Peroksidaz
ppm	: Milyonda bir kısım
PSI	: Fotosistem I
PSII	: Fotosistem II

SOD : Süperoksit dismutaz
TBA : Tiyobarbiturik asit
TBARS : Tiyobarbiturik asit reaktif maddeler
TCA : Trikloro asetik asit
YA : Yaş ağırlık
Zn : Çinko

BÖLÜM I

GİRİŞ

İnsan, varoluşundan günümüze doğada üstünlük kurmaya yönelik arayışlar içine girmiş, bilim ve teknik imkanların yaygın bir şekilde kullanımı ile birlikte doğa sınırsızca kullanılmıştır. Bunun sonucu olarak insan, içinde yaşadığı çevre ile arasında varolması gereken uyumu bozmuştur. Çevrenin canlı yaşamını etkileyecek şekilde bozulması bir anda ortaya çıkmamış, zaman içinde birikerek ortaya çıkmıştır. Çünkü doğanın kendini yenileme yeteneği uzun bir süre olumsuz şartları düzeltmiş, ancak kirlilik düzeyinin yenilenme yeteneğinin üzerine çıkması ile çevre bozulmaya başlamıştır. Hava, su ve toprağın kirlenmesi ile birlikte kirlilik unsurları besin zinciri ile çeşitli düzeylerde bitki ve hayvan topluluklarına taşınmış ve onların yaşamlarını tehdit eder bir hal almıştır. Hızlı nüfus artışı, kırsal alandan kentlere göçün artışı ve sanayileşme, kirlenmenin yaygınlaşması ve artmasına neden olmuştur (Özata vd., 1999).

Çevre, organizmanın gelişmesini ve davranışlarını etkileyen çok yönlü bir ortam olup, biyolojik çevre (bitki, hayvan vb.), fiziksel çevre (toprak, su, sıcaklık vb.) ve sosyal çevre (insanın yaşadığı toplum) olmak üzere üç ana parametreden oluşur. İnsan, varoluşundan itibaren çevreyi kendi istekleri doğrultusunda kullanmış ve değiştirmiştir. Nüfusun hızla artışı ve sanayinin hızlı gelişimi çevre sorunlarını gündeme getirmiş; nehirlere, göllere, denizlere arıtılmadan akıtılan bol miktardaki evsel ve sanayi atıkları çevrenin aşırı kirlenmesine neden olmuştur. Diğer taraftan su ve karasal ekosistemler bilinçsiz ve aşırı kullanılarak önemli ölçüde zarar görmüştür. Tüm bunların sonucu olarak dünya aşırı ve hızlı bir şekilde kirlenmiştir (Özata vd., 1999).

Antik çağlarda metal cevherlerin işlenmeye başlandığından beri metaller insan faaliyetleri sonucu olarak doğal çevrimler dışında atmosfere, hidrosfere ve pedosfere yayılmaya başlamışlardır. Yüzyıllar boyunca insanlar ağır metalleri takı, silah, su borusu vb. çeşitli amaçlar için kullanmışlardır. Sanayileşme ile birlikte ağır metal

içeren kömürlerin yakılmaya başlanması ile endüstri bölgelerindeki ağır metal kirliliği aşırı boyutlara ulaşmış ve ağır metal kirliliğinden kaynaklanan ilk tanımlanan zehirlenmeler Japonya’da ortaya çıkmıştır (Kahvecioğlu vd., 2003).

Ağır metaller, su kaynaklarına; endüstriyel atıklar veya asit yağmurlarının toprağı ve dolayısı ile bileşimde bulunan ağır metalleri çözmesi ve çözünen ağır metallerin ırmak, göl ve yeraltı sularına ulaşmasıyla geçerler. Ağır metallerin ekolojik sistemde yayılımları dikkate alındığında doğal çevrimlerden daha çok insanın neden olduğu etkiler nedeniyle çevreye yayılımı söz konusu olduğu görülmektedir. Sürekli ve kullanıma bağlı kirlenmenin yanı sıra kazalar sonucu da ağır metallerin çevreye yayılımı önemli miktarlara ulaşabilmektedir (Kahvecioğlu vd., 2003).

Toprak, su ve hava kirliliğine ağır metallerin büyük katkısı vardır. Endüstriyel faaliyetler, motorlu taşıtların egzoz gazları, maden yatakları ve işletmeleri, volkanik faaliyetler, tarımda gübreleme ve ilaçlama gibi pek çok etken ağır metal kirliliğinin nedenleri arasında yer alır (Zengin ve Munzuroğlu, 2004).

Ağır metallerin çevreye yayılımında etken olan en önemli endüstriyel faaliyetler çimento üretimi, demir çelik sanayi, termik santraller, cam üretimi, çöp ve atık çamur yakma tesisleridir. Havaya bırakılan ağır metaller, sonuçta karaya ve buradan bitkiler ve besin zinciri yoluyla da hayvanlara ve insanlara ulaşırlar, aynı zamanda hayvan ve insanlar tarafından havadan aerosol olarak veya toz halinde solunurlar. Ağır metaller endüstriyel atık suların içme sularına karışması yoluyla veya ağır metallerle kirlenmiş partiküllerin tozlaşması yoluyla da hayvan ve insanlar üzerinde etkin olurlar (Kahvecioğlu vd., 2003).

1.1. Ağır Metaller

Ağır metal terimi genel olarak yoğunluğu 5 g/cm^3 ’ten yüksek olan metaller için kullanılır. Bu gruba başta kurşun, kadmiyum, krom, demir, kobalt, bakır, nikel, civa ve çinko olmak üzere 60’tan fazla metal dahildir (Prasad, 2004).

Metaller yer kürede doğal olarak bulunurlar ve metallerin çoğu küresel ekosistemin gerekli bileşenleridir. Metaller çevrede geniş bir oksidasyon durumu ve koordinasyon sayısı aralığında bulunurlar. Bu farklılıklar onların toksisitesi ile ilgilidir (Pinto vd., 2003). Bakır ve çinko gibi bazı metaller yaşam için gerekli iken

kurşun ve cıva gibi metallerin gerekli bir biyokimyasal fonksiyonu yerine getirdiği bilinmemektedir (Allan, 1997).

Ağır metallerin doğaya yayılımları dikkate alındığında çok çeşitli sektörlerden farklı işlem kademelerinden biyosfere ağır metal yayılımının gerçekleştiği bilinmektedir. Atık sularda bulunan ağır metallerin önemli bir miktarı arıtma çamurlarında bulunurlar. Çözünmüş kısımlar ise yüzey suları ve denizlere ulaşarak bu bölgelerde kalırlar. Buralardan ağır metaller tekrar mobilize olarak içme sularına ve besin zincirine ulaşabilirler (Kahvecioğlu vd., 2003).

1.2. Bakır (Cu)

Periyodik tablonun 1B grubu, 4. periyodunda yer alan yumuşak, kırmızı renkli bir geçiş elementidir. Oldukça dayanıklı bir metal olan bakır kolaylıkla işlenebilir olması nedeniyle yüzyıllardan beri çeşitli aletlerin yapımında kullanılmıştır. Elektrik iletkenliği çok iyi olduğundan dolayı üretilen bakırın büyük bir kısmı elektronik alanında kullanılmaktadır. Bakırın takriben % 80'i elektrik/elektronik sektöründe, kalan % 20'si ise pirinç, bronz vb. alaşım halinde genelde makina sektöründe; boru ve içi boş profil halinde ısı eşanjörlerinde ve mobilya sanayisinde, levha halinde inşaat ve makina sektöründe kullanıldığı söylenebilir.

Bakır elementi M.Ö. 5000 yılından beri tanınmaktadır ve adını ilk bulunduğu yer olan Kıbrıs'ın latinesinden (aes cyprium=Kıbrıs cevheri, cyprium ve daha sonra Cuprum) almıştır. İlk kez Mısırlılar tarafından üretilen bakır, M.Ö. 3000 yılından itibaren (Bronz Çağı) Anadolu, Yunanistan ve Hindistan'da mekanik özellikleri alaşımlandırma yolu ile artırılarak kullanılmıştır. Doğada 200'den fazla bakır minerali bulunmakla beraber sadece 20 tanesi bakır cevheri olarak endüstriyel öneme sahiptir ve dünya bakır rezervlerinin % 68'i Şili, ABD, Rusya, Zambiya, Peru, Zaire ve Kanada'da; % 32'si ise diğer ülkelerde olmak üzere yaklaşık 650×10^6 ton olarak tahmin edilmektedir. Yıllık üretim miktarı, 14 milyon ton (2001 yılı) civarındadır (Kartal vd., 2004).

Bakır genel kimyasal özelliklerinden dolayı doğaya yayılımı açısından atmofil (hava sever) grupta yer almasına rağmen, havada bulunan bakır konsantrasyonu üretim yapan sanayi birimine uzaklığına bağlıdır. Bakır lithofil (kaya sever) elementler gibi suda çözünerek geniş bir alana dağılıbilir. Bu nedenle de çevresel açıdan iki grubun

arasında değerlendirilir. Atmosfere yayılan bakırın ancak % 1'i biyolojik kullanılabilir iyon halinde kalırken diğer kısım sedimente olarak çökelir (Kartal vd., 2004).

Tarımsal kesimlerde havadaki ortalama bakır konsantrasyonu 5-50 ng/m³ iken endüstriyel kirletilmemiş bölgelerdeki deniz suyundaki bakır konsantrasyonu 0.15 µg/l ve tatlı suda ise 1-20 µg/l'dir. Doğal suların pH değerine bağlı olarak çözünürlük sınırındaki azalma sonucu suların dibinde çökelir ve doğal yeraltı tatlı suların çökeleklerinde yaklaşık 16-5000 mg/kg (kuru ağırlık; KA) arasında ve deniz dibinde ortalama 2-740 mg/kg (KA) bakır bulunur. Kirletilmemiş toprakta bakır konsantrasyonu ortalama 30 mg/kg (sınır değeri 2-250 mg/kg) seviyelerindedir.

1.2.1. Bakır Klorürün Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Kimyasal formülü: CuCl₂

Molar ağırlığı: 134.5 g/mol

Yoğunluk: 2.54 g/cm³ (20 °C)

pH: 3.0-3.8 (50 g/L 20 °C)



Şekil 1.1. Bakır klorürün fiziksel görünümü

1.2.2. Bakırın Önemi

Bakır, birden fazla oksidasyon durumunda bulunduğundan dolayı bitkilerde çoğu fizyolojik süreçlerde yer alan gerekli bir redoks aktif geçiş metalidir. Fizyolojik şartlar altında bakır, Cu^{2+} ve Cu^+ olarak bulunur. Bakır, bazı düzenleyici proteinlerde yapısal bir element olarak bulunur ve fotosentetik elektron transportu, mitokondrial respirasyon, oksidatif stres yanıtı, hücre duvar metabolizması ve hormon sinyalizasyonuna katılır (Marschner, 1995; Raven vd., 1999).

Bakır iyonu, süperoksit dismutaz (SOD), sitokrom C oksidaz, lakkaz, plastosiyanin ve polifenol oksidaz gibi çoğu enzim için kofaktör olarak hareket eder. Hücresel seviyede bakır, transkripsiyon, oksidatif fosforilasyon ve demir mobilizasyonunda da önemli bir rol oynar. Bu nedenlerden dolayı bakır, bir element olarak normal bir büyüme ve gelişme için gerekir (Yruela, 2005).

Bakır önemli bir element yapan redoks potansiyeli, toksisitesine de katkıda bulunur. Cu^{2+} ve Cu^+ arasındaki redoks döngüsü, sonucunda DNA, lipid, protein ve diğer biyomoleküllere hasar meydana getiren oldukça toksik hidroksil radikallerinin üretimini katalize eder (Halliwell ve Gutteridge, 1984). Bundan dolayı bakır, yüksek konsantrasyonlarda kloroz, nekroz ve kök gelişiminin inhibisyonu gibi oldukça toksik semptomlara neden olur.

Hücresel seviyede toksisite, proteinlerin sülfidril gruplarının bağlanmasından (ki bu enzim aktivitesini ya da protein fonksiyonunu inhibe eder), diğer gerekli iyonların eksikliğinin indüksiyonundan, hücre transport süreçlerinin bozulmasından ve oksidatif hasardan kaynaklanır (Van Assche ve Clijsters, 1990; Meharg, 1994). Yine de eksikliği ya da fazlalığında bakır, bitkilerde önemli fizyolojik süreçlerin etkilenmesiyle bitki büyüme ve gelişiminde bozukluklara neden olabilir. Özellikle fotosentetik elektron transportu hem bakır eksikliği hem de fazlalığı durumlarında değişir. Bundan dolayı sağlıklı bitki büyüme ve gelişimi için bakır mutlaka alınması gereken bir elementtir (Yruela, 2005).

1.2.3. Bakır Eksikliği

Bakır konsantrasyonu hücrelerde düşük seviyelerde tutulmalıdır. Çünkü bu element yüksek redoks özelliklerinden dolayı oldukça toksiktir. Bitki dokularında ortalama

bakır içeriği 10 µg/g (KA) dır (Baker ve Senef, 1995). Besi ortamında kritik serbest bakır konsantrasyonu 10^{-14} ile 10^{-16} M aralığında değişir.

Bakır eksikliği olan bitkiler bir dizi genin ekspresyonunda ve kök, yaprak yapısında olduğu gibi bazı morfolojik değişikliklerin aktivasyonunda farklılıklar gösterir. Bakır eksikliğinin tipik semptomları öncelikle genç yaprakların uç kısımlarında, sonra yaprak tabanına inerek kendilerini gösterirler. Yapraklarda Şekil bozukluğu, kloroz hatta nekroz da gözlenebilir (Marschner, 1995). Bakır eksikliğinin fotosentezde bakırın esas hedef bölgesi olan plastosiyanin oluşumunu azaltmasından dolayı fotosistem I (PS I) elektron transportunu azalttığı bulunmuştur (Baszynski vd., 1978).

Bakır eksikliği olan bitki kloroplastlarında da fotosistem II (PS II) aktivite eksikliği gözlenir. Őiddetli bakır eksikliği tilakoid membranda değişiklikler meydana getirir ve PSII akseptör bölgesini modifiye eder (Droppa vd., 1987). Bakır eksikliği olan bitkilerde pigment içeriğinin azalması (klorofil ve karotenoid), plastokinon sentezinin düşüşü ve daha az doymamış yağ asit içeriğinin yanında kloroplast tilakoid membranında bozulmalar gözlenir (Baron vd., 1992).

1.2.4. Bakır Toksisitesi

Bazı yerlerde bakır doğal olarak toksik seviyelerde bulunmasına karşın diğer bazı yerler, insanların ağır metalleri çeşitli yollarla (madencilik, endüstri, tarım vb.) çevreye bırakmaları sonucu yüksek seviyelerde bakır içerebilir (Yruela, 2005). Optimal konsantrasyonundan daha yüksek bakır konsantrasyonları büyümeyi inhibe eder ve fotosentez, solunum gibi önemli hücrenel süreçleri aksatır (Marschner, 1995; Prasad ve Strzalka, 1999). Yüksek seviyelerde bakır içeren yerlerde yaşayan bitkilerde düşük biyomas ve klorotik semptomlar görülür. Aynı zamanda yapraklarda daha düşük klorofil ve kloroplast içeriği, tilakoid membran yapısında değişmeler bulunmuştur (Baszynski vd., 1988).

Bakırın yüksek seviyeleri fotosentetik membranların pigment ve protein kompozisyonlarını modifiye etmiştir (Lidon ve Henriques, 1991; Maksymiec vd., 1994). Bunun yanında lipid peroksidasyonu, lipid içeriğinde azalma ve tilakoid membran yağ asidi kompozisyonunda değişmeler gözlenmiştir (Sandmann ve Böger, 1980; Luna vd., 1994). Bu gibi modifikasyonlar sonucu PS II membranda değişimler bulunmuştur (Quartacci vd., 2000).

Bakır gibi geçiş metallerinin süperoksit radikal ve hidrojen peroksit arasındaki enzimatik olmayan reaksiyonlardan (Haber-Weiss reaksiyonu) meydana gelen hidroksil radikallerinin oluşumunu katalize ettiği bilinmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1984). Yüksek miktarda bakır varlığı oksidatif strese neden olabilir ve daha sonra oldukça toksik serbest oksijen radikallerinin üretiminin artışına karşılık antioksidan savunmada artış meydana gelir.

1.3. NaCl Stresi

Tuzluluk bitki büyüme ve gelişimini sınırlayan en önemli çevresel etmenlerden biridir. Yüksek tuzluluğun bitkiler üzerindeki zararlı etkileri bitkinin ölümü ve/veya üretimin düşmesi şeklinde gözlenebilir. Birçok bitki türü ya hücrelerine tuzu almayarak ya da tuzu hücre içinde tolere edecek mekanizmalar geliştirerek tuzun zararlı etkilerinden korunmaya çalışırlar. (Parida ve Das, 2005).

Tuz stresi etkisinde fotosentez, protein sentezi, enerji ve lipid metabolizması olumsuz etkilenir. Esas anlamda tuz stresine ilk cevap yaprak yüzey alanının büyümesinde azalma şeklinde kendini gösterir. Hücre büyümesi için gerekli olan karbohidratlar fotosentez esnasında sağlanır. Fotosentez oranları bitki tuz stresi (özellikle NaCl stresi) altında iken genelde düşüktür. Tuz stresi biyolojisi ve bitkilerin yüksek tuza karşı gösterdikleri tepkiler geçen yirmi yıl boyunca araştırmacılar tarafından tartışılmıştır. Bu araştırmalarda tuz stresinin fizyolojik ve biyokimyasal etkileri ile bitkilerin tuz stresine karşı göstermiş oldukları tolerans mekanizmaları detaylı olarak araştırılmıştır (Parida ve Das, 2005).

1.3.1. Tuz Tolerans Mekanizması

Bitkiler, tuz stresinin üstesinden gelmek için değişik moleküler ve biyokimyasal mekanizmalar geliştirmiştir. Biyokimyasal yollar tuz stresinin geliştirdiği eklemeli ve muhtemelen sinerjistik olarak etki eden ürünlere ve süreçlere etki yapar (Iyengar ve Reddy, 1996).

Biyokimyasal stratejiler (1) kabul etmeme, (2) kökler tarafından iyon alınımının kontrolü ve yapraklara transportu, (3) hücrenel ve tüm bitki düzeyinde iyonların kompartimentalizasyonu, (4) uyumlu bileşiklerin sentezi, (5) fotosentetik yolda

değişme, (6) membran yapısında değişme, (7) antioksidan enzimlerin indüklenmesini ve (8) bitki hormonlarının indüksiyonunu içerir (Parida ve Das, 2005).

Tuz tolerans mekanizmaları basit ya da karmaşık olabilir. Basit mekanizmalar biyokimyasal yolların farklılaşması şeklinde oluşur. Yüksek komplekslik gösteren mekanizmalar ise fotosentez ve respirasyonda (Botella vd., 1994); kromatin ve kromozom yapısında meydana gelen önemli süreçlerdeki değişiklikleri kapsar (Walbot ve Cullis, 1985).

1.3.2. İyon Düzenlenmesi ve Lokalizasyonu

Bitkilerde iyon alınımı ve lokalizasyonunun düzenlenmesi tuzlu koşullarda daha da önem kazanır (Adams vd., 1992). Gerek glikofit (tuz tolerant olmayan bitki) gerekse halofit (tuz tolerant olan bitki) bitkiler sitoplazmada yüksek miktarlarda tuzu tolere edemezler. Bu nedenle aşırı tuzu ya vakuolde tutarlar ya da farklı dokularda metabolik fonksiyonlarda kullanmak için lokalize ederler (Iyengar ve Reddy, 1996). Glikofitler sodyum alınımını sınırlandırır ya da yaşlı dokuları depo komponenti gibi kullanarak sodyumu biriktirirler (Cheeseman, 1988).

Sitoplazmadan sodyumun uzaklaştırılması ya da vakuollerde lokalizasyonu tuzun indükleyebildiği bir enzim olan Na^+/H^+ antiporter tarafından yapılır (Apse vd., 1999). Vakuolar tip H^+ -ATPaz (V-ATPaz) ve vakuolar pirofosfataz (V-PPaz) vakuolar membranda birlikte bulunurlar (Dietz vd., 2001). V-ATPaz bitki hücrelerinde bulunan birincil H^+ pompasıdır.

1.3.3. Uyuşabilir Bileşiklerin Biyosentezi

Vakuoldeki iyonik dengeyi sağlamak üzere sitoplazmada normal bitki metabolizmasıyla etkileşmeyen ve uyuşabilir bileşikler olarak adlandırılan düşük moleküler ağırlıklı bileşikler sentezlenebilmektedir (Çizelge 1.1.). Bunlar biyokimyasal reaksiyonlarda suyun yerini alırlar (Ford, 1984). Bu uyuşabilir bileşikler prolin (Singh vd., 2000), glisin betain (Wang ve Nil, 2000), karbohidratlar (Bohnert ve Jensen, 1996) ve polioller (Ford, 1984)'dir.

Polioller, düşük moleküler ağırlıklı şaperonlar ve stres tarafından oluşturulmuş reaktif oksijen radikallerinin temizlenmesinde görev yapan uyuşabilir bileşiklerdir (Smirnoff ve Cumbes, 1989). Polioller siklik (örneğin pinitol) ve asiklik (örneğin

mannitol) olarak sınıflandırılır. Bir alkol şekeri olan ve tuz stresinde uyuşabilir bir çözünen olan mannitol, kerevizde mannoz-6-fosfat redüktaz enziminin etkisiyle sentezlenir (Zhifang ve Loescher, 2003). Pinitol, ononitol epimeraz ve inositol-0-metiltransferaz enzim serileri yoluyla miyo-inositolden sentezlenir (Bohnert ve Jensen, 1996). Polioller ozmotik ayarlama ve ozmoprotektan olarak işlev yaparlar. Ozmotik ayarlama sitoplazmada suyun alkonmasını kolaylaştırıcı ozmolitler olarak ve sodyumun apoplast ve vakuollerde tutulmasını sağlayacak şekilde işlev yaparlar. Ozmolitler protein kompleksler, membranlar veya enzimler ile etkileşerek hücrel yapıları korumaktadırlar (Crowe vd., 1992).

Glukoz, fruktoz, sukroz, fruktanlar ve nişasta gibi karbohidratlar tuz stresi altında biriktirilirler (Parida vd., 2002). Bunların önemli fonsiyonları ozmotik koruma, ozmotik ayarlama, karbon depolama ve radikal temizlemedir. Tuz stresinin birçok bitkide indirgen şekerleri (glukoz, fruktoz), sukroz ve fruktanları artırdığı rapor edilmiştir (Kerepesi ve Galiba, 2000). Buna karşın *Vicia faba*'da tuz stresi çözülebilir ve hidrolize olabilir karbohidratları azaltmıştır (Gadallah, 1999). *Bruguiera parviflora*'da ise tuz stresi altında yetiştirildiğinde yapraklarda indirgen olan ve olmayan karbohidratların arttığı, nişasta miktarlarının ise azaldığı gösterilmiştir (Parida vd., 2002).

Bitkiler tuz stresi altında azot içeren bileşikleri de biriktirirler. Azot içeren bileşiklerin en önemlileri aminoasitler, amidler, proteinler, kuaterner amonyumlu bileşikler ve poliaminlerdir. Spesifik azot içeren bileşikler bitkilerin değişik gruplarında tuzlu ortamlarda biriktirilirler. Stres şartlarında bu bileşikler ozmotik ayarlama, makromoleküllerin korunması, azot depolanması, hücrel pH'nın korunması, detoksifikasyonun ve serbest radikallerin temizlenmesinde işlev yapmaktadırlar (Çizelge 1.1.). Bu bileşiklerin birikimi genellikle tuz stresi ile korelasyon gösterir (Mansour, 2000). Tuz stresi etkisinde bırakılan bitkilerin serbest aminoasit ve diğer azot içeren bileşiklerin birikimi ile ilgili birçok rapor vardır. Glisin betain içeriği birçok bitkide tuz stresinde artmıştır (Khan vd., 1999; Muthukumarasamy vd., 2000; Wang ve Nil, 2000).

Birçok bitki tuzlu şartlarda toksik olmayan ancak koruyucu ozmolit olarak görev yapan prolini biriktirir (Muthukumarasamy vd., 2000; Singh vd., 2000). NaCl uygulanan buğday çeşitlerinde toplam aminoasitlerin % 55'ini oluşturan ve en fazla

bulunan aminoasitlerden sistein, arjinin ve methionin azalırken, valin, izolösin, aspartik asit ve prolin miktarları ise değişik oranlarda artışlar göstermiş, toplam aminoasit miktarındaki artış kontrole göre 16 kat daha fazla olmuştur (Elshintinawy ve Elshourbagy, 2001). *Pringlea antiscorbutica*'nın kök, gövde ve yapraklarında NaCl etkisinde prolin akümülyasyonu olmuştur. Bu ozmolitin birikiminin sitoplazmada vakuollerden 2-3 kat daha fazla olduğu rapor edilmiştir (Aubert vd., 1999).

Prolin, kuaterner amonyum ve sülfonyumlu ozmolitler fizyolojik pH'da zwitter iyonu karakterindedir. Bu bileşikler iyonik olmasına karşın net bir yüke sahip değildirler (Parida ve Das, 2005). Uyuşabilir bileşikler hücre içi biyokimyayı bozmadan yüksek miktarlarda biriktirilebilirler. Bu bileşikler tuz stresi altında enzimlerin normal aktivite gösterebilmesi için koruyucu rol oynamaktadırlar. Bu bileşiklerin pH (ya da sitoplazmanın yük dengesine) veya organellerin lümenal bileşenlerine önemli etki yapmadığı düşünülmektedir (Rhodes ve Hanson, 1993).

1.3.4. Antioksidan Enzimlerin İndüksiyonu

Tuz stresi hücresel düzeydeki mevcut suyun osmotik olarak bağlanmasına ve bitkilerin fizyolojik olarak karışıklığa girmesine neden olur (Cheeseman, 1988). Su yetersizliği süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikal (OH^{\cdot}) (Halliwell ve Gutteridge, 1985) ve singlet oksijen (Elstner, 1987) gibi reaktif oksijen türlerinin sitoplazmada hızlı artmasına yol açar. Bu sitosolik aktive edilmiş oksijen türleri lipidler (Fridovich, 1986; Wise ve Naylor, 1987), protein ve nükleik asitlerde (Imlay ve Linn, 1988) oksidatif hasarlanma yoluyla normal metabolizmayı ciddi bir biçimde bozabilir. İnternal O_2 konsantrasyonları fotosentez sırasında yüksek olduğundan (Steiger vd., 1977) kloroplastlar genellikle aktive edilmiş oksijen türlerini üretme eğilimindedirler (Asada ve Takahashi, 1987). Süperoksit üretildiğinde H_2O_2 ve su oluşturmak için enzimatik ya da enzimatik olmayan süreçlerle hızlı bir şekilde parçalanır (Imlay ve Linn, 1988).

Bitkiler reaktif oksijen türlerine çeşitli seviyelerde antioksidanlarla karşı koyarlar. Metalloenzim süperoksit dismutaz, süperoksidi H_2O_2 'ye dönüştürür. Katalaz (KAT) ve çeşitli tipteki peroksidazlar H_2O_2 'nin bozulmasını katalizler (Chang vd., 1984). Katalaz kloroplastlarda olmadığından dolayı bu organelde hidrojen peroksit

askorbata spesifik peroksidazlarla askorbat-glutasyon döngüsü boyunca detoksifikasyona uğratılabilir (Chen ve Asada, 1989; Asada, 1992). Askorbat ve glutasyonun her ikisinin de kloroplastlarda milimolar düzeylerde olduğu rapor edilmiştir (Halliwell, 1982). Askorbat, okside α -tokoferolün α -kromoksil radikalinin bir indirgeyicisi gibi işlev yaparak ya da süperoksit radikali ile doğrudan reaksiyona girme yoluyla da detoksifiye edebilir (Foyer vd., 1991). Tilakoid membranlar α -tokoferol bakımından zengindir. Bu antioksidan sadece süperoksitle reaksiyona girmez, bunun yanında hidroksil, peroksil ve alkoksil radikallerinin temizlenmesine de yardımcı olur (Halliwell, 1987).

Yapılan birçok çalışmada antioksidan enzimlerden KAT, SOD, askorbat peroksidaz (APX), guaikol peroksidaz ve glutasyon redüktaz (GR) aktivitesinin tuzlu koşullarda yetişen bitkilerde arttığı gösterilmiştir (Kennedy ve De Fillippis, 1999) (Çizelge 1.1.).

Bu çalışmada bakır klorür, sodyum klorür ve bunların karışımlarının *Spirulina* sp.'de meydana getirdiği bazı fizyolojik etkilerin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu kasmamda *Spirulina* sp.'nin büyüme oranı, Cu ve K derişimi, biyomas, klorofil-a, karoten, prolin ve MDA miktarları araştırılmıştır.

Çizelge 1.1. Tuz stresine cevapta biriktirilen ürünler ve bunların toleranstaki fonksiyonları (Parida ve Das, 2005)

Ürün grubu	Spesifik bileşik	Fonksiyonları
İyonlar	Sodyum, Klor	Potasyum engellemesi/ taşınımı
Proteinler	Ozmotin; SOD/KAT	Patojenlere ilgili proteinler; Ozmotik koruma Radikal detoksifikasyonu
Aminoasitler	Prolin; Ektoin	Ozmotik koruma Ozmotik ayarlama
Karbohidratlar	Glukoz, Fruktoz Sukroz; Fruktanlar	Ozmotik koruma, Osmotik ayarlama, karbon depolama
Polioller	Mannitol; Pinitol	Ozmotik ayarlama, karbon depolama; Radikal temizleme, ozmotik koruma ve ayarlama
Poliaminler	Spermin, Spermidin	İyon balansı, kromatin korunması
Kuaterner aminler	Glisin betain β -Alanin betain Kolin- <i>o</i> -sülfat	Ozmotik koruma, tilakoid ve plazma zarı bütünlüğünün korunması Ozmotik koruma Ozmotik koruma
Pigmentler	Karotenoidler, Antosiyaninler, Betalaninler	Fotoinhibisyona karşı koruma

BÖLÜM 2

LİTERATÜR ÖZETLERİ

2.1. Bakır Stresi İle İlgili Çalışmalar

Wu vd. (1998) *Chlorella* sp. ile yaptıkları bir çalışmada toksik seviyede bakır iyonları altında algin prolin akümüle ettiğini belirlemişlerdir.

Wu vd. (1998) *Anacystis nidulans* ile yaptığı başka bir çalışmada dışarıdan prolin uygulanmasının membranda potasyum sızıntısında düşüşe neden olduğunu ve bu etkinin bakır toksisitesinin azaltılmasından sorumlu olabileceğini ortaya koymuştur.

Mehta ve Gaur (1999) *Chlorella vulgaris* ile yaptıkları bir çalışmada yüksek miktarda bakır derişimi uygulanan alglerin bu metali intraselüler olarak biriktirdiğini belirlemişlerdir. Bu bilim adamları dış ortamda ya da hücre içinde metal derişimine bağlı olarak serbest prolin birikiminin olduğunu da saptamışlardır. Artan metal birikimi ile alg hücrelerinde intraselüler prolin miktarı da artmıştır.

Mamboya (2001) kahverengi bir makroalg olan *Padina boegesenni* ile yaptığı bir çalışmada alge 25, 50, 100 ve 500 ppb bakır uygulaması yapmış ve artan bakır derişimi ile algin gelişiminde önemli bir düşüş gözlemiştir.

Surosz ve Palinska (2004) mavi-yeşil bir alg olan *Anabaena flos-aquae* ile yaptıkları bir çalışmada 0.35 ppm bakır uygulanmasının algin gelişimini geriletmediğini ve artan bakır derişimi ile algin klorofil-a miktarının azaldığını belirlemişlerdir.

Nalimova vd. (2005) yaptıkları bir çalışmada bakır uygulanan *S. platensis* hücrelerinin kontrole göre 10 kat daha fazla bakır akümüle ettiğini bulmuştur.

Srivastava vd. (2005) *A. doliolum* ile yaptığı bir araştırmada bakırın algde oksidatif strese yol açtığını ve antioksidan savunma sisteminde değişikliklere yol açtığını ortaya koymuştur. Benzer sonuçlar *S. platensis* (Choudhary vd., 2007) ve

Chlamydomonas reinhardtii (Siripornadulsil vd., 2002) ile yapılan başka çalışmalardan da elde edilmiştir.

Solisio (2006) kuru ve tekrar sulandırılmış *S. platensis* ile yaptığı bir çalışmada algin sudan bakır biriktirmesine bakmıştır. Çalışma sonucunda yüksek miktarda tekrar sulandırılmış alg biyomasının % 91 oranında bakırı aldığı bulunmuştur. Kuru alg biyoması ile karşılaştırıldığında tekrar sulandırılmış alg biyomasının daha yüksek bir bakır alım yüzdesine sahip olduğu belirlenmiştir.

Choudhary vd. (2007) *S. platensis* ile yaptıkları bir çalışmada ağır metallerin prolin üzerine etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda test mikroorganizmalarının gelişiminde bir düşüş olmasına rağmen kültür ortamında metal derişimine bağlı olarak alglerin prolin miktarlarında artışlar belirlemişlerdir.

2.2. NaCl Stresi ile İlgili Çalışmalar

Vonshak vd. (1988) *S. platensis* ile yaptıkları bir çalışmada artan NaCl derişimi ile alg gelişiminde ani bir düşüş belirlemişlerdir. Aynı çalışmada NaCl stresinin alg gelişimini geriletği *Anacystis* ve *Nostoc* gibi diğer mavi-yeşil alglerde de gösterilmiştir.

Kebede (1997) *S. platensis* ile yaptığı bir çalışmada tuz stresinin algde klorofil miktarını azalttığını ortaya koymuştur.

Rout ve Shaw (2001) tuzluluğa farklı düzeylerde tolerans gösteren sucul makrofitlerden *Hydrilla verticillata*, *Najas indica* ve *Najas gramenia*'da deniz suyu ve saf NaCl'nin hücre içi Na, K, Mg ve Ca miktarları ile fotosentetik pigmentlere etkilerini araştırmışlardır. NaCl tuzluluğuna hassas makrofit *H. verticillata* ve orta düzeyde tolerant *N. indica*'da klorofil/karotenoid oranlarında önemli düzeylerde düşüşler belirlenmiştir. Ancak tuza tolerant *N. gramenia*'da böyle bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Hücre içi Na derişimlerinin hem deniz suyu hem de NaCl uygulamaları sonucunda önemli miktarlarda arttığı bulunmuştur. Her iki tuz uygulamasında makrofitlerdeki K derişimleri, *N. gramenia* hariç, diğer iki türde azalmıştır.

Murphy vd. (2003) sucul makrofitlerden *Ruppia maritima* L. ile yaptıkları bir çalışmada bitkinin yüksek tuzlu ortamlarda toplam karbohidrat miktarı kontrole göre

% 65 oranında azalmış, çözülebilir karbohidrat miktarı ise % 34 oranında artmıştır.

Panda ve Upadhyay (2003) serbest yüzücü yapraklı makrofitlerden *Lemna minor* L.'de farklı NaCl derişimlerinin (0, 50, 100 ve 200 mM) biki köklerinde meydana getirdiği oksidatif hasarlanmayı histokimyasal ve biyokimyasal olarak belirlemişlerdir. Köklerin histokimyasal analizlerine göre yüksek NaCl etkisindeki kök kesitlerinin daha fazla boyandığı, dolayısıyla membranların yapısında hasarlanma olduğu sonucuna varılmıştır. Bu bulgular tiyobarbutirik asit reaktif maddeler ve peroksit miktarındaki artışlarla da doğrulanmıştır. Tuz stresi altında makrofitin antioksidan enzimlerinden SOD, guaikol peroksidaz ve glutatyon redüktaz aktivitelerinde artışlar bulunurken, katalaz aktivitelerinde azalmalar olduğu belirlenmiştir. Ayrıca enzimatik olmayan antioksidanlardan askorbat miktarlarında da artan NaCl derişimi ile birlikte artışlar olduğu bulunmuştur.

Salerno vd. (2004) mavi-yeşil alglerden *Anabaena* sp. ile yaptıkları bir çalışmada algin sukroz ve fruktoz içeren oligosakkarit miktarlarının artan tuzlulukla birlikte arttığını rapor edmişlerdir.

Sudhir vd. (2005) yaptıkları bir çalışmada yüksek tuz stresinin *S. platensis* mikroalginde tilakoid membran proteinlerinde neden olduğu zararı araştırmışlardır. Yapılan bu çalışmada NaCl uygulamasın tilakoid membran proteinlerinin değişimine ve bazı tilakoid membran proteinlerinin azalmasına neden olduğu bulunmuştur.

Tang vd. (2007) mavi-yeşil bir alg olan *Scytonema javanicum* ile yaptıkları bir çalışmada algin NaCl stresi altında göstermiş olduğu fizyolojik ve biyokimyasal değişimleri incelemişlerdir. 50 mM NaCl uygulamasının algin gelişimini azalttığını ve MDA miktarında artış meydana getirdiğini belirlemişlerdir.

2.3. Cu ve NaCl Etkileşimi ile İlgili alışmalar

Literatürde Cu ve NaCl etkileşimi ile ilgili çalışmalar az olduğundan sınırlı sayıda çalışmaya yer verilmiştir

Alutoin vd. (2001) *Porites lutea*'nın indirgenmiş tuz ve bakır karışımına fizyolojik yanıtını incelemişlerdir. Bu iki maddenin karışımı (30 µg/l) önemli ölçüde primer üretim oranını düşürmüştür. Bunun aksine 10 µg/l bakır karışımı primer üretim

oranını etkilememiştir.

El-Enany (2002) buğday (*Triticum aestivum* L.) tohumlarını bir hafta boyunca çeşitli konsantrasyonlarda NaCl (0, 50 ve 100 mM) ile 20 ppm bakır kombinasyonunda petri kaplarında çimlendirmişlerdir. Çalışma sonucuna göre tuzluluk buğday fidelerinin bakır uygulanmasına cevabını etkilemiştir. Bakır eklenen besin solusyonu düşük ve yüksek tuz seviyelerinde fide gelişimini azaltmıştır. Bakır akümüasyonu tuzluluktan önemli şekilde etkilenmiştir. Bakır uygulaması her iki tuz seviyesinde mineral içeriğinin karışıklığına yol açmıştır.

Srivastava vd. (2005) *A. doliolum* ile yaptıkları bir araştırmada NaCl ve Cu karışımının algde oksidatif strese yol açtığını ve antioksidan savunma sisteminde değişikliklere yol açtığını ortaya koymuşlardır. Bu araştırmada stres altında MDA miktarının genel olarak arttığı ortaya konmuştur.

BÖLÜM 3

MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışma Materyali

Spirulina sp., çok hücreli, iplikli şekle sahip bir mikroalgdır. 1-12 µm çapında silindirik sarmal bir yapıya sahiptir. *Spirulina* hızla büyüeyebilen özellikte bir mikroalgdır. Çok hücreli, silindirik trikomların kendi uzunluğu boyunca heliks biçiminde dizilişi ile tanınır. Flamentleri tektir, kendi eksenini etrafında kayarak hareket eder. Spiral şekli karakteristik özelliğidir ve farklı bölgelerde farklı boyutlarda spiral çaplı türleri vardır. B₁₂, provitamin A, demir ve özellikle çok az kaynaktan bulunan dietil γ-linoleik asit içeriği bakımından çok zengindir (Borowitzka ve Borowitzka, 1992). *Spirulina* sp., yüksek karbonat ve bikarbonat seviyeleri ve pH'sı 11'i bulabilen, yüksek pH ile karakterize edilen tropikal ve subtropikal su kütlelerinde yoğun populasyon oluşturan, planktonik bir mikroalgdır. Işık mikroskobu altında, tek düzlemde ikili bölünmeye uğrayan vejetatif hücrelerden oluşan mavi-yeşil heterosistsiz flamentleri ayıran çeperler kolayca görülür. Flamentlerin genişliği 6-12 µm, uzunluğu 200-300 µm, heliks çapı ise 30-70 µm arasında değişir. Özellikle sıcaklık, fiziksel ve kimyasal koşullar gibi çevresel faktörler, heliks geometrisini etkiler. *Spirulina* hücre duvarı yapısında peptidoglikan mevcuttur ve bu nedenle bakterilere benzer. Elektron mikroskobu ile gözlenen hücresel organizasyonunda morfolojik olarak sınırlandırılmış bir nükleus ve plastid mevcut değildir ve dışta gram negatif tipte bir zara sahiptir. Zarın kalınlığı yaklaşık 0.5 mikrometredir ve lifli ağ benzeri bir yapısı vardır. Hücre duvarı üzerinde bulunan porlardan salgılanan zar materyalinin, flament hareketi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Çok tabakalı hücre duvarı incedir. Sitoplazma bölgesi esas olarak poliglukan tanecikleri ve gaz vesikülleri ile doludur. Ayrıca küçük ozmofilik granüller, fibriller ve yağ damlacıkları da vardır. Çevresel ve merkezi sitoplazma arasında yer alan tilakoid membranlar paralel olarak dizilmişlerdir ve birleşik vaziyette elektronları geçirmeyen fikobilizomları vardır. Tilakoidler, hücre duvarının

uzun kenarına paralel, filamentleri ayıran çepere ise çaprazlama uzanan düz veya bükümlü desteler olarak görünürler. Düşük elektron yoğunluğuna sahip tilakoid içermeyen alanlar ribozomlar ve DNA fibrilleri ile doludur. *Spirulina* klorofilin sadece tek formuna, klorofil-a'ya sahiptir. Ayrıca hepsinde karakteristik biliprotein pigmentleri olan, fotosentezde yakalayıcı pigment olarak fonksiyon gösteren fikobilinler mevcuttur. Fikobilinlerin bir sınıfı olan fikosiyaninler, mavi renklidir ve klorofil-a ile birlikte alge mavi-yeşil rengini verirler (Manav, 2004).

Çalışmada kullanılan *Spirulina* sp. Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesinden temin edilmiş, Gaziantep Üniversitesi Biyoloji Bölümünde çoğaltılmıştır.

Çizelge 3.1. *Spirulina* sp.'nin sistematigi.

Alem	: Plantae
Bölüm	: Cyanophyta
Sınıf	: Cyanophyceae
Takım	: Nostocales
Familya	: Oscillatoriaceae
Cins	: <i>Spirulina</i>
Tür	: <i>Spirulina</i> sp.



Şekil 3.1. *Spirulina* sp. mikroskopik görünüş ($\times 10$).

3.1.2. Stres Uygulama Çözeltileri

Araştırmada kullanılan Cu (CuCl_2 , Riedel-de Haen), NaCl (Merck) ve bunların karışımları Çizelge 3.2’de belirtilen derişimlerde hazırlanmıştır.

Çizelge 3.2. *Spirulina* sp.’ye uygulanan Cu, NaCl ve bunların karışımları.

Uygulama		
Cu (ppm)	NaCl (M)	Cu (ppm)+NaCl (M)
0.0	0.0	0.0
0.1	0.2	0.1+0.2
1.0	0.4	0.1+0.4
		1.0+0.2
		1.0+0.4

3.2. Yöntem

3.2.1. Kültür Ortamı

Spirulina sp.’yi üretmek amacıyla bu çalışmada *Spirulina* besi ortamı (Schlösser, 1982) kullanılmıştır. Ortam içeriği distile suda çözüldükten sonra 121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilizasyonu sağlanmıştır. Kültür ortamının kompozisyonu Çizelge 3.3’te verilmiştir.

Çizelge 3.3. *Spirulina* besi ortamı (Schlösser, 1982).

Solusyon A	g/l	Solusyon B	g/l
NaHCO_3	27.22	NaNO_3	5.00
Na_2CO_3	8.060	K_2SO_4	2.00
K_2HPO_4	1.000	NaCl	2.00
		$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.40
		$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.08
		PIV (ml)	12.0
		Chu (ml)	2.00

3.2.2. Deney Ortamı ve Düzenegi

Araştırmaya başlamadan önce *Spirulina* sp. besin ortamında adaptasyona bırakılmıştır. *Spirulina* sp.’nin kültüre alınması için 250 ml’lik erlenler kullanılmıştır. Bunlar dikkatli bir şekilde otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

Bakır, NaCl ve bunların kombinasyonları Çizelge 3.2.'deki belirtilen derişimlerde hazırlanmış ve erlenlere ilave edilmiştir. Daha sonra mikroalg erlenlere konulmuştur. *Spirulina* sp. alkali pH'larda iyi geliştiği için test çözeltilerinin başlangıç pH'ları 9.0 ± 0.2 düzeyine ayarlanmıştır. Çalışmalar üç tekrarlı olarak yapılmıştır. *Spirulina* sp. bir haftalık stres uygulaması sonunda hasat edilmiştir.

Deney süresi bitiminde *Spirulina* sp.'nin büyüme hızı, biyomas, fotosentetik pigment (klorofil-a, toplam karotenoid), serbest prolin, MDA miktarları belirlenmiştir.



Şekil 3.2. Deney düzeneği.

3.2.3. Büyüme Hızının Belirlenmesi

Mikroalgın büyüme hızı 560 nm'de Cintra 202 marka spektrofotometrede absorbans ölçülerek bulunmuştur.

3.2.4. Biyomas Miktarının Belirlenmesi

Belirli miktardaki mikroalg çözeltisi miliporda vakum altında süzülerek etüvde sabit ağırlığa ulaşana kadar kurutulmuş ve biyomasları kuru ağırlık üzerinden belirlenmiştir.

3.2.5. Fotosentetik Pigment Analizi

Mikroalg materyalininden 10 ml alınıp miliporda süzildükten sonra tartılmıştır. Örnekler porselen havanda 1-2 ml % 80'lik aseton ile tüm klorofil alınıncaya kadar homojenize edilmiştir. Daha sonra ekstraktın son hacmi 10 ml olacak şekilde % 80'lik asetonla tamamlanmış ve 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

Örnekler klorofil-a, klorofil-b ve total karoten için sırasıyla 662, 645 ve 470 nm'lerde spektrofotometrede asetona karşı (tanık) okunmuştur. Klorofil-a ve karoten miktarlarının hesaplamaları Lichtenthaler ve Wellburn (1985)'e göre yapılmıştır.

3.2.6. Serbest Prolin Tayini

Mikroalglerin serbest prolin miktarları Bates vd. (1973)'nin buldukları yöntemle göre belirlenmiştir.

Mikroalg materyalinden 10 ml alınıp miliporda süzülerek tartılmış ve % 3'lük 5 ml sülfosalisilik asit kullanılarak havanda homojenize edilmiştir. Homojenizat mavi bant filtre kağıdından süzümüştür. Süzüntünün 2 ml'si 2 ml asit-ninhidrin ve 2 ml glasiyel asetik asitle test tüpünde karıştırılmıştır. Bu karışım 100 °C'de 1 saat su banyosunda bekletilmiştir. Bu süre sonunda tüpler alınarak buz içerisine sokulmuş ve reaksiyon sonlandırılmıştır. Reaksiyon karışımı 4 ml toluen ile ekstrakte edilmiş ve 15-20 saniye vortekslenmiştir. Toluene içeren renkli sıvı oda sıcaklığında bekletilmiş ve 520 nm dalga boyunda Cintra 202 marka spektrofotometrede toluen tanık olarak kullanılarak okunmuştur. Mikroalglerdeki prolin miktarları ($\mu\text{mol/g}$) prolin standart derişimleri (10, 20, 30 ve 40 $\mu\text{mol/g}$) ve absorbanları arasındaki doğrusal ilişki kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.7. Malondialdehit Miktarının Belirlenmesi

Spirulina sp.'deki MDA miktarının belirlenmesi Hodges vd. (1999)'ne göre yapılmıştır.

Mikroalg materyalinden 10 ml alınıp miliporda süzülerek tartılmıştır. Örnekler % 80'lik etil alkolde homojenize edilmiş ve 3000 devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir. Analiz iki aşamada yapılmıştır. Birinci aşamada santrifügattan alınan 1 hacim ekstrakt üzerine 1 hacim % 20'lik TCA ve 1 hacim % 0.01'lik BHT eklenmiştir. İkinci aşamada ise santrifügattan alınan 1 hacim ekstrakt üzerine 1 hacim % 0.65'lik TBA içeren % 20'lik TCA ve bunun üzerine 1 hacim % 0.01'lik BHT eklenmiş ve örnekler karıştırılmıştır. Daha sonra sıcak su banyosunda (95 °C) 25 dakika inkübe edilmiş ve ardından şok soğutma yapılmıştır. Bu örnekler tekrar santrifüj edilmiş ve birinci aşama örnekleri 532 ve 600 nm'de, ikinci aşama örnekleri

ise 532, 600 ve 440 nm'de absorbans okumaları yapılmıştır. Sonuçlar aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır:

$$A = [(ABS_{532+TBA}) - (ABS_{600+TBA}) - (ABS_{532-TBA}) - (ABA_{600-TBA})]$$

$$B = [(ABS_{440+TBA} - ABS_{600+TBA}) \times 0.0571]$$

$$\text{mmol MDA ml}^{-1} = (A - B / 157\,000) \times 10^6$$

3.2.8. *Spirulina* sp.'nin Cu ve K İçeriğinin Belirlenmesi

Mikroalglerin Cu ve K miktarını belirlemek için yaş yakma metodu kullanılmıştır. Kurutularak öğütülmüş örnekler tartılıp 50 ml'lik erlenlere konmuştur. Üzerlerine 5 ml konsantre HNO₃ ilave edilmiştir. Erlenler daha sonra ısısı ayarlanabilen ısıtıcı tabla üzerinde düşük ısıda yavaş yavaş ısıtılmıştır. Daha sonra ısı biraz yükseltilmiştir. Erlenlere 5 ml HCl ilave edilerek aynı işlem yenilenmiştir. Bu işlemlerden sonra erlenler 1 N'lik 5 ml HCl ile sulandırılmıştır. Sulandırılan örneklerdeki bakır ve potasyum miktarı atomik absorpsiyon spektrometresinde (AAS, Perkin Elmer) belirlenmiştir.

3.2.9. İstatistiksel Yöntem

Bu araştırmada elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde tek yönlü ANOVA LSD testi kullanılmıştır. Bu işlemler SPSS (SPSS 13.0 for Windows) paket programı kullanılarak yapılmıştır.

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Büyüme Oranları

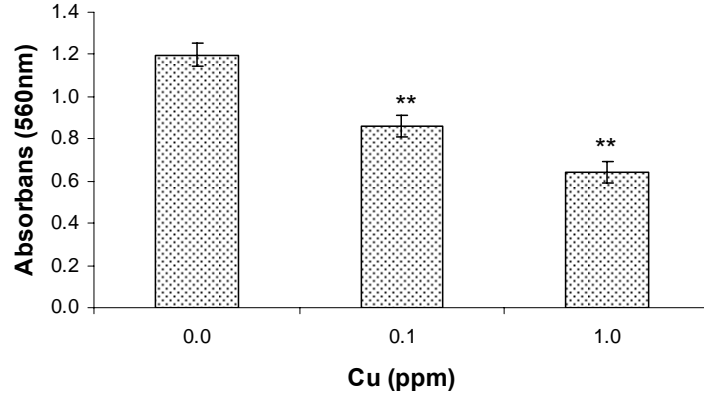
Bakır, NaCl ve Cu+NaCl kombinasyonlarının etkisine bırakılan *Spirulina* sp.'nin büyüme oranları Şekil 4.1.'de verilmiştir.

Bakır etkisine bırakılan *Spirulina* sp.'nin büyüme oranlarında bakır derişiminin artışıyla azalmalar olduğu bulunmuştur. 0.1 ve 1.0 ppm Cu derişimlerinde büyüme oranları kontrole göre sırasıyla % 28.1 ve % 46.5 düzeylerinde azalmıştır ($p<0.01$).

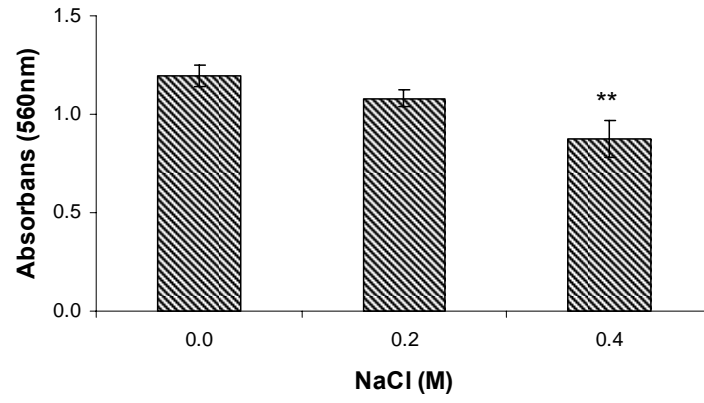
NaCl etkisine bırakılan *Spirulina* sp.'nin büyüme oranlarının artan tuz derişimiyle birlikte azaldığı bulunmuştur. 0.2 M NaCl derişimdeki azalma kontrole göre % 9.2 düzeyinde önemsiz bulunurken ($p>0.05$), 0.4 M NaCl derişiminde % 26.8 düzeyinde önemli bulunmuştur ($p<0.01$).

Cu+NaCl kombinasyonu etkisine bırakılan *Spirulina* sp.'nin. büyüme oranları da artan Cu ve NaCl derişimleriyle birlikte azaldığı bulunmuştur. 0.1+0.2, 0.1+0.4, 1.0+0.2 ve 1.0+0.4 ppm+M derişimlerinde büyüme oranları kontrole göre sırasıyla % 42.7, % 48.0, % 53.8 ve % 64.9 düzeylerinde azalmıştır ($p<0.01$).

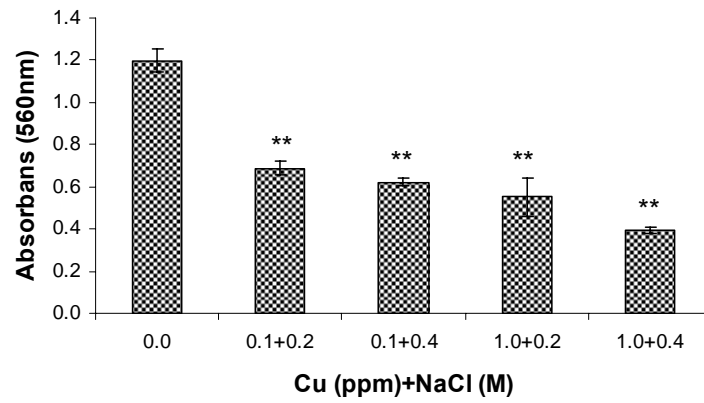
(a)



(b)



(c)



Şekil 4.1. Cu (a), NaCl (b) ve Cu+NaCl (c) kombinasyonlarının etkisine bırakılan *Spirulina* sp.'nin büyüme oranları. Barlar ortalama \pm standart sapmayı gösterir (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

4.2. Biyomas Miktarları

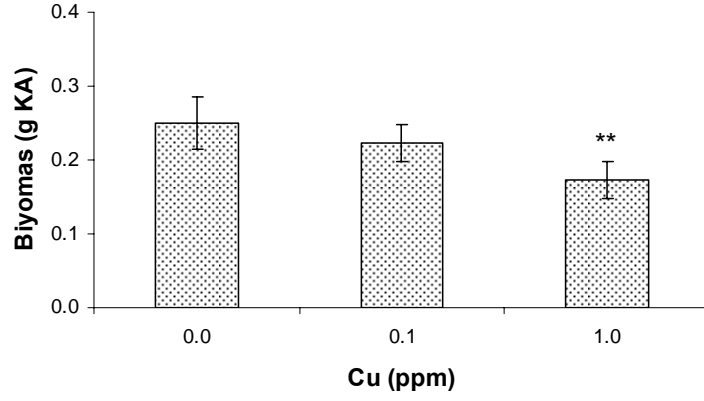
Bakır, NaCl ve Cu+NaCl kombinasyonlarının etkisine bırakılan *Spirulina* sp.'nin biyomas miktarları (KA üzerinden) Şekil 4.2.'de verilmiştir.

Bakır etkisine bırakılan *Spirulina* sp.'nin biyomas miktarlarında bakır derişiminin artışıyla azalmalar olduğu bulunmuştur. 0.1 ppm Cu derişimdeki azalma istatistiksel olarak kontrole göre % 10.7 düzeyinde önemsiz bulunurken ($p>0.05$), 1.0 ppm Cu derişiminde % 30.6 düzeyinde önemli bulunmuştur ($p<0.01$).

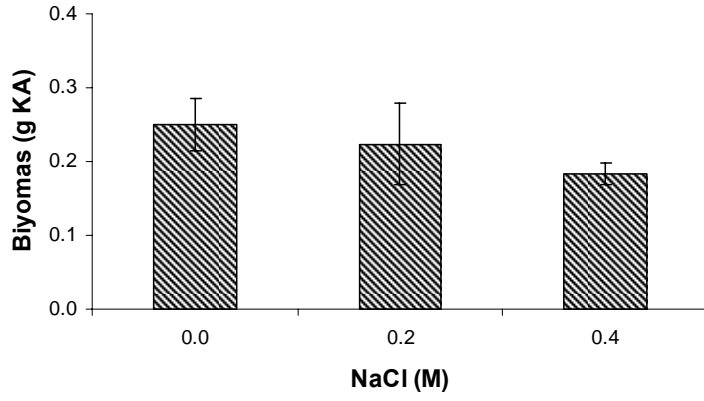
NaCl etkisine bırakılan *Spirulina* sp.'nin biyomas miktarlarının artan tuz derişimiyle birlikte azaldığı bulunmuştur. 0.2 M ve 0.4 M derişimlerinde azalma istatistiksel olarak kontrole göre sırasıyla % 10.7 ve % 26.4 düzeylerinde önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$).

Cu+NaCl kombinasyonu etkisine bırakılan *Spirulina* sp.'nin biyomas miktarlarının da artan Cu ve NaCl derişimleriyle birlikte azaldığı bulunmuştur. 0.1+0.2 ve 0.1+0.4 ppm+M derişimlerinde azalma kontrole göre sırasıyla % 14.7 ve % 21.4 düzeylerde önemsiz bulunurken ($p>0.05$), 1.0+0.2 ve 1.0+0.4 ppm+M derişimlerinde sırasıyla % 34.7 ($p<0.05$) ve % 40.0 ($p<0.01$) düzeylerinde önemli bulunmuştur.

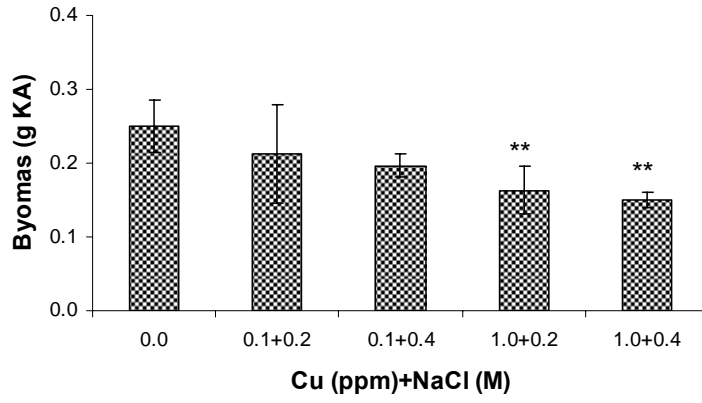
(a)



(b)



(c)



Şekil 4.2. Cu (a), NaCl (b) ve Cu+NaCl (c) kombinasyonlarının etkisine bırakılan *Spirulina* sp'nin. biyomas miktarları. Barlar ortalama \pm standart sapmayı gösterir (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

4.3. Bakır ve Potasyum Derişimleri

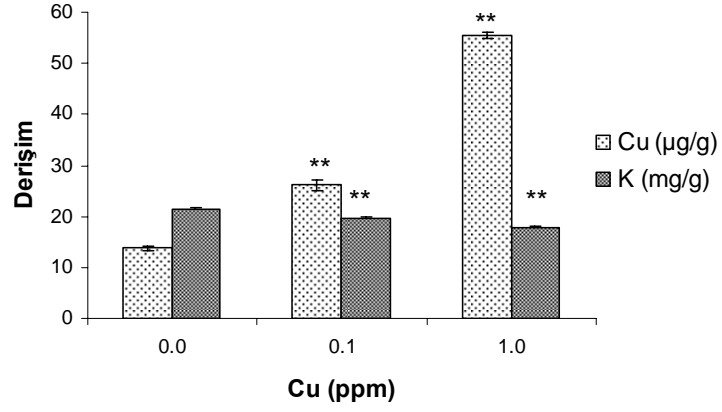
Bakır, NaCl ve Cu+NaCl kombinasyonlarının etkisine bırakılan *Spirulina* sp.'nin bakır ve potasyum derişimleri Şekil 4.3.'te verilmiştir. Sonuçlar kuru ağırlık (KA) üzerinden verilmiştir.

Bakır etkisine bırakılan *Spirulina* sp.'nin bakır içeriğinde artışlar olduğu bulunurken, potasyum miktarlarında azalmalar belirlenmiştir. 0.1 ve 1.0 ppm Cu derişimlerinde Cu miktarları kontrole göre sırasıyla % 90.5 ve % 303.0 düzeylerinde artarken ($p<0.01$), K miktarları sırasıyla % 8.7 ve % 17.4 düzeylerinde önemli bir şekilde azalmıştır ($p<0.01$).

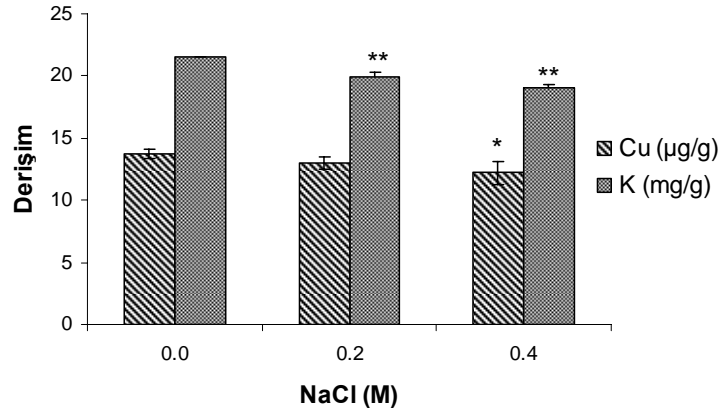
NaCl etkisine bırakılan *Spirulina* sp.'nin. bakır ve potasyum derişimlerinin artan tuz derişimiyle birlikte azaldığı bulunmuştur. 0.2 M NaCl derişimdeki azalmalar istatistiksel olarak kontrole göre sırasıyla % 5.3 ($p>0.05$) ve % 7.3 ($p<0.01$) düzeylerinde bulunurken, 0.4 M NaCl derişiminde sırasıyla % 11.2 ($p<0.05$) ve % 11.6 ($p<0.01$) düzeyinde önemli bulunmuştur.

Cu+NaCl kombinasyonu etkisine bırakılan *Spirulina* sp.'nin. bakır derişimleri artan Cu ve NaCl derişimleriyle birlikte artarken, potasyum derişimleri azalmıştır. 0.1+0.2, 0.1+0.4, 1.0+0.2 ve 1.0+0.4 ppm+M derişimlerinde Cu miktarları kontrole göre sırasıyla % 23.3, % 16.9, % 93.4 ve % 74.2 düzeylerinde artmıştır ($p<0.01$). K miktarları ise % 13.8, % 17.4, % 22.6 ve % 29.0 düzeylerinde azalmıştır ($p<0.01$).

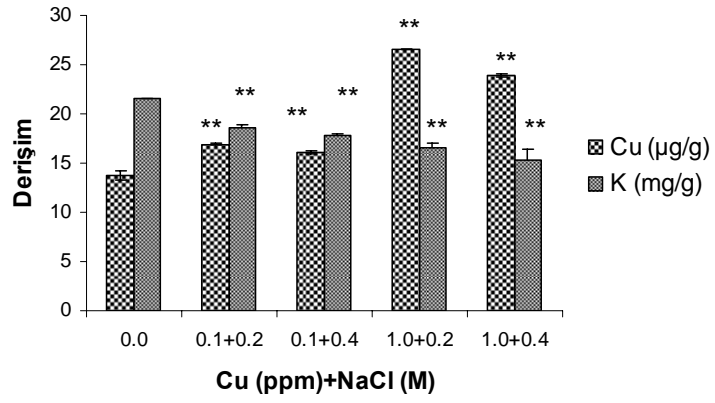
(a)



(b)



(c)



Şekil 4.3. Cu (a), NaCl (b) ve Cu+NaCl (c) kombinasyonlarının etkisine bırakılan *Spirulina* sp'nin. bakır ve potasyum derişimleri (KA'da). Barlar ortalama \pm standart sapmayı gösterir (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

4.4. Klorofil-a Miktarları

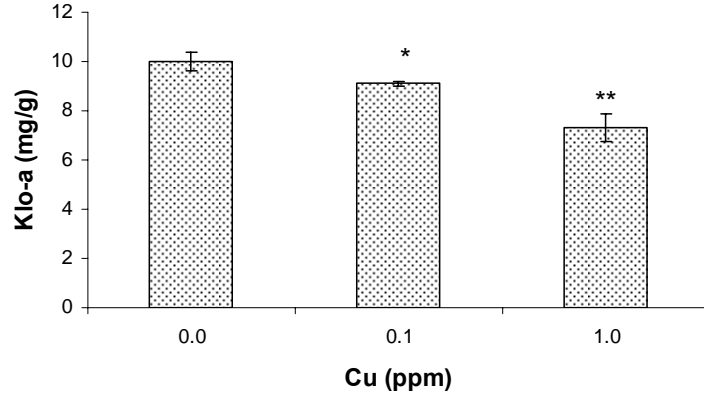
Bakır, NaCl ve Cu+NaCl kombinasyonlarının etkisine bırakılan *Spirulina* sp.'nin klorofil-a miktarları Şekil 4.4.'te verilmiştir. Sonuçlar yaş ağırlık (YA) üzerinden verilmiştir.

Bakır etkisine bırakılan *Spirulina* sp.'nin klorofil-a miktarlarında azalmalar olduğu bulunmuştur. 0.1 ve 1.0 ppm Cu derişimlerinde klorofil-a miktarları kontrole göre sırasıyla % 9.0 ($p<0.05$) ve % 26.7 ($p<0.01$) düzeylerinde azalmıştır.

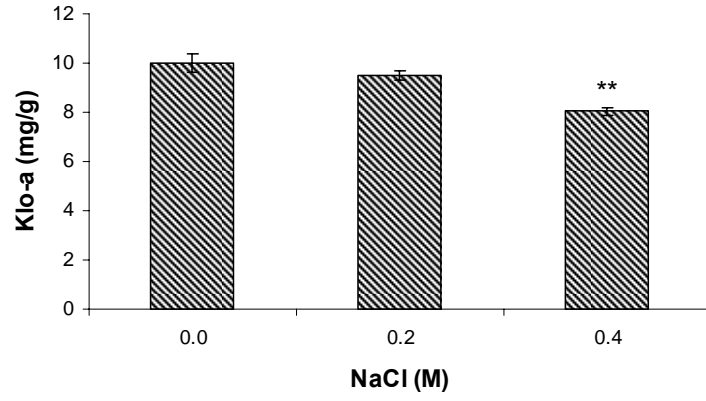
NaCl etkisine bırakılan *Spirulina* sp.'nin klorofil-a miktarlarının artan tuz derişimiyle birlikte azaldığı bulunmuştur. 0.2 M NaCl derişimdeki azalma istatistiksel olarak kontrole göre % 5.0 düzeyinde önemsiz bulunurken ($p>0.05$), 0.4 M NaCl derişiminde % 19.7 düzeyinde önemli bulunmuştur ($p<0.01$).

Cu+NaCl kombinasyonu etkisine bırakılan *Spirulina* sp.'nin klorofil-a miktarlarının da artan Cu ve NaCl derişimleriyle birlikte azaldığı bulunmuştur. 0.1+0.2, 0.1+0.4, 1.0+0.2 ve 1.0+0.4 ppm+M derişimlerinde klorofil-a miktarları kontrole göre sırasıyla % 18.3, % 24.3, % 30.6 ve % 34.6 düzeylerinde azalmıştır ($p<0.01$).

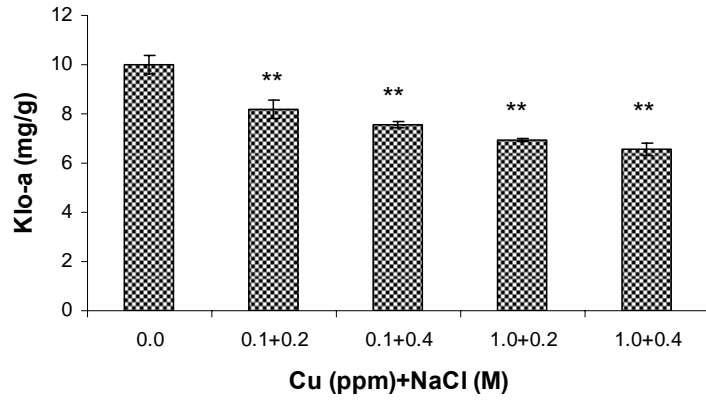
(a)



(b)



(c)



Şekil 4.4. Cu (a), NaCl (b) ve Cu+NaCl (c) kombinasyonlarının etkisine bırakılan *Spirulina* sp'nin. klorofil-a miktarları (YA'da). Barlar ortalama \pm standart sapmayı gösterir (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

4.5. Karoten Miktarları

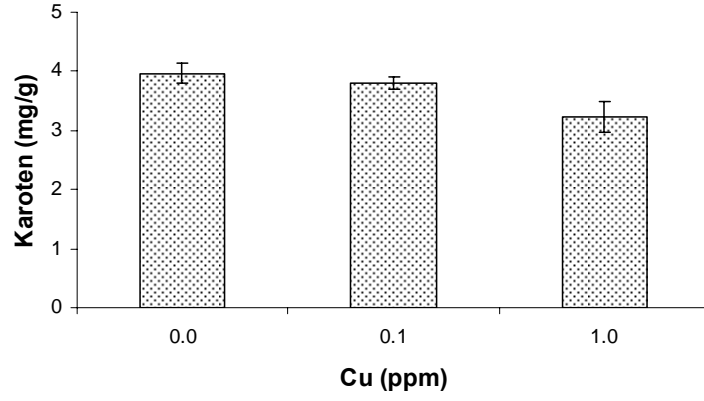
Bakır, NaCl ve Cu+NaCl kombinasyonlarının etkisine bırakılan *Spirulina* sp.'nin karoten miktarları Şekil 4.5.'te verilmiştir. Sonuçlar yaş ağırlık üzerinden verilmiştir.

Bakır etkisine bırakılan *Spirulina* sp.'nin karoten miktarlarında azalmalar olduğu bulunmuştur. 0.1 ve 1.0 ppm Cu derişimlerinde karoten miktarları kontrole göre sırasıyla % 4.2 ve % 18.4 düzeylerinde önemsiz olarak azalmıştır ($p>0.05$).

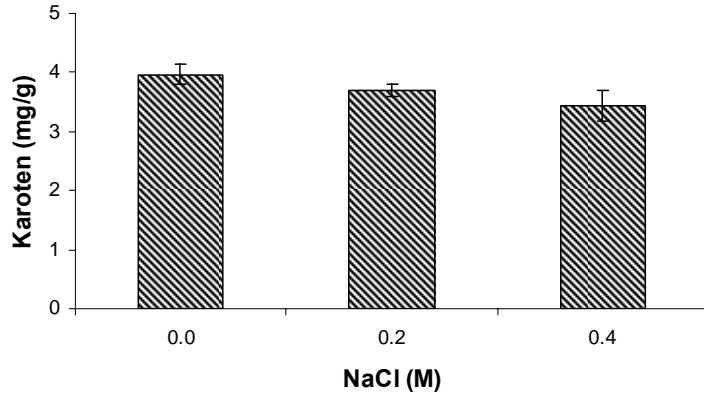
NaCl etkisine bırakılan *Spirulina* sp.'nin karoten miktarlarının artan tuz derişimiyle birlikte azaldığı bulunmuştur. 0.2 M ve 0.4 M derişimlerinde azalma istatistiksel olarak kontrole göre sırasıyla % 6.7 ve % 13.4 düzeylerinde önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$).

Cu+NaCl kombinasyonu etkisine bırakılan *Spirulina* sp.'nin karoten miktarlarının da artan Cu ve NaCl derişimleriyle birlikte azaldığı bulunmuştur. 0.1+0.2, 0.1+0.4, 1.0+0.2 ve 1.0+0.4 ppm+M derişimlerinde klorofil-a miktarları kontrole göre sırasıyla % 15.9, % 23.5, % 27.7 ve % 33.6 düzeylerinde önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$).

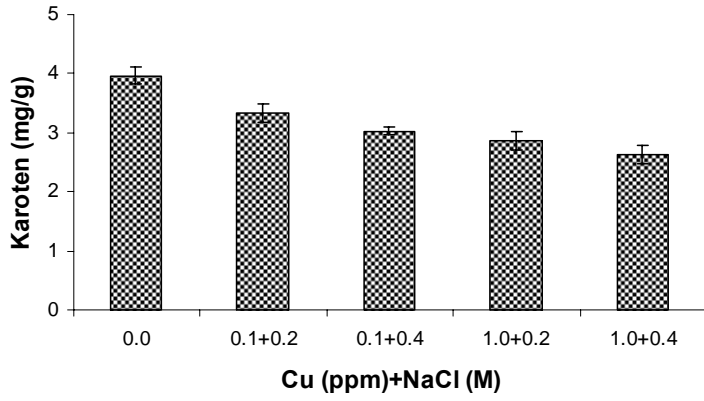
(a)



(b)



(c)



Şekil 4.5. Cu (a), NaCl (b) ve Cu+NaCl (c) kombinasyonlarının etkisine bırakılan *Spirulina* sp.'nin karoten miktarları (YA'da). Barlar ortalama \pm standart sapmayı gösterir (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

4.6. Prolin Miktarları

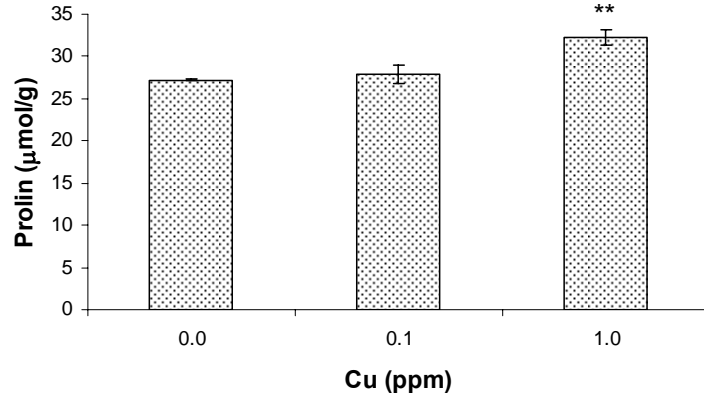
Bakır, NaCl ve Cu+NaCl kombinasyonlarının etkisine bırakılan *Spirulina* sp.'nin prolin miktarları Şekil 4.6.'da verilmiştir. Sonuçlar yaş ağırlık üzerinden verilmiştir.

Bakır etkisine bırakılan *Spirulina* sp.'nin prolin miktarlarında artışlar olduğu bulunmuştur. 0.1 ppm Cu derişimdeki artış istatistiksel olarak kontrole göre % 2.6 düzeyinde önemsiz bulunurken ($p>0.05$), 1.0 ppm Cu derişiminde % 18.7 düzeyinde önemli bulunmuştur ($p<0.01$).

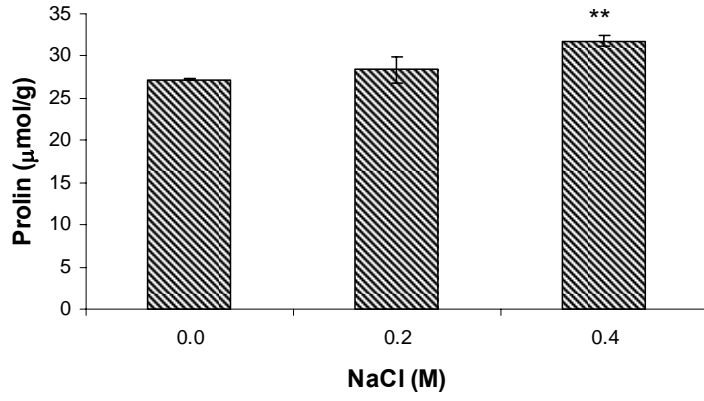
NaCl etkisine bırakılan *Spirulina* sp.'nin prolin miktarlarının artan tuz derişimiyle birlikte arttığı bulunmuştur. 0.2 M NaCl derişimdeki artış istatistiksel olarak kontrole göre % 4.4 düzeyinde önemsiz bulunurken ($p>0.05$), 0.4 M NaCl derişiminde % 16.9 düzeyinde önemli bulunmuştur ($p<0.01$).

Cu+NaCl kombinasyonu etkisine bırakılan *Spirulina* sp.'nin prolin miktarlarının da artan Cu ve NaCl derişimleriyle birlikte arttığı bulunmuştur. 0.1+0.2 ppm+M derişiminde artış kontrole göre % 8.0 düzeyinde önemsiz bulunurken ($p>0.05$), 0.1+0.4, 1.0+0.2 ve 1.0+0.4 ppm+M derişimlerinde sırasıyla % 15.3 ($p<0.05$), % 19.3 ($p<0.01$) ve % 26.3 ($p<0.01$) düzeylerinde önemli bulunmuştur.

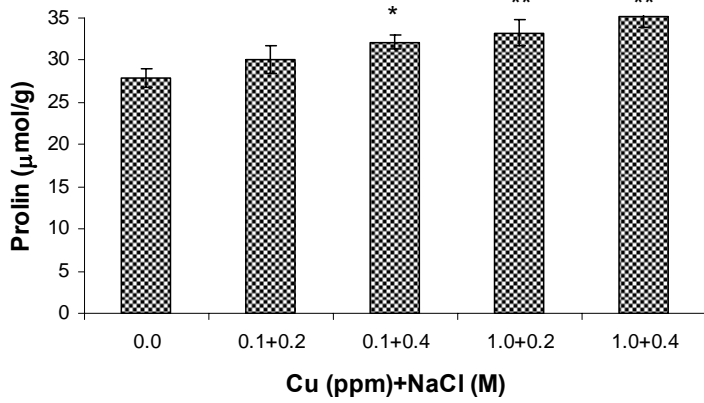
(a)



(b)



(c)



Şekil 4.6. Cu (a), NaCl (b) ve Cu+NaCl (c) kombinasyonlarının etkisine bırakılan *Spirulina* sp'nin. prolin miktarları (YA'da). Barlar ortalama \pm standart sapmayı gösterir (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

4.7. Malondialdehit Miktarları

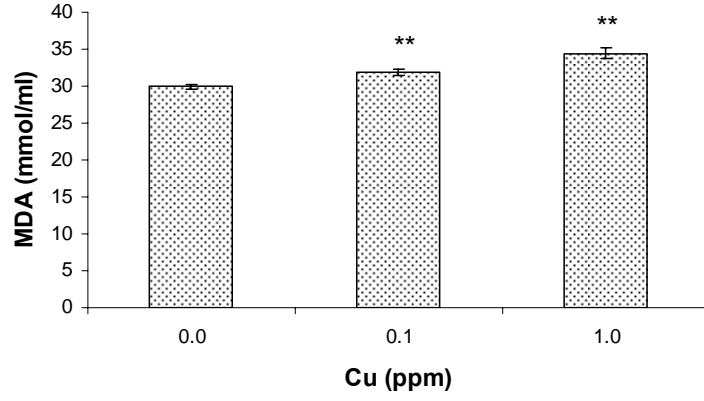
Bakır, NaCl ve Cu+NaCl kombinasyonlarının etkisine bırakılan *Spirulina* sp.'nin MDA miktarları Şekil 4.7.'de verilmiştir. Sonuçlar yaş ağırlık üzerinden verilmiştir.

Bakır etkisine bırakılan *Spirulina* sp.'nin MDA miktarlarında artışlar olduğu bulunmuştur. 0.1 ve 1.0 ppm Cu derişimlerinde MDA miktarları kontrole göre sırasıyla % 6.3 ve % 15.0 düzeylerinde artmıştır ($p<0.01$).

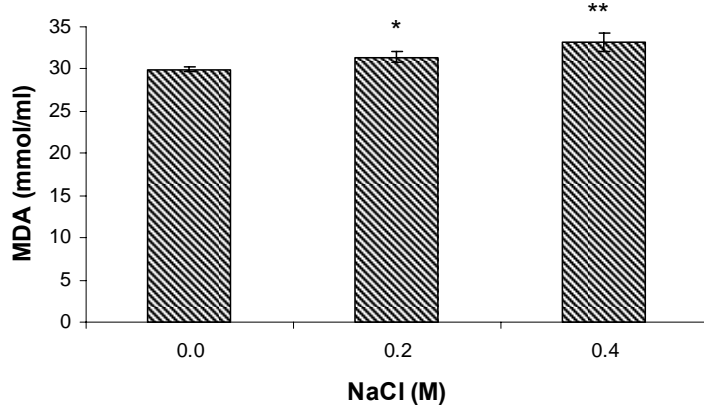
NaCl etkisine bırakılan *Spirulina* sp.'nin MDA miktarlarının artan tuz derişimiyle birlikte arttığı bulunmuştur. 0.2 M ve 0.4 M derişimlerinde artış istatistiksel olarak kontrole göre sırasıyla % 5.0 ($p<0.05$) ve % 10.8 ($p<0.01$) düzeylerinde önemli bulunmuştur.

Cu+NaCl kombinasyonu etkisine bırakılan *Spirulina* sp.'nin MDA miktarlarının da artan Cu ve NaCl derişimleriyle birlikte arttığı bulunmuştur. 0.1+0.2 ppm+M derişiminde artma kontrole göre % 8.0 düzeyinde önemsiz ($p>0.05$), 0.1+0.4, 1.0+0.2 ve 1.0+0.4 ppm+M derişimlerinde sırasıyla % 11.1 ($p<0.05$), % 19.7 ($p<0.01$) ve % 22.4 ($p<0.01$) düzeylerinde önemli bulunmuştur.

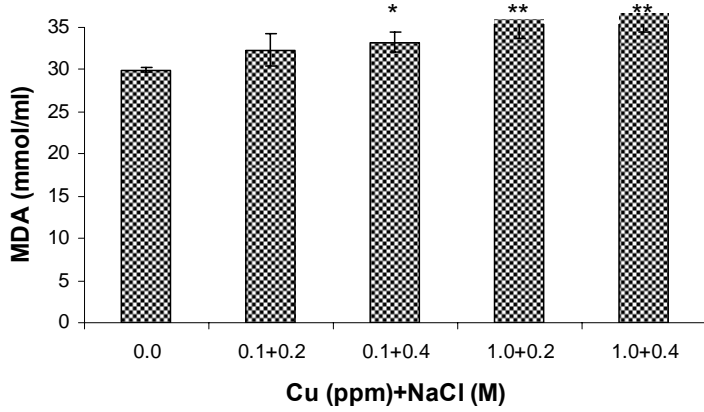
(a)



(b)



(c)



Şekil 4.7. Cu (a), NaCl (b) ve Cu+NaCl (c) kombinasyonlarının etkisine bırakılan *Spirulina* sp.'nin MDA miktarları (YA'da). Barlar ortalama \pm standart sapmayı gösterir (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Bakır elementi potansiyel olarak oldukça toksik olmasına rağmen normal bir büyüme ve gelişim için gerekli bir metaldir. Bakır, birçok fizyolojik olaya katılır ve çoğu metalloprotein için gerekli bir kofaktördür. Fazla miktardaki bakır bitki gelişimini inhibe eder ve önemli hücresel süreçleri bozar (Yruela, 2005). Kahverengi bir makroalg olan *Padina boegesenni* ile yapılan bir çalışmada 25, 50, 100 ve 500 ppb bakır uygulaması yapılmış ve artan bakır derişimi ile algin gelişiminde önemli bir düşüş gözlenmiştir (Mamboya, 2001). Fasulye fideleri ile yapılan bir çalışmada kök, gövde ve yaprak büyümesi üzerine bakırın etkileri araştırılmıştır. Bakırın fasulye fidelerinin kök, gövde ve yaprak büyümesini önemli oranlarda engellediği bulunmuştur. Bakır konsantrasyonundaki artış ile kök, gövde ve yaprak büyümesinin inhibisyon oranı arasında bir paralellik görülmüştür. Fidelerin ağır metale maruz kalma süresinin uzaması kök, gövde ve yaprak büyümesindeki azalmanın daha fazla olmasına yol açmıştır (Zengin ve Munzuroğlu, 2004). Bir mavi-yeşil alg olan *Anabaena flos-aquae* ile yapılan bir çalışmada 0.35 ppm bakır uygulanması alg gelişimini geriletmiştir (Surosz ve Palinska, 2004).

Tuzluluk bitki büyüme ve gelişimini sınırlayan en önemli çevresel etmenlerden biridir. Yüksek tuzluluğun bitkiler üzerindeki zararlı etkileri bitkinin ölümü ve/veya üretimin düşmesi şeklinde gözlenebilir (Parida ve Das, 2005). Mısır bitkisi ile yapılan bir çalışmada 75 mmol/L NaCl uygulaması ile bitkilerin gövde gelişiminde önemli bir azalma gözlenmiştir (Muhling ve Lauchli, 2002). *Spirulina platensis* ile yapılan bir çalışmada artan NaCl derişimi ile alg gelişiminde ani bir düşüş belirlenmiştir. NaCl stresinin gelişimi geriletmediği *Anacystis* ve *Nostoc* gibi diğer mavi-yeşil alglerde de gösterilmiştir (Vonshak vd., 1988).

Cu ve NaCl'nin birlikte etkisi ile ilgili çalışmalar oldukça azdır. Srivastava vd. (2005) *Anabaena doliolum* ile yaptıkları bir araştırmada Cu ve NaCl karışımının ayrı ayrı Cu ve NaCl uygulamasına karşın algde daha az bir hasara yol açtığını

belirlemişlerdir. Buğday (*Triticum aestivum* L.) ile yapılan bir çalışmada 50, 100 mM NaCl ile 20 ppm Cu kombine edilmiştir. Çalışma sonucunda fide gelişiminin oldukça düştüğü ve tuzluluğun bitkinin bakır uygulanmasına yanıtını etkilediği bulunmuştur (El-Enany, 2002). Fakat birlikte etkilerde hangisinin ne gibi etkisi olduğu konusunda detaylı çalışmalar gerekmektedir (Srivastava vd., 2005).

Spirulina sp. ile yapılan bu çalışmada Cu, NaCl ve Cu+NaCl'nin alg gelişimini düşürdüğü ve dolayısı ile kuru ağırlık olarak biyomas miktarını azalttığı belirlenmiştir. Bu azalmanın büyüme oranlarında 0.1 ve 1.0 ppm Cu derişimlerinde kontrole göre sırasıyla % 28.1 ve % 46,5 düzeylerinde, biyomas miktarlarında, 0.1 ppm Cu derişimde kontrole göre % 10.7 düzeyinde, 1.0 ppm Cu derişiminde % 30.6 düzeylerinde olduğu bulunmuştur. NaCl de alg gelişimini ve biyomas miktarını azaltmıştır. *Spirulina* sp.'nin büyüme oranı ve biyomas miktarı artan tuz derişimiyle birlikte düşmüştür. Bu düşüşler büyüme oranında 0.2 M derişimde kontrole göre % 9.2, 0.4 M derişiminde % 26.8 düzeylerinde bulunurken, biyomas miktarında 0.2 M ve 0.4 M derişimlerinde kontrole göre sırasıyla % 10.7 ve % 26.4 düzeylerinde bulunmuştur. Cu+NaCl kombinasyonlarının da gelişimi ve biyomas miktarını azalttığı belirlenmiştir. Artan Cu ve NaCl derişimi ile büyüme ve biyomasın azalması paralellik göstermiştir. Bu azalmalar büyüme oranlarında 0.1+0.2, 0.1+0.4, 1.0+0.2 ve 1.0+0.4 ppm+M derişimlerinde kontrole göre sırasıyla % 42.7, % 48.0, % 53.8 ve % 64.9 düzeylerinde olurken, biyomas miktarlarında 0.1+0.2 ve 0.1+0.4 ppm+M derişimlerinde kontrole göre sırasıyla % 14.7 ve % 21.4 düzeylerinde, 1.0+0.2 ve 1.0+0.4 ppm+M derişimlerinde sırasıyla % 34.7 ve % 40.0 düzeylerinde bulunmuştur. Literatür çalışmalarına paralel olarak bu çalışmanın sonuçlarına bakıldığında bu derişimlerde Cu, NaCl ve Cu+NaCl'nin *Spirulina* sp.'nin gelişimini ve biyomas miktarını azalttığı söylenebilir.

Alglerin çeşitli metalleri sudan alarak biriktirdikleri bilinmektedir. Nalimova vd. (2005) yaptıkları bir çalışmada bakır uygulanan *Spirulina platensis* hücrelerinin kontrole göre 10 kat daha fazla bakır akümüle ettiğini bulmuştur. Kuru ve tekrar sulandırılmış *S. platensis* ile yapılan bir çalışmada algin sudan bakır akümüle etmesine bakılmıştır. Çalışma sonucunda tekrar sulandırılmış alg biyomasının % 91 oranında bakırı aldığı bulunmuştur. Kuru alg biyoması ile karşılaştırıldığında tekrar

sulandırılmış alg biyoması daha yüksek bir bakır alım yüzdesine sahiptir (Solisio, 2006).

Tuz stresinde bitkilerin Mn, Zn, Fe ve Cu gibi mikroelementlerin alınımı ve taşınımı hakkında çok az bilgi mevcuttur (Muhling ve Lauchli, 2003). NaCl metal alınımı etkileyebilir, ancak bu etkinin anlaşılması için çok fazla sayıda çalışma gerekmektedir (Lores ve Pennock, 1998). El-Enany (2002) buğday fideleriyle yaptığı bir çalışmada fideleri bir hafta boyunca 20 ppm Cu ile 50 ve 100 mM NaCl kombinasyonuna bırakmıştır. Tuzluluk, buğday fidelerinin bakır uygulamasına yanıtını etkilemiştir. Bakır akümüasyonu önemli bir şekilde tuzluluktan etkilenmiştir. Lores ve Pennock (1998) çözünmüş organik materyal ile yaptığı çalışmada tuzun % 27 oranında bakır bağlanmasını azalttığını saptamışlardır. *Ceratophyllum demersum* ile yapılan bir çalışmada NaCl uygulamasının bitkinin bakır içeriğini azalttığı ortaya konmuştur (Doğan, 2005).

Araştırma bulgularımız az miktarda bulunan literatür çalışmalarıyla paralellik göstermektedir. Genel olarak bakır etkisine maruz kalan *Spirulina* sp.'nin bakır içeriği artarken, NaCl etkisinde bakır içeriğinin azaldığı belirlenmiştir. Bakır etkisinde artışlar 0.1 ve 1.0 ppm Cu derişimlerde kontrole göre sırasıyla % 90.5 ve % 303.0 düzeylerinde, NaCl etkisinde azalmalar 0.2 M NaCl derişimde kontrole göre % 5.3 düzeyinde, 0.4 M NaCl derişimde % 11.2 düzeyindedir. Cu+NaCl kombinasyonlarında ise 0.1+0.2, 0.1+0.4, 1.0+0.2 ve 1.0+0.4 ppm+M derişimlerinde Cu miktarları kontrole göre sırasıyla % 23.3, % 16.9, % 93.4 ve % 74.2 düzeylerinde artmıştır. Kombinasyon sonuçlarına dikkat edildiğinde tuz derişiminin artması ile bakır miktarında düşüşler belirlenmiştir. Bu metalin derişiminde azalmalar ortamdaki fazla Na ve Cl iyonlarıyla olan etkileşiminden kaynaklanabilir. Tuzlu koşullarda mikroelementlerin çözünürlüğünün düşük olduğu bilinmektedir. Yine de net sonuçlara ulaşmak için daha fazla sayıda çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu bilgilere ek olarak hem bakır hem de tuz uygulamalarında alglerin potasyum miktarlarında düşüşler belirlenmiştir. Potasyum, kalsiyum ve magnezyum gibi elementlerin miktarlarında azalmalar *Cucumis sativus* (Alaoui-Sosse vd., 2004) ve *Zea mays* (Yakıt ve Tuna, 2006) gibi bitkilerle yapılan çalışmalarda da bulunmuştur. Gerek bakır gerekse de tuz, yüksek seviyelerde hücre membranına zarar vermektedir. Dolayısı ile bu hasar membrana zarar verdiği için potasyum sızıntısına neden

olmaktadır. Bu sızıntıdan dolayı *Spirulina* sp.'de potasyum derişimleri azalmış olabilir.

Bitkilerde klorofil ve karoten gibi fotosentetik pigmentler ağır metal stresine duyarlı olan parametrelerdendir. Ağır metallerin klorofil ve karoten sentezini inhibe ettiği ve sonuç olarak miktarlarında azalmalara neden olduğu birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Quartacci vd., 2000; Martins ve Mourato, 2006). Surosz ve Palinska (2004) bir mavi-yeşil alg olan *Anabaena flos-aquae* ile yaptıkları bir çalışmada bakırın alg gelişimini inhibe ettiğini ve artan bakır derişimi ile klorofil-a konsantrasyonunun azaldığını ortaya koymuşlardır. Domates bitkisi ile yapılan bir çalışmada klorofil içeriğinin bakır toksisitesinden oldukça etkilendiği ortaya konmuştur. Bu çalışmada ortamda bakır miktarının artmasıyla domates yapraklarında klorofil seviyesinde düşüş belirlenmiştir (Martins ve Mourato, 2006). *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* ile yapılan bir başka çalışmada ise bitki yapraklarına bakır uygulanması ile total klorofil miktarında azalmalar olmuş ve yapraklarda klorozis gözlenmiştir (Panou-Filothou vd., 2001).

Tuz stresinin bitkilerin fotosentetik pigment miktarlarında azalmalara neden olduğu yapılan araştırmalar sonucunda ortaya konmuştur. Sudhir vd. (2005) yaptıkları bir çalışmada yüksek tuz stresinin *S. platensis* mikroalginde tilakoid membran proteinlerinde neden olduğu zararı araştırmışlardır. Yapılan bu çalışmada NaCl uygulamasın tilakoid membran proteinlerinin değişimine ve bazı tilakoid membran proteinlerinin azalmasına neden olduğu bulunmuştur. *S. platensis* ile yapılan başka bir çalışmada ise tuz stresinin algde klorofil miktarını azalttığı ortaya konmuştur (Kebede, 1997). Yakıt ve Tuna (2006) yaptıkları bir çalışmada tuz stresi altında mısır bitkisinin nasıl etkilendiğini incelemişler ve toplam klorofil ve toplam karotenoid miktarlarının tuz uygulamasından olumsuz etkilendiğini bulmuşlardır.

Cu ve NaCl kombinasyonunun fotosentetik pigment üzerine etkisi ile ilgili çalışmalar oldukça azdır. Alutoin vd. (2001) *Porites lutea* ile yaptıkları bir çalışmada Cu+NaCl kombinasyonunun bu canlının klorofil-a içeriğinde düşüölere neden olduğunu belirlemişlerdir.

Spirulina sp. ile yapılan bu çalışmadan elde ettiğimiz bulgular literatür çalışmalarına paralellik göstermektedir. Bakır, NaCl ve Cu+NaCl uygulaması fotosentetik pigment

miktarlarında genel olarak düşüşe neden olmuştur. Bakır etkisine bırakılan *Spirulina* sp.'nin klorofil-a miktarında 0.1 ve 1.0 ppm Cu derişimlerinde kontrole göre sırasıyla % 9.0 ve % 26.7 düzeylerinde, karoten miktarında kontrole göre sırasıyla % 4.2 ve % 18.4, NaCl etkisinde azamalar 0.2 M derişimde kontrole göre % 5.0 düzeyinde, 0.4 M derişimde % 19.7 düzeyinde, karoten miktarında kontrole göre sırasıyla % 6.7 ve % 13.4, Cu+NaCl kombinasyonu etkisindeki azalma ise 0.1+0.2, 0.1+0.4, 1.0+0.2 ve 1.0+0.4 ppm+M derişimlerinde kontrole göre sırasıyla % 18.3, % 24.3, % 30.6 ve % 34.6, karoten miktarında kontrole göre sırasıyla % 15.9, % 23.5, % 27.7 ve % 33.6 düzeylerinde bulunmuştur. Bulgularımıza bakıldığında karoten miktarlarındaki azalmalar klorofil-a miktarlarına göre daha az olmuştur. Genel olarak karoten miktarının ağır metal stresinden daha az etkilendiği rapor edilmiştir (Krupa, 1988). Yüksek bakır konsantrasyonları fotosentez, solunum gibi önemli hücrel prosesleri aksatır (Marschner, 1995; Prasad ve Strzalka, 1999). Aynı zamanda klorofil ve kloroplast içeriğini düşürür, tilakoid membran yapısında değişmelere neden olur (Baszynski vd., 1988). Toksik seviyedeki bakır fotosentetik membranların pigment ve protein kompozisyonlarını modifiye etmiştir (Lidon ve Henriques, 1991; Maksymiec vd., 1994). Aynı zamanda bakır lipid peroksidasyonuna neden olduğundan dolayı lipid içeriğinde azalma ve tilakoid membran yağ asidi kompozisyonunda değişmeler meydana gelir (Sadmam ve Boger, 1980; Luna vd., 1994). Bu gibi modifikasyonlar sonucu PS II'de değişimler bulunmuştur (Quartacci vd., 2000). Tuzluluk, bitki büyüme ve gelişimini sınırlayan en önemli çevresel etmenlerden biridir. Tuz stresi etkisinde fotosentez, protein sentezi, enerji ve lipid metabolizması olumsuz etkilenir. Tuz stresinin bitkilerin kloroplast yapılarında değişmelere neden olduğu bulunmuştur (Keiper vd., 1998). Tuz stresi altında bitkilerin karbon asimilasyonlarında azalmalar bulunmuştur (Munns ve Termatt, 1986), aynı zamanda tuz, fotosentetik elektron transportu ve Kelvin döngüsünün enzimlerini de inhibe etmiştir (Reddy vd., 1992). Bu çalışmalar açıkça tuzluluğun fotosentezi etkilediğini göstermektedir. Reddy ve Vora (1986) ise tuz stresinden kaynaklanan bu azalmaların klorofil parçalanmasında rol oynayan klorofillaz enziminden dolayı olabileceğini belirtmiştir. Bulgularımıza ve ona destek sağlayan bu çalışmalara bakılarak klorofil-a ve karoten gibi fotosentetik pigmentlerde azalmaların bu maddelerin sentezindeki aksamalardan ve yapılarındaki bozulmalardan kaynaklandığı söylenebilir.

Ağır metal stresinde prolin miktarlarında artışların olduğunu gösteren birçok araştırma yapılmıştır (Wu vd., 1998; Choudhary vd., 2007). Mehta ve Gaur (1999) *C. vulgaris* ile yaptıkları bir çalışmada yüksek miktarda bakır konsantrasyonu uygulanan alglerin bu metali intraselüler olarak akümüle ettiğini belirlemişlerdir. Bu bilim adamları dış ortamda ya da hücre içinde metal konsantrasyonuna bağlı olarak serbest prolin akmlasyonunun olduğunu da saptamışlardır. Artan metal akümülasyonu ile alg hücrelerinde intraselüler prolin miktarı da artmıştır. *Chlorella* sp. ile yapılan başka bir çalışmada ise toksik seviyede bakır iyonları altında algin prolin akümüle ettiğini bulmuşlardır (Wu vd., 1998). Choudhary vd., (2007)'nin *S. platensis* ile yaptıkları bir çalışmada ağır metallerin prolin üzerine etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda test mikroorganizmalarının gelişiminde bir düşüş olmasına rağmen kültür ortamında metal konsantrasyonuna bağlı olarak alglerin prolin miktarlarında artışlar belirlemişlerdir.

Tuz stresinin bitkilerin serbest prolin akmlasyonlarında nasıl bir değişime neden olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur. Yakıt ve Tuna (2006) tuz stresi altındaki mısır bitkisinde prolin içeriği ile ilgili bir çalışma yapmışlardır. Deney sonucunda tuzun bitki prolin içeriğinde artışa neden olduğunu belirlemişlerdir. Pırlak ve Eşitken (2004) ilek bitkisi ile yaptıkları bir çalışmada tuzun bu bitkilerdeki prolin içeriğine olan etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucuda yüksek tuzluluğun bitkilerde prolin içeriğini artırdığını bulmuşlardır. Tuz stresi altında prolin akümülasyonu ile ilgili olarak yapılan bir başka çalışmada mısır bitkilerinde tuz uygulaması ile konsantrasyona bağlı olarak prolin miktarlarında genel olarak artışlar belirlenmiştir (Avcioğlu vd., 2003).

Spirulina sp. ile yaptığımız bu çalışmanın bulguları literatür çalışmalarına uygunluk göstermektedir. Cu, NaCl ve Cu+NaCl kombine etkileri *Spirulina* sp.'nin prolin içeriğini genel olarak artırmıştır. Bu artışlar bakır etkisinde 0.1 ppm Cu derişimde % 2.6, 1.0 ppm Cu derişiminde % 18.7 düzeyinde, NaCl etkisinde 0.2 M derişimde kontrole göre % 4.4, 0.4 M derişiminde % 16.9 düzeyinde, Cu+NaCl kombinasyonu etkisinde 0.1+0.2 ppm+M derişimde kontrole göre % 8.0 düzeyinde, 0.1+0.4, 1.0+0.2 ve 1.0+0.4 ppm+M derişimlerinde sırasıyla 15.3, % 19.3 ve % 26.3 düzeylerinde bulunmuştur. Bulgularımıza dikkat edildiğinde literatürü destekler tarzda artan Cu, NaCl ve Cu+NaCl derişimleri ile prolin miktarı da artmıştır.

İntraselüler prolin akümülayonu algler, bakteriler ve yüksek bitkiler gibi çeşitli canlılarda bulunmuştur. Bu birikim yüksek tuzluluk, metal stresi, büyüme ortamında ozmolarite değişimi, kuraklık, sıcaklık şoku ve hava kirliliği gibi stres durumlarında meydana gelir (Wu vd., 1998). Prolin uyuşabilir bir solut olarak düşünülebilir, denaturasyona karşı katlanmış protein yapılarını korur ve fosfolipidlerle reaksiyona girerek hücre membranlarını stabilize eder (Dorantes ve Sanchez, 2006). Yine de prolin akümülayonu fonksiyonunun metal stresine yanıtı halen bilinmemektedir. Bakır stresinin ilk hedefi hücre plazma zarını hasara uğratmaktır ki bu da ekstraselüler ortama intraselüler potasyum iyonlarının sızıntısına sebep olur. *Anacystis nidulans* ile yapılan bir çalışmada eksojen prolin uygulanması potasyum sızıntısında düşüğe neden olmuştur ve bu etki bakır toksisitesinin azaltılmasından sorumlu olabilir (Wu vd., 1998). Prolin gibi uyuşabilir bileşikler hücre içi biyokimyayı bozmadan yüksek miktarlarda biriktirilebilirler. Bu bileşikler tuz stresi altında enzimlerin normal aktivite gösterebilmesi için koruyucu rol oynamaktadırlar (Parida ve Das, 2005). Bulgularımız destekleyen bu çalışmalara bakarak prolinin hücre içi yapıları strese karşı korumak amacıyla biriktirildiğini söyleyebiliriz.

Bitkilerin su, tuz, ağır metal toksisitesi gibi abiyotik streslere maruz kalması sonucu oldukça reaktif serbest radikaller üretilir. Bu reaktif radikaller direk olarak bitki hücrelerinde moleküler hasara neden olurlar. Ağır metaller ekosistemin önemli bileşenleridir. Bazı ağır metallerin mikroelement olarak gerekli olmasına rağmen yüksek miktardaki ağır metal alımı bitkiler için toksiktir. Fe, Cu, Cd gibi çoğu ağır metallerin bitkilerde oksidatif strese neden olduğu gösterilmiştir. Normal şartlar altında bu radikallerin miktarı SOD, kalalaz ve askorbat peroksidaz gibi koruyucu enzim aktivitelerinden dolayı azdır. Stres koşullarında uyuşabilir bileşiklerin birikimi ve detoksifiye edici enzimlerin aktivitelerinde artış gibi koruyucu mekanizmalarda artış olabilir. MDA, lipid peroksidasyonunun sitotoksik bir ürünüdür ve serbest radikal üretiminin ve sonuç olarak membran hasarının bir indikatörüdür (Choudhary vd., 2007). Nielsen vd. (1997) de MDA'nın lipid peroksidasyonda oldukça sık olarak kullanılan bir gösterge olduğunu belirtmişlerdir. *A. doliolum* ile yapılan bir çalışmada NaCl, Cu ve bunların kombinasyonlarının algde oksidatif strese yol açtığı ve antioksidan savunma sisteminde değişikliklere yol açtığı ortaya konmuştur. Bu çalışmada MDA miktarının NaCl, Cu ve bunların birlikte etkileri ile genel olarak arttığı ortaya konmuştur (Srivastava vd., 2005). Benzer sonuçlar *S. platensis*

(Choudhary vd., 2007), *Chlamydomonas reinhardtii* (Siripornadulsil vd., 2002), *Arachis hypogaea* (Jain vd., 2001) ile yapılan başka çalışmalardan da elde edilmiştir.

Bu çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar literatür çalışmaları ile uygunluk göstermektedir. Genel olarak bakır, tuz ve kombine etkileri altında MDA miktarlarında artış belirlenmiştir. Bu artışlar bakır etkisinde 0.1 ve 1.0 ppm Cu derişimlerinde kontrole göre sırasıyla % 6.3 ve % 15.0 düzeylerinde, NaCl etkisinde 0.2 M ve 0.4 M derişimlerde kontrole göre sırasıyla % 5.0 ve % 10.8 düzeylerinde, Cu+NaCl kombinasyonu etkilerinde ise 1+0.2 ppm+M derişiminde artma kontrole göre % 8.0 düzeyinde, 0.1+0.4, 1.0+0.2 ve 1.0+0.4 ppm+M derişimlerinde sırasıyla % 11.1, % 19.7 ve % 22.4 düzeylerinde bulunmuştur. Araştırma bulgularımızdan da anlaşıldığı gibi artan derişimlerle MDA miktarlarında da genel olarak bir artış gözlenmiştir. Bu artışların literatür çalışmalarında da belirtildiği gibi stres sonucu meydana gelen serbest radikallerin membranda meydana getirdiği hasarlardan kaynaklandığı söylenebilir.

Genel olarak araştırma bulgularımız bakır, NaCl ve bunların kombine etkilerinin *Spirulina sp.*'de fizyolojik ve biyokimyasal sorunlara yol açtığını ortaya koymuştur. Bu sonuçlara klorofil-a, karoten, prolin ve MDA gibi parametrelerin değerlendirilmesi ile varılmıştır. Ülkemizde alglerde ağır metal, tuz ve bunların etkileşimi az çalışılmış bir konu olması itibariyle bu çalışmanın yapılacak olan yeni çalışmalara ışık tutacağı kanısındayız.

KAYNAKLAR

- Adams, P., Thomas, J.C., Vernon, D.M., Bohnert, H.J., ve Jensen, R.G. (1992). Distinct cellular and organismic responses to salt stress. *Plant Cell Physiol.*, **33**, 1215-1223.
- Alaoui-Sosse, B., Genet, P., Vinit-Dunand, F., Toussaint, M.L., Epron, D., ve Badot, P.M. (2004). Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. *Plant Sci.*, **166**, 1213-1218.
- Allan, R.. (1997). Introduction: mining and metals in the environment. *J. Geochem. Expl.*, **58**, 95-100.
- Alutain, S., Boberg, J., Nyström, M., ve Tedengren, M. (2001). Effects of the multiple stressors copper and reduced salinity on the metabolism of the hermatypic coral *Porites lutea*. *Mar. Environ. Res.*, **52**, 289-299.
- Apse, M.P., Aharon, G.S., Snedden, W.A, ve Blumwald, E. (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science*, **285**, 1256-1258.
- Asada, K. (1992). Ascorbate peroxidase-a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.*, **85**, 235-241.
- Asada, K. ve Takahashi, M. (1987). Production and scavenging of active oxygen radicals in photosynthesis. In: Kyle, D.J., Osmond, C.B., Arntzen, C.J. (Eds.), *Photoinhibition*, vol. 9. Elsevier, Amsterdam, s 227-288.
- Aubert, S., Hennion, F., Bouchereau, A., Gout, E., Blingy, R., ve Dome, A.J. (1999). Subcellular compartmentation of proline in the leaves of the subantarctic kerguelen cabbage *Pringlea antiscorbutica* R.Br. In vivo C-13 NMR Study. *Plant Cell Environ.*, **22**, 255-259.
- Avcıoğlu, R., Demiroğlu, G., Khalvati, M.A., ve Geren, H. (2003). Ozmotik basıncın bazı kültür bitkilerinin erken gelişme dönemindeki etkileri II. prolin, klorofil birikimi ve zar dayanıklılığı. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, **40**, 9-16.
- Baker, D.E. ve Senef, J.P. (1995). *Copper*. In: Alloway, B.J.(ed), *Heavy Metals in Soils*. Blackie Academic and Professional, London, s 179-205.
- Baron, M., Lopez-Gorge, J., Lachica, M., ve Sadmann, G. (1992). Changes in carotenoids and fatty acids in photosystem II of Cu-deficient pea plants. *Physiol. Plant.*, **89**, 207-216.
- Baszynski, T., Ruszkowska, M., Krol, M., Tukendorf, A., ve Wolinska, D. (1978). The effect of copper deficiency on the photosynthetic apparatus of higher plants. *Z. Pflanzenphysiol.*, **89**, 207-216.

- Baszynski, T., Tukendorf, A., Ruszkowska, M., Skorzynska, E., Maksymiec, ve W. (1988). Characteristics of the photosynthetic apparatus of copper non-tolerant spinach exposed to excess copper. *J. Plant Physiol.*, **132**, 708-713.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., ve Teare, D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, **39**, 205-297.
- Bohnert, H.J. ve Jensen, R.G. (1996). Strategies for engineering waterstress tolerance in plants. *Trends Biotechnol.*, **14**, 89-97.
- Borowitzka, M.A. ve Borowitzka, L.J. (1992). *Microalgal Biotechnology*, Cambridge University press, 477s.
- Botella, M.A., Quesada, M.A., Kononowicz, A.K., Bressan, R.A., Pliego, F., Hasegawa, P.M., ve Valpuesta, V. (1994). Characterization and in-situ localization of a salt-induced tomato peroxidase messenger-RNA. *Plant Mol. Biol.*, **25**, 105-114.
- Chang, H., Siegel, B.Z., ve Siegel, S.M. (1984). Salinity induced changes in isoperoxidase in taro, *Colocasia esculenta*. *Phytochem.*, **23**, 233-235.
- Cheeseman, J.M. (1988). Mechanism of salinity tolerance in Plants. *Plant Physiol.*, **87**, 547-550.
- Chen, G. ve Asada, K. (1989). Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant Cell Physiol.*, **30**, 987-998.
- Choudhary, M., Jetley, U.K., Khan, M.A., Zutshi, S., ve Fatma, T. (2007). Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis*-S5. *Ecotox. Environ. Safe.*, **66**, 204-209.
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A., ve Crowe, C.M. (1992). Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **54**, 579-599.
- Dietz, K.J., Tavakoli, N., Kluge, C., Mimura, T., Sharma, S.S., Harris, G.C., Chardonnens, A.N., ve Golldack, D. (2001). Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressfull growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. *J. Exp. Bot.*, **52**, 1969-1980.
- Doğan, M. (2005). *Ceratophyllum demersum*'da kadmiyum klorür, sodyum klorür ve bunların kombinasyonlarının fizyolojik ve morfolojik etkileri. Doktora tezi, s 14-19.
- Dorantes, A.R. ve Sanchez, J.L.M. (2006). Biochemical changes and development of leaf tracheary elements of a desert plant *Fouquieria splendens* ssp. *breviflora* exposed to water stress. *Physiol. Plant.*, **127**, 650-657.
- Droppa, M., Masojidek, J., Rozsa, Z., Wolak, A., Horvath, L.I., Farkas, T., ve Horvath, G. (1987). Characteristics of Cu deficiency-induced inhibition of photosynthetic electron transport in spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.*, **891**, 75-84.
- El-Enany, A.E. (2002). Wheat seedlings response to interactive effects of Cu and salinity. *Plant Nutrition*. Springer Netherlands, s 424-425.

- Elshintinawy, F. ve Elshourbagy, M.N. (2001). Alleviation of changes in protein metabolism in NaCl-stressed wheat seedlings by thiamine. *Biol. Plant.*, **44**, 541-545.
- Elstner, E.F. (1987). Metabolism of activated oxygen species. In: Davies, D.D. (Ed.), *The Biochemistry of Plants*. vol. II, Biochemistry of Metabolism. Academic Press, San Diego, CA, s 252-315.
- Ford, C.W. (1984). Accumulation of low molecular solutes in water stress tropical legumes. *Phytochem.*, **23**, 1007-1015.
- Foyer, C.H., Lelandais, M., Edwards, E.A. ve Mullineaux, P.M. (1991). The role of ascorbate in plants, interactions with photosynthesis and regulatory significance. In: Pell, E., Steffen, K. (Eds.), *Active Oxygen/Oxidative Stress and Plant Metabolism*. American Society of Plant Physiology, Rockville, MD, s 131-144.
- Fridovich, I. (1986). Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.*, **247**, 1-11.
- Gadallah, M.A.A. (1999). Effects of proline and glycinebetaine on *Vicia faba* response to salt stress. *Biol. Plant.*, **42**, 249-257.
- Halliwell, B. (1987). Oxidative damage, lipid peroxidation, and antioxidant protection in chloroplasts. *Chem. Phys.*, **44**, 327-340.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J.M.C. (1984). Oxygen-toxicity, oxygen radicals, transition-metals and disease. *Biochem. J.*, **219**, 1-14.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J.M.C. (1985). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford., s 168-170.
- Hodges, D. M., Delong, J. M., Forney, C. F., ve Frange, R. K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, **207**, 604-611.
- Imlay, J.A. ve Linn, S. (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*, **240**, 1302-1309.
- Iyengar, E.R.R. ve Reddy, M.P. (1996). Photosynthesis in highly salt tolerant plants. In: Pesserkali, M. (Ed.), *Handbook of Photosynthesis*. Marshal Dekar, Baten Rose, USA, s 897-909.
- Jain, M., Mathur, G., Koul, S., ve Sarin, N.B. (2001). Ameliorative effects of proline on salt stress-induced lipid peroxidation in cell lines of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Rep.*, **20**, 463-468.
- Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., ve Timur, S. (2003). Metallerin çevresel etkileri. *Metalurji Derg.*, **136**, 47-53.
- Kartal, G., Güven, A., Kahvecioğlu, Ö., ve Timur, S. (2004). Metallerin çevresel etkileri 2. *Metalurji Derg.*, **137**, 46-51.
- Kebede, E. (1997). Response of *Spirulina platensis* (= *Arthrospira fusiformis*) from Lake Chitu, Ethiopia, to salinity stress from sodium salts. *J. App. Phycol.*, **9**, 551-558.

- Keiper, F.J., Chen, D.M., ve Defilippis, L.F. (1998). Respiratory, photosynthetic and ultrastructural changes accompanying salt adaptation in culture of *Eucalyptus microcorys*. *J. Plant Physiol.*, **152**, 564-573.
- Kennedy, B.F. ve De Fillippis, L.F. (1999). Physiological and oxidative response to nacl of the salt tolerant *Grevillea ilicifolia* and the salt sensitive *Grevillea arenaria*. *J. Plant Physiol.*, **155**, 746-754.
- Kerepesi, I. ve Galiba, G. (2000). Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Crop Sci.*, **40**, 482-487.
- Khan, M.A., Ungar, I.A., ve Showalter, A.M. (1999). Effects of salinity on growth, ion content and osmotic relations in *Halopyrum mocoronatum* (L.) Stapf. *J. Plant Nutr.*, **22**, 191-204.
- Krupa, Z. (1988). Cadmium-induced changes in the composition and structure of the light harvesting chlorophyll a/b protein complexes II in radish cotyledons. *Physiol. Plant.*, **73**, 518-524.
- Lichtenthaler, H. K. ve Wellburn, A.R. (1985). Determination of total carotenoids and chlorophylls-a and b of leaf in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.*, **603**, 591-592.
- Lidon, F.C. ve Henriques, F.S. (1991). Limiting step in photosynthesis of rice plants treated with varying copper levels. *J. Plant Physiol.*, **138**, 115-118.
- Lores, E.M ve Pennock, J.R. (1998). Effect of salinity on binding of Cd, Cr, Cu, and Zn to dissolved organic matter. *Chemosphere*, **37**, 861-874.
- Luna, C.M., Gonzalez, C.A., ve Trippi, V.S. (1994). Oxidative damage caused by excess of copper in oat leaves. *Plant Cell Physiol.*, **35**, 11-15.
- Maksymiec, W., Russa, R., Urbanik-Sypniewska, T., ve Baszynski, T. (1994). Effect of excess Cu on the photosynthetic apparatus of runner bean leaves treated at two different growth stages. *Physiol. Plant.*, **91**, 715-721.
- Mamboya, F., Pratap, H. B., Mtolera, M., ve Bjork, M. (2001). The effect of copper on the daily growth rate and photosynthetic efficiency of the brown macroalgae *Padina boergesenii*. In: Richmond, M. D. and Francis, J. (Eds) *Marine Science*. Tanzania. s 185-192.
- Manav, E. (2004). Laboratuvar çaplı fotobiyoreaktörlerde siyanobakteri/mikroalglerin biyokütle ve metabolit üretimine etki eden parametrelerin incelenmesi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Biyomühendislik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, s 2-36.
- Mansour, M.M.F. (2000). Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biol. Plant.*, **43**, 491-500.
- Maria, B., Ramiro, M.V., Cases, R., Picorel, R., ve Yruela, I. (2006). Excess copper effect on growth, chloroplast ultrastructure, oxygen-evolution activity and chlorophyll fluorescence in *Glycine max* cell suspensions. *Physiol. Plant.*, **127**, 312-325.
- Marschner, H. (1995). *Mineral nutrition of higher plants*. Second edition. London: Academic Press, 889s.

- Martins, L.L. ve Mourato, M.D. (2006). Effect of excess copper on tomato plants: growth parameters, enzyme activities, chlorophyll, and mineral content. *J. Plant Nutr.*, **29**, 2179-2198.
- Meharg, A.A. (1994). Integrated tolerance mechanisms-constitutive and adaptive plant-responses to elevated metal concentrations in the environment. *Plant Cell Environ.*, **17**, 989-993.
- Mehta, S. K. ve Gaur, J. P. (1999). Heavy-metal-induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris*. *New Phytol.*, **143**, 253-259.
- Muhling, K.H. ve Lauchli, A. (2002). Effect of salt stress on growth and cation compartmentation in leaves of two plant species differing in salt tolerance. *J. Plant Physiol.*, **159**, 137-146.
- Muhling, K.H. ve Lauchli, A. (2003). Interaction of NaCl and Cd stress on compartmentation pattern of cations, antioxidant enzymes and proteins in leaves of two wheat genotypes differing in salt tolerance. *Plant and Soil*, **253**, 219-231.
- Murphy, L.R., Kinsey, S.T., ve Durako, M.J. (2003). Physiological effects of short-term salinity changes on *Ruppia maritima*. *Aquat. Bot.*, **75**, 293-309.
- Muthukumarasamy, M., Gupta, S.D., ve Pannerselvam, R. (2000). Enhancement of peroxidase, polyphenol oxidase and superoxide dismutase activities by triadimefon in NaCl stressed *Raphanus sativus* L. *Biol. Plant.*, **43**, 317-320.
- Nalimova, A.A., Popova, V.V., Tsoglin, L.N., ve Pronina, N.A. (2005). The effects of copper and zinc on *Spirulina platensis* growth and heavy metal accumulation in its cells. *Russ. J. Plant Physiol.*, **52**, 229-234.
- Nielsen, F., Mikkelsen, B.B., Nielsen, J.B., Andersen, H.R., ve Grandjean, P. (1997). Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clin. Chem.*, **43**, 1209-1214.
- Özata, A., Kıvanç, M., ve Kılıç, A.Y. (1999). *Canlılar ve Çevre*. Biyoloji, Açıköğr. Fak. Yay. No: 599, 259s.
- Panda, S.K. ve Upadhyay, R.K. (2003). Salt stress injury induces oxidative alterations and antioxidative defence in the roots of *Lemna minor*. *Biol. Plant.*, **48**, 249-253.
- Panou-Filotheou, H., Bosabalidis, A.M., ve Karataglis, S. (2001). Effects of copper toxicity on leaves of oregano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*). *Ann. Bot.* **88**, 207-214.
- Parida, A., Das, A.B., ve Das, P. (2002). NaCl stress causes changes in photosynthetic pigments, proteins and other metabolic components in the leaves of a true mangrove, *Bruguiera parviflora*, in hydroponic cultures. *J. Plant Biol.*, **45**, 28-36.
- Parida, A.K. ve Das, A.B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: A Review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **60**, 324-349.
- Pinto, E., Sigaud-Kutner, T.C.S., Leitao, M.A.S., Okamoto, O.K., Morse, D., ve Colepicolo, P. (2003). Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J. Phycol.*, **39**, 1008-1018.

- Pirlak, L. ve Eşitken, A. (2004). Salinity effects on growth, proline and ion accumulation in strawberry plants. *Plant Soil Sci.*, **54**, 189-192.
- Prasad, M.N.V. (2004). *Heavy Metal Stress in Plant: from biomolecules to ecosystems*. 2nd edn. Springer-Verlag, Heidelberg, Narosa, New Delhi, 462s.
- Prasad, M.N.V. ve Strzalka, K. (1999). Impact of heavy metals on photosynthesis. In: Prasad, M.N.V., Hagemeyer, J. (Eds), *Heavy Metal in Plants*, Springer Publishers, Berlin, s 117-138.
- Quartacci, M.F., Pinzino, C., Sgherri, C.L.M., Dalla Vecchia, F., ve Navari-Izzo, F. (2000). Growth in excess copper induces changes in the lipid composition and fluidity of PSII-enriched membranes in wheat. *Physiol. Plant.*, **108**, 87-93.
- Raven, J.A., Evans, M.C.,W., ve Korb, R.E. (1999). The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms. *Photosynth. Res.*, **60**, 111-149.
- Reddy, M.P. ve Vora, A.B. (1986). Changes in pigment composition, Hill reaction activity and saccharides metabolism in Bajra (*Pennisetum typhoides* S&H) leaves under NaCl salinity. *Photosynthetica*, **20**, 50-55.
- Reddy, M.P., Sanish, S., ve Iyengar, E.R.R. (1992). Photosynthetic studies and compartmentation of ions in different tissues of *Salicornia brachiata* Roxb. under saline conditions. *Photosynthetica*, **26**, 173-179.
- Rhodes, D. ve Hanson, A.D. (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulphonium compounds in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **44**, 357-384.
- Rout, N. P. ve Shaw, B. P. (2001). Salt tolerance in aquatic macrophytes: possible involvement of the antioxidative enzymes. *Plant Sci.*, **160**, 415-423.
- Sadmann, G. ve Boger, P. (1980). Copper-mediated lipid peroxidation processes in photosynthetic membranes. *Plant Physiol.*, **66**, 797-800.
- Salerno, G.L., Porchia, A.C., Vargas, W.A., ve Abdian, P.L. (2004). Fructose-containing oligosaccharides: novel compatible solutes in *Anabaena* cells exposed to salt stress. *Plant Sci.*, **167**, 1003-1008.
- Schlösser, U.G. (1982). Sammlung von Algenkulturen. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, **95**, 181-276.
- Singh, S.K., Sharma, H.C., Goswami, A.M., Datta, S.P., ve Singh, S.P. (2000). *In vitro* growth and leaf composition of grapevine cultivars as affected by sodium chloride. *Biol. Plant.*, **43**, 283-286.
- Siripornadulsil, S., Traina, S., Verma, D.P., ve Sayre, R.T. (2002). Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *Plant Cell.*, **14**, 2837-2847.
- Smirnoff, N. ve Cumbes, Q.J. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, **28**, 1057-1060.
- Solisio, C., Lodi, A., Torre, P., Converti, A., ve Borghi, M.D. (2006). Copper removal by dry and rehydrated biomass of *Spirulina platensis*. *Bioresour. Technol.*, **97**, 1756-1760.

- Srivastava, A., Bhargava, P., ve Rai, L. (2005). Salinity and copper-induced oxidative damage and changes in the antioxidative defence systems of *Anabaena doliolum*. *W. J. Microbiol. Biotech.*, **21**, 1291-1298.
- Steiger, H.M., Beck, E., ve Beck, R. (1977). Oxygen concentration in isolated chloroplasts during photosynthesis. *Plant Physiol.*, **60**, 903-906.
- Sudhir, P.R., Pogoryelov, D., Kovacs, L., Garab, G., ve Murthy, S.D.S. (2005). The effects of salt stress on photosynthetic electron transport and thylakoid membrane proteins in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *J. Biochem. Mol. Bio.*, **38**, 481-485.
- Surosz, W. ve Palinska, K. A. (2004). Effects of heavy metal stress on cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **48**, 40-48.
- Tanga, D., Shia, S., Li, D., Hu, C., ve Liu, Y. (2007) Physiological and biochemical responses of *Scytonema javanicum* (cyanobacterium) to salt stress. *J. Arid Environ.*, **71**, 312-320.
- Van Assche, F. ve Clijsters, H. (1990). Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.*, **13**, 195-206.
- Vonshak, A., Guy, R., ve Guy, M. (1988). The response of the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* to salt stress. *Arch. Microbiol.*, **150**, 417-420.
- Walbot, V. ve Cullis, C.A. (1985). Rapid genomic change in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **36**, 367-396.
- Wang, Y. ve Nil, N. (2000). Changes in chlorophyll, ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*, **75**, 623-627.
- Wise, R.R. ve Naylor, A.W. (1987). Chilling-enhanced photooxidation: evidence for the role of singlet oxygen and endogenous antioxidants. *Plant Physiol.*, **83**, 278-282.
- Wu, J.T., Hsieh, M.T., ve Kow, L.C. (1998). Role of proline accumulation in response to toxic copper in *Chlorella* sp. (chlorophyceae) cells. *J. Phycol.*, **34**, 113-117.
- Yakıt, S. ve Tuna, A.L. (2006). Tuz stresi altındaki mısır bitkisinde (*Zea mays* L.) stres parametreleri üzerine Ca, Mg ve K'nın etkileri. *Akdeniz Üni. Zir. Fak. Derg.*, **19**, 59-67.
- Yruela, I. (2005). Copper in plants, *Braz. J. Plant Physiol.*, **17**, 145-146.
- Zengin, F.K. ve Munzuroğlu, Ö. (2004). Effects of lead (Pb) and copper (Cu) on the growth of root, shoot and leaf of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *G.U. J. Sci.*, **17**, 1-10.
- Zhifang, G. ve Loescher, W.H. (2003). Expression of a celery mannose 6- phosphate reductase in *Arabidopsis thaliana* enhances salt tolerance and induces biosynthesis of both mannitol and a glucosyl-mannitol dimer. *Plant Cell Environ.*, **26**, 275-283.