

Krom (Cr⁺⁶)'a Maruz Bırakılmış *Ceratophyllum demersum* L.' un Biyolojik Cevabı

Fatih Duman^{1,*}, Serkan Şahan², Ahmet Ceylan¹, Fatih Doğan Koca¹

¹Erciyes Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 38039 Kayseri, Türkiye

²Erciyes Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, 38039 Kayseri, Türkiye

*Yazışılan yazar e-posta: fduman@erciyes.edu.tr

Alınış:05 Temmuz 2010, Kabul: 25 Ağustos 2010

Özet: Krom (Cr), endüstrideki yaygın kullanımı nedeniyle ciddi bir kirletici durumuna gelmiştir. Özellikle Cr⁺⁶ formunun Cr⁺³ formundan daha toksik olarak değerlendirilmektedir. Bu çalışmada, sucul bir bitki olan *Ceratophyllum demersum* L.'nin Cr⁺⁶ ya karşı oluşturduğu biyolojik cevabın incelenmesi amaçlanmıştır. *C. demersum* örnekleri 6 gün boyunca 1, 5 ve 10 mM Cr (K₂Cr₂O₇)'a maruz bırakılmıştır. Cr akümüasyonu, bitki büyümesi, lipid peroksidasyonu, iyon kaçıışı, fotosentetik pigmentasyon, protein ve prolin içeriğinin konsantrasyona bağlı değişimleri incelenmiştir. *C. demersum*'un önemli miktarda Cr'u akümüle edebildiği belirlenmiştir. En yüksek Cr konsantrasyonu, 10 mM Cr uygulamasında 19.6 mmol g⁻¹ (kuru ağırlık) olarak bulunmuştur. Genel olarak, Cr akümüasyonuna karşı *C. demersum* büyüme oranı ve fotosentetik pigmentasyonda azalma; iyon kaçıışı, lipid peroksidasyonunda ise artış ile cevap vermiştir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular, sucul bitkiler kullanılarak kirletilmiş suların arıtımı çalışmaları için faydalı olabilir.

Anahtar kelimeler: *Ceratophyllum demersum*, krom, büyüme oranı, lipid peroksidasyonu

Biological Responses of *Ceratophyllum demersum* L. Exposed to Chromium (Cr⁺⁶)

Abstract: Due to its widespread industrial use, chromium (Cr) has become a serious pollutant. In particular, the hexavalent form of the metal, Cr⁺⁶, is considered a more toxic species than the Cr⁺³ form. The objective of the present study is to investigate biological responses of *Ceratophyllum demersum* L., which is an aquatic plant, against chromium exposure. *C. demersum* samples were exposed to 1, 5, and 10 mM of Cr (K₂Cr₂O₇) for 6 days. The accumulation of Cr, plant growth, lipid peroxidation, ion leakage, photosynthetic pigmentation, protein and proline content was examined depending on concentration changes. It was determined that *C. demersum* could accumulate considerable amounts of Cr. The highest Cr accumulation value was observed as 19.6 mmol g⁻¹ (dry weight) at 10 mM Cr application. In general, growth rate and photosynthetic pigmentation decreased as a response to Cr accumulation whereas ion leakage, lipid peroxidation increased. The findings of the present study may be useful for phytoremediation of polluted water using aquatic plants.

Key words: *Ceratophyllum demersum*, chromium, growth rate, lipid peroxidation

1. Giriş

Krom (Cr) genel olarak; kanalizasyon, elektro kaplama, tabakhane, demir ve çelik fabrikalarından gelen atık sularda bulunan toksik metallere biridir [1]. Cr, suda Cr(III) ve Cr(VI) formlarında bulunur. Cr⁺⁶, Cr⁺³, ten hem daha toksiktir, hem de hareketliliği (mobilite) daha yüksektir [2]. Cr'un bu iki formu da bitkiler tarafından alınabilir [3]. Bitkiler için kuru ağırlıklarında bulunan 100 gr kg⁻¹ Cr'un toksik olduğu belirtilmektedir. Cr bitki hücresi içerisine girdiğinde, bitki büyümesi ve biyokütlesinde azalma, klorozis, membran hasarları ve antioksidant aktivitesinde değişiklikler gibi

fizyolojik ve biyokimyasal değişimler meydana gelir [2,4-5]. Cr stresine maruz bırakılan bitkilerin reaktif oksijen türleri ürettiği bilinmektedir [6]. Bitkiler bu reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerini en aza indirmek için antioksidant enzim ve antioksidant moleküllerden meydana gelmiş etkili bir savunma sisteme sahiptirler [7]. Metal stresine maruz kalmış bitkilerde meydana gelen diğer bir reaksiyon şekli ise serbest prolin gibi özel metabolitlerin akümüle edilmesidir. Prolin, stres altındaki birçok bitkide reaktif oksijen türleri tarafından meydana gelen hasara karşı bitkinin savunma sistemini desteklemek için biriktirilir. Prolin ayrıca osmoregülasyon, enzimlerin korunması, protein sentez sisteminin dengelenmesi ve hücre içi asitliğin düzenlenmesi gibi birçok olayda önemli roller üstlenir.

500 mg kg⁻¹ Cr içeren bitkiler (kuru ağırlıklarında) hiperakümülatör olarak değerlendirilmektedir [8]. Daha önce yapılan çalışmalar, sucul bitkilerin doku ve organlarında önemli miktarda Cr biriktirebildiğini göstermiştir [9,10]. Avgustynowicz vd. [11], yaygın bir yüksek su bitkisi olan *Callitriche cophocapha* bitkisinin seçkin bir Cr akümülatörü olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmada kullanılan *Ceratophyllum demersum* L. suya batık köksüz bir bitkidir ve ağır metallerin atık sularından arıtımı için sıklıkla kullanılmaktadır. Marchese vd. [12] dört farklı tatlı su türünün (*Ceratophyllum demersum*, *Limnodrilus udeke mianus*, *Zilchiopsis collastinensis*, *Cnesterodon decemmaculatus*) Cr biyoakümülyasyon özelliklerini incelemişler, sonuç olarak *Ceratophyllum demersum*'un Cr biyoakümülyasyonunun diğer türlerden daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. *Ceratophyllum demersum*'un Cr akümülyasyon özellikleri ile ilgili araştırmalar yapılmış olmasına rağmen, bu bitkilerin kroma maruz bırakıldığında oluşturulan biyolojik cevap ile ilgili bilgilerimiz oldukça azdır.

Bu çalışmada, *C. demersum* bitkisi model bitki olarak kullanılmış ve Cr akümülyasyonuna bağlı olarak bitki büyümesi, lipit peroksidasyonu, fotosentetik pigmentasyon, iyon kaçışı, protein ve prolin içeriğinin konsantrasyona bağlı olarak değişiminin incelenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar sucul bitkiler kullanılarak kirletilmiş suların temizlenmesi çalışmalarında ve bitki yaşamı ile sucul ekosistem arasındaki etkileşimin anlaşılmasında faydalı olabilir.

2. Materyal ve Metot

C. demersum örnekleri Mayıs 2009 tarihinde Sultan Sazlığı'ndan toplanarak laboratuvara getirildi. Laboratuvarda örnekler önce çeşme suyu ardından distile su ile yıkandı. %10'luk Hoagland solüsyonu içeren kaplar içerisinde üç gün süre ile iklimlendirme dolabında laboratuvar ortamına alıştırdı. İklimlendirme dolabının sıcaklığı 15 °C, bağıl nem %70, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık olacak şekilde ayarlandı.

2.1. Deney düzeneęi

Deneylere başlamadan önce kaplar %1'lik NaClO ile 3-5 kez dezenfekte edildi. Daha sonra 3 kez distile su ile yıkandı [13]. Deneyler üç seri halinde kuruldu ve her bir serideki her bir behere yaklaşık olarak 5 gr bitki konuldu. Krom stok solüsyonu hazırlandı. Bitkiler 400 ml'lik beherglaslar içerisinde %10'luk Hoagland içeren 1, 5 ve 10 mM Cr⁺⁶ (K₂Cr₂O₇) konsantrasyonlarına maruz bırakıldı [14]. Beherler iklimlendirme dolabına yerleştirilerek yukarıda bahsedilen şartlarda altı gün boyunca

tutuldu. Deneyin bitiminde bitki örnekleri plastik elek yardımı ile süzülerek alındı. Daha sonra örnekler distile su ile yıkandı ve 2 dakika süre ile kağıt havlu üzerinde bekletilerek suyu alındı. Bitkilerin ağırlığı tartılarak not edildi.

2.2. Krom miktarının belirlenmesi

Kurulanmış örneklerden bir kısmı alınarak etüv içerisinde 70°C' de kurutuldu. Kurutulan örneklerden yaklaşık 0.5 gr alınarak 10ml HNO₃ (Merck) içerisinde CEM Mars 5 model mikrodalga fırında çözüldü (CEM Corporation Matthews, NC, USA). Mikrodalga çözme sisteminin çözündürme koşulları maksimum güç 1200 Watt, güç %100, ramp 20 dakika, basınç 180 Psi, sıcaklık 210°C ve bekletme süresi 10 dakika olacak şekilde ayarlandı. Çözme işleminden sonra örnekler santrifüj edildi ve deiyonize su kullanılarak örneklerin hacmi 25ml'ye tamamlandı. Cr tayinide Perkin Elmer Analyst A800 model atomik absorpsiyon spektrometresi kullanıldı. Cihazın stabilitesini değerlendirmek için her on örnekte bir standart okuması yapıldı. Analitik yöntemi ve olası kontaminasyonu belirlemek için kör solüsyonu hazırlandı. Örnekler 3 kez analiz edildi.

2.3. Göreceli büyüme oranı (GBO)

GBO değerleri, her bir uygulama için Cedergreen [15] referans alınarak $RGR = \frac{\ln(W_2) - \ln(W_1)}{(t_2 - t_1)}$ formülüne göre hesaplandı. Formülde, W₁ değeri deneyin başlangıcındaki bitki ağırlığı, W₂ deneyin bitimindeki bitki ağırlığını, (t₂-t₁) ise deneyin periyodunu göstermektedir.

2.4. İyon kaçıışı

İyon kaçıışı, elektriksel iletkenlik değişimi ölçülerek bulundu [16]. 500mg bitki örneği alınıp 100ml deiyonize su bulunan beher içerisinde 24 saat bekletildi. Suyun elektriksel iletkenlik değerleri WTW Multi 3400i marka iletkenlik ölçer ile ölçülerek kaydedildi.

2.5. Lipit peroksidasyonu

Bitki örneklerinden 500 mg alınarak, %20'lik triklor asetik asit ve %5'lik tiobarbitürik asit (toplam 3ml) içerisinde homojenize edildi. Homojenat 30 dakika süre ile 95 °C'de inkübe edildi ve süre sonunda reaksiyonu durdurmak için buz içerisine konuldu. Örnekler 10 dakika süre ile 10000 x g' de santrifüj edildi. Süpernatantın 532 ve 600nm'deki absorbans değerleri ölçüldü. Malondialdehit (MDA) miktarı, Heath and Packer [17]'in önerdiği formülüne göre hesaplandı.

2.6. Protein tayini

500 mg bitki örneği, 0.1mM EDTA ve %1'lik Polivinilpirolidon (PVP) içeren 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0) içerisinde homojenize edildi. Homojenat 15 000 x g' de ve +4°C' de 15 dakika santrifüj edildi. Protein içeriği, Lowry vd. [18]' in metoduna göre sığır serum albümini standart alınarak tayin edildi.

2.7. Klorofil ve karotenoid tayini

100 mg bitki örneği alınarak, 10 ml aseton içerisinde ekstrakte edildi ve 1 gece karanlıkta buzdolabında tutuldu. Daha sonra 4000 x g' de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantın 480, 510, 645, 663 nm.' deki absorbans değerleri kaydedildi. Klorofil içeriğinin hesaplanmasında Arnon [19], karotenoid içeriğinin hesaplanmasında ise Duxbury ve Yentsch [20] tarafından geliştirilen formüller kullanıldı.

2.8. Prolin tayini

Prolin miktarının belirlenmesinde, Bates [21]' in metodu modifiye edilerek kullanıldı. Serbest prolin içeriği, 0.25 gr bitki örneği %3' lük sulu sülfosalisilik asit içerisinde ekstrakte edildi ve ninhidrin reaktifi kullanılarak tahmin edildi. Üst fazın absorbanansı toluen körüne karşı 520 nm'de ölçülerek kaydedildi.

2.9. İstatistik

Deneyler üç tekrarlı olarak yapıldı (n=3). Dataların normal dağılıp dağılmadığını ve varyansların homojenliğini test etmek için Kolmogorov-Smirnov ve Levene testleri kullanıldı. Varyansların heterojenitesi durumunda ise datalara ln (x+1) dönüşümü uygulandı. Uygulamalar arasındaki farklılığın önemliliğini test etmek için ANOVA ve post-hoc Tukey tesleri yapıldı. Ayrıca çalışılan parametreler arasındaki ilişkiyi belirlemek için korelasyon testi yapıldı. İstatistiksel önemlilik eşik değeri olarak 0.05 kabul edildi. Tüm istatistiksel analizler SPSS 15.0 paket programı ile yapıldı.

3. Bulgular

3.1. Cr akümülyasyonu

Farklı konsantrasyonlarda Cr⁺⁶, ya maruz bırakılmış *C. demersum* örneklerinde konsantrasyon artışına bağlı olarak Cr akümülyasyonunun arttığı belirlendi (Tablo 1). Tablo 2'den de görüleceği gibi, Cr⁺⁶, nın uygulama konsantrasyonu ile bitki tarafından akümüle edilen Cr konsantrasyonu arasında pozitif yönde bir ilişki bulundu (r= 0.930).

3.2. GBO

5 ve 10 mM Cr uygulamasının GBO değerlerini önemli derecede düşürdüğü belirlendi. Kontrol örnekleri ile 1mM Cr⁺⁶ uygulanmış *C. demersum* örneklerinin GBO değerleri arasında önemli bir istatistiksel fark gözlenmedi. 5 ve 10 mM Cr uygulamalarında, GBO değerlerinin negatif olduğu belirlendi. Ancak 5 ve 10 mM Cr⁺⁶ uygulamaları arasında önemli bir fark görülmedi. Ayrıca, bitki tarafından akümüle edilen Cr konsantrasyonu ile GBO değerleri arasında zıt yönlü bir ilişkinin olduğu saptandı (r= - 0.857).

3.3. İyon kaçıışı

Elektriksel iletkenlik değerlerinin, bitkilerin maruz bırakıldığı Cr⁺⁶ konsantrasyonu artışına bağlı olarak arttığı belirlendi. EC değerleri ile Cr akümülyasyonu arasında pozitif yönde önemli bir korelasyon olduğu saptandı (r= 0.984).

3.4. Lipid peroksidasyonu ve protein içeriği

10 mM Cr⁺⁶ uygulamasında, kontrole göre önemli miktarda MDA miktarı artışı belirlendi. 0.1 ve 0.5 mM Cr⁺⁶ uygulamaları için MDA düzeylerinde önemli bir değişiklik gözlenmedi. Ayrıca, MDA miktarı ile Cr akümülyasyonu arasında pozitif yönde bir ilişki gözlemlendi (R= 0.888). Protein içeriği açısından, 1mM Cr⁺⁶ uygulaması ile 5 ve 10 mM Cr⁺⁶ uygulamaları arasında istatistiksel bir fark belirlendi. Ancak, Cr akümülyasyonu ile protein içeriği arasında istatistiksel bir ilişki belirlenemedi (r= - 0.511).

Tablo 1. Farklı konsantrasyonlarda Cr (Cr⁺⁶)'a maruz bırakılmış *Ceratophyllum demersum* bitkisinde Cr akümüasyonu, göreceli büyüme oranı, elektriksel iletkenlik, MDA ve protein miktarları.

Cr (Cr ⁺⁶)	Cr akümüasyonu (mmol g ⁻¹ , k.a)	GBO	Eİ (mmhos cm ⁻¹ g ⁻¹ y.a)	MDA (µ mol g ⁻¹ y.a)	Protein (mg g ⁻¹ y.a)
0 mM	0.03 ± 0.002 ^a	0.02 ± 0.005 ^b	8.3 ± 0.5 ^a	11.24 ± 1.6 ^a	9.92 ± 0.6 ^{ab}
1 mM	8.49 ± 0.7 ^b	0.018 ± 0.001 ^b	14.4 ± 1.5 ^b	11.82 ± 1.3 ^a	11.25 ± 0.6 ^b
5 mM	10.92 ± 0.79 ^c	-0.0006 ± 0.002 ^a	19.3 ± 1.56 ^c	14.73 ± 1 ^{ab}	7.17 ± 0.5 ^a
10 mM	19.46 ± 1.44 ^d	-0.004 ± 0.002 ^a	29.2 ± 1.68 ^d	18.1 ± 1.5 ^b	7.16 ± 0.6 ^a
F-ratio	241.35***	67.27***	120.39***	15.81**	8.01**

Değerler üç bağımsız tekrarın ortalaması ± standart hata olarak verilmiştir. Aynı harfle gösterilen değerler arasında P<0.05'e göre istatistiksel olarak bir fark yoktur. k.a : kuru ağırlık; y.a : yaş ağırlık; ** P < 0.01; *** P < 0.001.

Tablo 2. Akümü edilen Cr konsantrasyonu ile diğer çalışılan parametreler arasındaki korelasyon katsayısı değerleri

	Cr (Başlangıç)	Cr akümüasyonu	GBO	Eİ	MDA	KI-a	KI-b	Toplam KI	Carotenoid	Protein	Prolin
Cr (Başlangıç)	1										
Cr_akümüasyonu	0.930(**)	1									
GBO	-0.920(**)	-0.857(**)	1								
Eİ	0.970(**)	0.984(**)	-0.876(**)	1							
MDA	0.925(**)	0.888(**)	-0.787(**)	0.946(**)	1						
KI-a	-0.816(**)	-0.829(**)	0.959(**)	-0.810(**)	-0.695(*)	1					
KI-b	-0.682(*)	-0.383	0.691(*)	-0.495	-0.518	0.511	1				
Toplam KI	-0.684(*)	-0.785(**)	0.848(**)	-0.718(**)	-0.541	0.948(**)	0.268	1			
Karotenoid	-0.828(**)	-0.867(**)	0.944(**)	-0.834(**)	-0.703(*)	0.991(**)	0.456	0.968(**)	1		
Protein	-0.723(**)	-0.511	0.851(**)	-0.565	-0.492	0.768(**)	0.888(**)	0.627(*)	0.731(**)	1	
Prolin	-0.507	-0.326	0.607(*)	-0.338	-0.172	0.519	0.779(**)	0.433	0.503	0.840(**)	1

** Korelasyon 0.01 seviyesinde önemlidir.

* Korelasyon 0.05 seviyesinde önemlidir.

3.5. Fotosentetik pigmentasyon

Tablo 3' den de görüldüğü gibi, 1mM Cr⁺⁶ uygulaması klorofil a miktarını önemli düzeyde düşürdü. 1mM ve 5 mM Cr⁺⁶ uygulamaları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulundu. Ancak 5 ve 10 mM Cr⁺⁶ uygulamaları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark belirlenmedi. Ayrıca, bitki tarafından akümüle edilen Cr konsantrasyonu ile klorofil a miktarı arasında negatif yönde bir ilişki ($r = -0.829$) bulundu.

Klorofil b düzeylerinde, kontrol uygulamasına göre 1mM Cr⁺⁶ uygulamasında önemli bir artışın olduğu belirlendi. 0.5 ve 10 mM Cr⁺⁶ uygulamaları arasında önemli bir fark belirlenemedi. Klorofil b miktarı ile akümüle edilen Cr konsantrasyonu arasında da istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamadı ($r = -0.383$).

Toplam klorofil dikkate alındığında, kontroldeki toplam klorofil içeriğinin, diğer Cr⁺⁶ uygulamalarına göre yüksek olduğu belirlendi. Ayrıca, toplam klorofil içeriği ile Cr akümülyasyonu arasında zıt yönde bir ilişki ($r = -0.785$) belirlendi.

Karotenoid miktarı açısından değerlendirme yapıldığında, kontrol ile 5mM Cr⁺⁶ uygulaması arasında konsantrasyon artışına bağlı olarak bir azalma gözlemlendi. 5mM ve 10mM Cr⁺⁶ uygulamaları arasında ise istatistiksel bir fark gözlemlenmedi. Karotenoid içeriği ile Cr akümülyasyonu arasında zıt yönde ($r = -0.867$) bir ilişkinin olduğu saptandı.

3.6. Prolin içeriği

1 mM Cr⁺⁶ uygulamasındaki prolin düzeyinin, 10 mM Cr⁺⁶ uygulamasına göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu belirlendi. Ancak, akümüle edilen Cr konsantrasyonu ile prolin miktarı arasında önemli bir korelasyonun olmadığı saptandı ($r = -0.326$).

Tablo 3. Farklı konsantrasyonlarda Cr (Cr⁺⁶)'a maruz bırakılmış *Ceratophyllum demersum* bitkisinde fotosentetik pigmentler ve prolin miktarları (n=3).

Cr (Cr ⁺⁶)	Klorofil a (mg g ⁻¹ y.a)	Klorofil b (mg g ⁻¹ y.a)	Toplam klorofil (mg g ⁻¹ y.a)	Karotenoid (mg g ⁻¹ y.a)	Prolin (μ mol g ⁻¹ y.a)
0 mM	0.69 ± 0.04 ^c	0.24 ± 0.02 ^a	0.97 ± 0.04 ^c	1.9 ± 0.08 ^c	0.023 ± 0.002 ^{ab}
1 mM	0.55 ± 0.04 ^b	0.31 ± 0.02 ^b	0.69 ± 0.05 ^b	1.35 ± 0.14 ^b	0.028 ± 0.003 ^b
5 mM	0.34 ± 0.02 ^a	0.22 ± 0.1 ^a	0.55 ± 0.04 ^a	0.83 ± 0.09 ^a	0.019 ± 0.002 ^{ab}
10 mM	0.37 ± 0.02 ^a	0.2 ± 0.1 ^a	0.59 ± 0.07 ^{ab}	0.82 ± 0.08 ^a	0.014 ± 0.001 ^a
F-ratio	79.28***	21.38***	39.41***	78.24***	6.63**

Değerler üç bağımsız tekrarın ortalaması ± standart hata olarak verilmiştir. Aynı harfle gösterilen değerler arasında P<0.05'e göre istatistiksel olarak bir fark yoktur. y.a : yaş ağırlık; ** P < 0.01; *** P < 0.001

4. Tartışma

Sucul bitkilerin atıksulardan metalleri ve diğer kirleticileri akümüle ettikleri bilinmektedir. *Borreria scabiosoides* ve *Eichornia crassipes* gibi sucul bitkilerin önemli miktarda Cr'u bünyesinde biriktirdiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Örneğin, Zayed and Terry [22], *Eichornia crassipes*'in sucul çevreler için Cr fitoremediyatörü olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmada da, Cr⁺⁶'nın *C. demersum* tarafından etkin bir şekilde alındığı ve Cr alınımı ile bitkiyi çevreleyen ortamdaki Cr düzeyi arasında pozitif yönde bir ilişkinin olduğu belirlenmiştir. Vajpayee vd. [3], sucul bir bitki olan *Nymphaea alba*'nın 2233 μg⁻¹ Cr (kuru ağırlık) akümüle edebildiğini belirlemiştir.

Bizim çalışmamızda en yüksek Cr konsantrasyonu 10 mM Cr uygulamasında 19.6 mmol g⁻¹ (kuru ağırlık) olarak bulunmuştur. Cr'un bitkilerin biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri üzerine olumsuz etkileri ile ilgili bilgilerimiz vardır. Cr⁺⁶ iyonu, sülfonat iyonik kanalları yoluyla hücre membranından geçer, sitoplazmaya dahil olur ve hücre içi materyalle reaksiyona girer [23]. GBO, toksik kimyasalların bitkiler üzerine fizyolojik etkilerini değerlendirmede kullanılan önemli bir parametredir. Bu çalışmada, 5 mM Cr⁺⁶ uygulamasının GBO değerini önemli miktarda düşürdüğü belirlenmiştir. Vajpayee vd. [24] yaptıkları benzer bir çalışmada, sucul bitki olan *Vallisneria spiralis*'in Cr'a maruz bırakıldığında bitki biyokütlesinin azaldığını belirlemişlerdir. Bu durumun sebebi hücre zarı ve hücre duvarında meydana gelen yıkım ve hasarlar olabilir. Ağır metaller, reaktif oksijen türlerinin üretimine sebep olur ve oluşan bu radikaller hücresel bileşenlere önemli miktarda hasar verir. Membran lipitleri ve proteinler serbest radikaller tarafından saldırıya açıktır ve bitkilerdeki oksidatif stresin güvenilir bir indikatörü olarak değerlendirilirler [25]. Bu çalışmada, 1mM Cr uygulamasının MDA düzeyini önemli miktarda değiştirmediği, dolayısıyla bu konsantrasyonun bitkinin hücre membranları üzerlerine fazla etkili olmadığı görülmektedir. Ancak, 10 mM Cr uygulamasındaki lipit peroksidasyonunun 0 ve 1 mM Cr⁺⁶ uygulamalarına göre yüksek olduğu belirlenmiştir. Cr konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak MDA düzeyindeki artış oksidatif stresin varlığını işaret etmektedir. Buradan yüksek konsantrasyonlarda Cr uygulamasının sucul bitkilerin hücre zarı dayanıklılığı üzerinde olumsuz etkilerinin olabileceği sonucuna varılabilir. Ayrıca elektriksel iletkenlik değerlerinin konsantrasyon bağımlı artışı da bu sonucu desteklemektedir.

Ganesh vd. [4], su marulu (*Pistia stratiotes*) bitkisinin klorofil ve karotenoid miktarlarının Cr maruziyetinden önemli derecede etkilendiğini belirlemişlerdir. Ayrıca, bu parametrelerin konsantrasyon artışına bağlı olarak düştüğünü de kaydetmişlerdir. Ayrıca, Gallego vd. [26] ve Sinha vd. [27] tarafından da benzer sonuçlara ulaşılmıştır. Bizim bulgularımız da bu sonuçlarla uyum içerisindedir. Cr'un bitkiler tarafından absorplanarak pigment metabolizmasını bozduğu bilinmektedir [28]. Yüksek konsantrasyonlarda metal maruziyeti nedeniyle klorofil ve karotenoid miktarlarındaki azalmasının nedeni, pigment metabolizması ile Cr'un interferansı ile olmalıdır. Cr maruziyeti nedeniyle klorofil içeriğindeki azalma, klorofil biyosentezinin önemli enzimleri olan α -aminolevulinic asit dehidrojenaz (α -ALAD) ve fotoklorofilid redüktaz enzimlerin inhibasyonu sebebiyle de olabilir. Vajpayee vd. [3] çeşitli düzeylerde Cr varlığında *Nymphaea alba*'nın klorofil ve toplam klorofil içeriğinin düştüğünü belirlemiştir. Ayrıca, bu araştırmacılar Cr toksisitesine karşı klorofil a' nın klorofil b' den daha hassas olduğunu belirlemişlerdir. Bu sonuca benzer olarak, bizim çalışmamızda da klorofil a'nın Cr maruziyetine karşı daha hassas olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada, 1mM Cr⁺⁶ uygulaması kontrole göre protein içeriğini bir miktar arttırmıştır, fakat protein içeriği yüksek Cr konsantrasyonlarında düşmüştür. Düşük Cr uygulamasında protein miktarındaki artışın sebebi, stres koşullarında serbest radikallere karşı oluşturulan antioksidant enzim miktarındaki artış olabilir. Yüksek konsantrasyonlarda protein içeriğindeki düşüş, reaktif oksijen türlerinin etkilemesi nedeniyle proteinlerin degradasyonuna bağlanabilir [29]. Ağır metaller, bitki içerisinde taşınırken farklı bölgelerdeki fonksiyonel sülfhidril gruplarına sahip birçok enzimi inhibe edebilir. Sonuç olarak bu yıkıcı etki nedeniyle protein sentez mekanizması bozulur [4].

Prolin, strese karşı oluşturulan savunma sistemi içerisinde yer alan önemli bir amino asittir. Prolinin metal iyonlarını kendine bağlayarak şelat oluşturma yeteneği vardır ve metal stresi altındaki bitkilerin hayatta kalma şanslarını artırır. Bu çalışmada 1 mM Cr⁺⁶ maruziyetinde istatistiksel olarak önemli olmayan bir artış görülmüştür. Sinha and Gupta [30], metal maruziyetinde, lipid peroksidasyonu nedeniyle hücre zarında hasar meydana geleceğini ve membran içeriğinin değişebileceği ve sonuç olarak prolin sentezinin artabileceğini belirtmiştir. Ancak, 10 mM Cr maruziyetinin prolin miktarını önemli derecede azalttığı belirlenmiştir. Bu azalmanın nedeni, prolin metabolizmasının bozulması olabilir.

5. Sonuç

C. demersum, Cr'ü etkili bir şekilde bünyesinde biriktirmektedir ve akümülyasyon konsantrasyonuna bağlıdır. Cr birikimine paralel olarak iyon kaçıışı ve lipid peroksidasyonunun artması ve fotosentetik pigment düzeyleri ve göreceli büyüme oranındaki düşme, bitkide fizyolojik ve biyokimyasal birtakım değişikliklerin meydana geldiğini göstermektedir. Bitkilerin toksik kimyasallara karşı oluşturduğu biyolojik cevabın belirlenmesi, atık suların bitkiler ile arıtımı çalışmaları için yararlı olacaktır.

Kaynaklar

- [1] Maine M.A., Suñé N.L., Lagger, S.C., 2004. Chromium bioaccumulation: comparison of the capacity of two floating aquatic macrophytes, *Water Research*, 38: 1494-1501.
- [2] Paiva L.B., Jurandi O.G., Azevedo R.A., Ribeiro D.R., Silva M.G., Vitória A.P., 2009. Ecophysiological responses of water hyacinth exposed to Cr³⁺ and Cr⁶⁺, *Environmental and Experimental Botany*, 65: 403-409.
- [3] Vajpayee P, Tripathi R.D., Rai U.N., Ali M.B., Singh S.N., 2000. Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L, *Chemosphere*, 41: 1075-1082.
- [4] Ganesh K.S., Baskaran L., Rajasekaran S., Sumathi K., Chidambaram A.L.A., Sundaramoorthy P., 2008. Chromium stress induced alterations in biochemical and enzyme metabolism in aquatic and terrestrial plants, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 63: 159-163.
- [5] Dazy M., Béraud E., Cotellet S., Meux E., 2008. Antioxidant enzyme activities as affected by trivalent and hexavalent chromium species in *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Chemosphere*, 73: 281-290.
- [6] Dhir B., Sharmila P., Saradhi P.P., Nasim S.A., 2009. Physiological and antioxidant responses of *Salvinia natans* exposed to chromium-rich wastewater, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 1790-1797.
- [7] Meharg A.A., 1994. Integrated tolerance mechanisms-constitutive and adaptive plant-responses to elevated metal concentrations in the environment. *Plant, Cell & Environment*, 17: 989-993.
- [8] Baker A.J.M., McGrath S.P., Reeves R.S., Smith J.A.C., 1998. Metal hyperaccumulator plant: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: Terry, N. and Bannelos, G.N. (eds.), *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*, pp. 85-107. Lewis Publ., FL, USA.
- [9] Mishra V.K., Tripathi B.D., 2009. Accumulation of chromium and zinc from aqueous solutions using water hyacinth (*Eichhornia crassipes*), *Journal of Hazardous Materials*, 164: 1059-1063.
- [10] Choo T.P., Lee C.K., Low K.S., Hishamuddin O., 2006. Accumulation of chromium (VI) from aqueous solutions using water lilies (*Nymphaea spontanea*), *Chemosphere*, 62: 961-967.
- [11] Augustynowicz J., Grosicki M., Hanus-Fajerska E., Lekka M., Waloszek A., Kołoczek H., 2010. Chromium(VI) bioremediation by aquatic macrophyte *Callitriche cophocarpa* Sendtn, *Chemosphere*, 79: 1077-1083.
- [12] Marches M., Gagneten A.M., Parma M.J., Pave P.J., 2008. Accumulation and elimination of chromium by freshwater species exposed to spiked sediments, *Archives of Environmental Contamination Toxicology*, 55: 603-609.

- [13] Hou W., Chen X., Song G., Wang Q., Chang C.C., 2007. Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*), *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 62-69.
- [14] Srivastava S., Mishra S., Tripathi R.D., Dwivedi S., Gupta D.K., 2006. Copper-induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatins in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle, *Aquatic Toxicology*, 80: 405-415.
- [15] Cedergreen N., 2008. Is the growth stimulation by low doses of glyphosate sustained over time, *Environmental Pollution*, 156 :1099–1104.
- [16] Devi S.R., Prasad, M.N.V., 1998. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: response of antioxidant enzymes and antioxidants, *Plant Science*, 13: 157–165.
- [17] Heath R.L., Packer L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125: 189–198.
- [18] Lowry O.H., Roenbrough N.J., Farr A.L., Randal E.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265–275.
- [19] Arnon D.I., 1949. Copper enzyme in isolated chloroplast polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*, *Plant Physiology*, 24: 1–15.
- [20] Duxbury A.C., Yentsch C.S., 1956. Plantkton pigment monograph, *Journal of Marine Resource*, 15: 93–101.
- [21] Bates L.S., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies, *Plant Soil*, 39: 205–207.
- [22] Zayed A., Terry N., 2003. Chromium in the environment: factors affecting biological remediation, *Plant Soil*, 249: 139–156.
- [23] Gikas P., Romanos P., 2006. Effects of trivalent Cr(III) and hexavalente Cr(VI) chromium on the growth of activated sludge, *Journal of Hazardous Material*, 133: 212–217.
- [24] Vajpayee P., Rai U.N., Ali M.B., Tripathi R.D., Yadav V., Sinha S., Singh S.N., 2001. Chromium induced physiologic changes in *Vallisneria spiralis* L. and its role in phytoremediation of tannery effluent, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 67: 246–256.
- [25] Palma J.M., Sandalio L.M., Corpas F.J., Romero-Puertas M.C., MaCarthy I., del Rio L.A., 2002. Plant proteases, protein degradation and oxidative stress: role of peroxisomes, *Plant Physiology and Biochemistry*, 40: 521–530.
- [26] Gallego S.M., Benavides M.P., Tomaro M.L., 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stres, *Plant Science*, 121: 151–159.
- [27] Sinha S., Saxena R., Singh S., 2005. Chromium induced lipid peroxidation in the plants of *Pistia stratiotes* L.: role of antioxidants and antioxidant enzymes, *Chemosphere*, 58: 595-604
- [28] Jana S., Choudhuri M.A., 1992. Senescence in submerged aquatic angiosperms: effects of heavy metals, *New Phytologist*, 90: 477–484.
- [29] Davies K.J.A., 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects, *Journal of Biological Chemistry*, 262: 9895–9901.
- [30] Sinha S., Gupta A.K., 2005. Translocation of metals from fly ash amended soil in the plant of *Sesbania cannabina* L. Ritz: Effect on antioxidants, *Chemosphere*, 61: 1204-1214.

Serkan Şahan e-posta: sahans@erciyes.edu.tr

Ahmet Ceylan e-posta: aceylan@erciyes.edu.tr

Fatih Doğan Koca e-posta: zambak_038@hotmail.com