

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

**SÜLFONAT GRUPLARI İLE SUBSTİTUE EDİLMİŞ SUDA ÇÖZÜNÜR
FİTALOSİYANİNLERİN *ARTHROSPIRA PLATENSIS*'İN GELİŞİMİ VE
ANTİOKSİDAN PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sena ÇAĞATAY ÖZPINAR

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Tuğba ONGUN SEVİNDİK

Mayıs 2019

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SÜLFONAT GRUPLARI İLE SUBSTİTUE EDİLMİŞ SUDA ÇÖZÜNÜR
FİTALOSİYANİNLERİN *ARTHROSPIRA PLATENSIS*'İN GELİŞİMİ VE
ANTİOKSİDAN PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

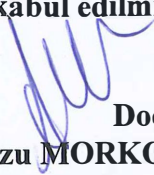
YÜKSEK LİSANS TEZİ

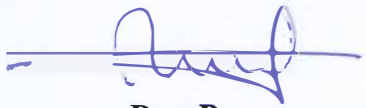
Sena ÇAĞATAY ÖZPINAR

Enstitü Anabilim Dalı

BİYOLOJİ

Bu tez 30/05/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.


Doç. Dr.
Arzu MORKOYUNLU YÜCE
Jüri Başkanı


Doç. Dr.
Tuğba ONGUN SEVİNDİK
Üye


Dr. Öğr. Üyesi
Ali DOĞRU
Üye

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Sena ÇAĞATAY ÖZPINAR

01.06.2019

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her konuda bilgi ve desteğini almaktan çekinmediğim, araştırmanın planlanmasından yazılmasına kadar tüm aşamalarında yardımlarını esirgemeyen, teşvik eden, aynı titizlikte beni yönlendiren değerli danışman hocam Doç. Dr. Tuğba ONGUN SEVİNDİK'e teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar olanakları konusunda anlayış ve yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Ali DOĞRU' ya ve bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım sayın hocam Arş. Gr. Dr. Hatice TUNCA'ya teşekkür ederim.

Var oluşlarından her zaman güç aldığım ve hayallerimi gerçekleştirmem de beni daima destekleyen sevgili babam Selahattin ÇAĞATAY, annem Saadet ÇAĞATAY ve kardeşim M. Talha ÇAĞATAY 'a, tez süresince her anımda yanımda olan eşim Osman ÖZPINAR'a, bu yola birlikte çıktığım dostum Aşkın Öykü ÇİMEN'e sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	x
SUMMARY	xi
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2.	
LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1. Fitalosiyaninler ve Tarihçesi	4
2.2. Fitalosiyaninlerin Genel Özellikleri	4
2.3. Fitalosiyaninlerin Sınıflandırılması.....	5
2.3.1. Fitalosiyaninlerin fiziksel özellikleri.....	5
2.3.2. Fitalosiyaninlerin kimyasal özellikleri	5
2.3.3. Fitalosiyaninlerin çözünürlüğü.....	6
2.4. Fitalosiyaninlerin Genel Sentez Metotları.....	6
2.4.1. Sübstitüe olmuş fitalosiyaninlerin sentezi.....	6
2.5. Fitalosiyaninlerin Kullanım Alanları	7
2.6. Fitalosiyaninlerin Sucul Ekosisteme Girişi ve Etkisi	8
2.7. Fitalosiyaninlerin Alg Hücrelerine Alımı	9
2.8. Alglerin Fitalosiyanini Uzaklaştırması.....	10
2.9. Çalışmada Kullanılan Fitalosiyaninler	10

2.9.1. 2(3),9(10),16(17),23(24)-Tetrakis-(Sodyum merkaptotanesulfonat)-bakır(II) fitalosiyenin.....	10
2.9.2. 2(3),9(10),16(17),23(24)-Tetrakis-(Sodyum merkaptotanesulfonat)-metalsiz fitalosiyenin.....	11
2.10. Oksidan ve Antioksidan Maddeler	11
2.11. Antioksidan Savunma Sistemleri	13
2.11.1. Süperoksit dismutaz (SOD).....	13
2.11.2. Askorbat peroksidaz (APOD)	14
2.11.3. Glutasyon redüktaz (GR).....	15
2.11.4. Prolin	15
2.11.5. Malondialdehit (MDA)	16
2.11.6. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	16
2.12. <i>Arthrospira Platensis</i>	17
2.13. Çalışmanın Amacı	18
 BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE METOD	19
3.1. Çalışma Materyali	19
3.2. Kullanılan Cihazlar	19
3.3. Yöntem	20
3.3.1. Hücre kültürünün hazırlanması	20
3.3.2. Uygulanan fitalosiyenin derişimleri	21
3.3.3. Deney ortamı ve düzeneği.....	21
3.4. Ölçüm ve Analizler	22
3.4.1. Optik yoğunluğun (OD) ve büyüme oranının belirlenmesi	22
3.4.2. Fotosentetik pigment analizi (Klorofil- <i>a</i>)	22
3.4.3. Toplam protein analizi	22
3.4.4. Süperoksit dismutaz enzim analizi (SOD)	23
3.4.5. Askorbat peroksidaz enzim analizi (APOD).....	23
3.4.6. Glutasyon redüktaz enzim analizi (GR)	24
3.4.7. Malondialdehit (MDA) analizi.....	24
3.4.8. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) analizi.....	25

3.4.9. Prolin analizi	25
3.4.10. İstatistiksel analizler	25
BÖLÜM 4.	
BULGULAR	26
4.1. Optik Yoğukluk (OD)	26
4.2. Fotosentetik Pigment Analizi (Klorofil- <i>a</i>)	28
4.3. Toplam Süperoksit Dismutaz Aktivitesi	30
4.4. Toplam Askorbat Peroksidaz Aktivitesi	31
4.5. Toplam Glutasyon Redüktaz Aktivitesi	33
4.6. Malondialdehit (MDA) Miktarı	34
4.7. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) Miktarı	36
4.8. Serbest Prolin Miktarı	37
BÖLÜM 5.	
TARTIŞMA VE SONUÇ	39
KAYNAKÇA	44
ÖZGEÇMİŞ	50

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

%	: Yüzdelik İfadesi
'C	: Derece santigrad
µg	: Mikrogram
APOD	: Askorbat peroksidaz
cm	: Santimetre
Cu	: Bakır
Co	: Kobalt
CO ₂	: Karbondioksit
Cr	: Krom
Cd	: Kadmiyum
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
Fe	: Demir
GPX	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GST	: Glutasyon-S-transferaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
K	: Potasyum
KAT	: Katalaz
L	: Litre
m	: Metre
MDA	: Malondialdehit
mg	: Miligram
mmol	: Milimol
NADPH	: Nikotiamid adenin dinükleotit fosfat
O ₂ ⁻	: Süperoksid radikali

OH ⁻	: Hidroksil radikali
pH	: (H ⁺) iyonu konsantrasyonunun kologaritması
PO ₄	: Fosfat
ppm	: Toplam madde miktarının milyonda birlik kısmı
ppb	: Toplam madde miktarının milyarda birlik kısmı
Pb	: Kurşun
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SH	: Sülfidril grubu
SOD	: Süperoksid dismutaz



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1. <i>A. platensis</i> algine uygulanan bakırlı fitalosiyanin türevine bağlı olarak OD 560 değerinin 7 günlük değişimi	27
Şekil 4.2. <i>A. platensis</i> algine uygulanan metalsiz fitalosiyanin türevine bağlı olarak OD 560 değerinin 7 günlük değişimi	28
Şekil 4.3. <i>A. platensis</i> algine uygulanan bakırlı fitalosiyanin türevine bağlı olarak klorofil-a miktarının 7 günlük değişimi.....	29
Şekil 4.4. <i>A. platensis</i> algine uygulanan metalsiz fitalosiyanin türevine bağlı olarak klorofil-a miktarının 7 günlük değişimi.....	30
Şekil 4.5. <i>A. platensis</i> algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı fitalosiyanin türevine bağlı olarak toplam SOD aktivitesinde görülen değişim	30
Şekil 4.6. <i>A. platensis</i> algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki metalsiz fitalosiyanin türevine bağlı olarak toplam SOD aktivitesinde görülen değişim	31
Şekil 4.7. <i>A. platensis</i> algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı fitalosiyanin türevine bağlı olarak toplam APOD aktivitesinde görülen değişim	32
Şekil 4.8. <i>A. platensis</i> algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki metalsiz fitalosiyanin türevine bağlı olarak toplam APOD aktivitesinde görülen değişim	32
Şekil 4.9. <i>A. platensis</i> algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı fitalosiyanin türevine bağlı olarak toplam GR aktivitesinde görülen değişim	33
Şekil 4.10. <i>A. platensis</i> algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki metalsiz fitalosiyanin türevine bağlı olarak toplam GR aktivitesinde görülen değişim	34

Şekil 4.11. <i>A. platensis</i> algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı fitalosiyanin türevine bağlı olarak MDA miktarında görülen değişim	35
Şekil 4.12. <i>A. platensis</i> algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki metalsiz fitalosiyanin türevine bağlı olarak MDA miktarında görülen değişim	35
Şekil 4.13. <i>A. platensis</i> algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı fitalosiyanin türevine bağlı olarak H ₂ O ₂ miktarında görülen değişim	36
Şekil 4.14. <i>A. platensis</i> algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki metalsiz fitalosiyanin türevine bağlı olarak H ₂ O ₂ miktarında görülen değişim	37
Şekil 4.15. <i>A. platensis</i> algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı fitalosiyanin türevine bağlı olarak serbest Prolin miktarında görülen değişim	38
Şekil 4.16. <i>A. platensis</i> algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki metalsiz fitalosiyanin türevine bağlı olarak serbest Prolin miktarında görülen değişim	38

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3.1. Kullanılan cihazlar	19
Tablo 3.2. Spirulina medium İçeriği	20
Tablo 3.3. Mikrobelerin tuzlarının içeriği	20
Tablo 3.4. <i>Arthrospira platensis</i> 'e uygulanan fitalsiyanin konsantrasyonları	21

ÖZET

Anahtar kelimeler: *Arthrospira platensis*, antioksidan, SOD, GR, APOD, MDA, H₂O₂, prolin

Fitalosiyenlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri incelendiğinde en önemli iki özelliği renk maddesi ve yüksek kararlılığa sahip olmasıdır. Pigment, boya ve katalizör maddesi olarak geniş kullanım alanları bulunmaktadır. Özellikle boya ve tekstil endüstrisinde kullanımları gerçekleşmekte olup bu kullanıma bağlı olarak endüstriyel atıklar toprağa ve suya karışmaktadır. Tekstil endüstrisi atıksularında yer alan fitalosiyenler renk kirliliğinin yanı sıra, ışık azalmasına neden olarak fotosentetik aktiviteyi olumsuz olarak etkilemektedir.

Bu çalışmada, 2(3),9(10),16(17),23(24)- tetrakis- (sodyum merkaptotanesulfonat)-bakır (II) fitalosiyenin ve 2(3),9(10),16(17),23(24)-tetrakis-(sodyum merkaptotanesulfonat)-metalsiz fitalosiyenlerin *Arthrospira platensis* algi gelişimi üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Fitalosiyenin konsantrasyonlarındaki artışa paralel olarak bütün uygulamalarda 7 günlük süreçte OD560 absorbansında ve klorofil-*a* miktarında azalma görülmüştür. Bu parametreler açısından uygulanan konsantrasyonlar kıyaslandığında en fazla inhibisyonun gerçekleştiği 2(3),9(10),16(17),23(24)-tetrakis-(sodyum merkaptotanesulfonat)-metalsiz fitalosiyenin olarak belirlenmiştir. SOD aktivitesinde konsantrasyonlar kıyaslandığında 2(3),9(10),16(17),23(24)- tetrakis-(sodyum merkaptotanesulfonat)-bakır (II) fitalosiyenin uygulamasında konsantrasyon artışı ile artma meydana gelmiştir. APOD aktivitesinde en fazla azalma 2(3),9(10),16(17),23(24)-tetrakis-(sodyum merkaptotanesulfonat)-metalsiz fitalosiyenin uygulamasında gözlemlenmiştir. GR enzim aktivitesinde en fazla azalmayı 2(3),9(10),16(17),23(24)- tetrakis- (sodyum merkaptotanesulfonat)-bakır (II) fitalosiyenin uygulaması göstermiştir. MDA miktarında en fazla artış ise 2(3),9(10),16(17),23(24)-tetrakis-(sodyum merkaptotanesulfonat)-metalsiz fitalosiyenin uygulamasında görülmüştür. H₂O₂ miktarındaki artma en fazla 2(3),9(10),16(17),23(24)-tetrakis-(sodyum merkaptotanesulfonat)-metalsiz fitalosiyenin uygulamasında meydana gelirken, en fazla prolin artışı 2(3),9(10),16(17),23(24)- tetrakis- (sodyum merkaptotanesulfonat)-bakır (II) fitalosiyenin uygulamasında gerçekleşmiştir.

Sonuç olarak, uygulanan konsantrasyonlar kıyaslandığında 2(3),9(10),16(17),23(24)-tetrakis-(sodyum merkaptotanesulfonat)-metalsiz fitalosiyenin'in diğer fitalosiyeninden daha toksik olduğu ve enzim aktivitelerinde değişikliğe bağlı , MDA ve H₂O₂ miktarlarının artırdığı görülmektedir.

THE EFFECT OF WATER-SOLUBLE PHTHALOCYANINES SUBSTITUTED WITH SULFONATE GROUPS ON *ARTHROSPIRA PLATENSIS* DEVELOPMENT AND ANTIOXIDANT PARAMETERS

SUMMARY

Keywords: *Arthrospira platensis*, antioxidant, SOD, GR, APX, MDA, H₂O₂, proline

Two of the most important physical and chemical properties of phthalocyanines are colorants and high stability. They are widely used as pigments, dyes and catalyst materials. It is used especially in the paint and textile industries and the industrial wastes generated as a result of this use are mixed with soil and water. Phthalocyanines in textile industry wastewaters have negative effects on photosynthetic activity by causing light reduction as well as color pollution.

In this study, 2(3), 9(10), 16(17), 23(24) -tetrakis- (sodium mercaptoethanesulfonate) -copper (II) phthalocyanine and 2 (3), 9 (10), 16 (17) The effect of 23 (24) -tetrakis- (sodium mercaptoethanesulfonate) -non metallic phthalocyanines on the development of *Arthrospira platensis* algae was investigated. In the 7-day period, parallel to the increase in phthalocyanine concentration, OD560 absorbance and chlorophyll-a were decreased in all applications. The concentrations applied for these parameters were compared to 2(3), 9(10), 16(17), 23(24) -tetrakis- (sodium mercaptoethanesulfonate) -non metallic phthalocyanine, with the greatest inhibition occurring. When concentrations in SOD activity were compared, 2(3), 9(10), 16(17), 23(24) -tetrakis- (sodium mercaptoethanesulfonate)-copper(II) phthalocyanine administration resulted in an increase, in concentration. The greatest decrease in APX activity was observed in 2(3), 9(10), 16(17), 23(24) -tetrakis- (sodium mercaptoethanesulfonate) -non metallic phthalocyanine. The greatest decrease in GR enzyme activity was shown by 2 (3), 9 (10), 16 (17), 23 (24) - tetrakis- (sodium mercaptoethanesulfonate) -copper (II) phthalocyanine. The highest increase in MDA was observed in 2(3), 9(10), 16(17), 23(24)-tetrakis-(sodium mercaptoethanesulfonate)-non metallic phthalocyanine. The increase in the amount of H₂O₂ occurs at most 2 (3), 9 (10), 16 (17), 23(24)-tetrakis-(sodium mercaptoethanesulfonate)-non metallic phthalocyanine, while the highest proline increase is 2(3), 9(10), 16(17), 23(24) -tetrakis- (sodium mercaptoethanesulfonate)-copper(II)phthalocyanine. As a result, when the concentrations applied were compared, 2 (3), 9 (10), 16 (17), 23 (24) -tetrakis- (sodium mercaptoethanesulfonate) -non metallic phthalocyanine was more toxic than other phthalocyanine, although it does change enzyme activities, it is seen that amount of MDA and the H₂O₂ increases.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Günümüzde değişen çevre koşullarının sunduğu teknolojik gelişmeler sonucu olarak yanı sıra çevre ve doğaya verilen zararın boyutu her geçen gün hızla artmaktadır. Farklı kaynaklardan çıkan radyoaktif, katı, sıvı ve gaz halindeki kirletici faktörlerin hava, su ve toprakta yüksek oranda birikmesi çevre kirliliğinin oluşmasına sebep olmaktadır. Özellikle, sanayi endüstrisinde yer alan ve doğaya salınan atık maddelerin toprağı ve suyu kirletmesi, havaya karışan zehirli maddelerin buharlaşma yolu ile suya ve toprağı karışması, evsel atık suların doğaya karışması, denize dökülen petrol gibi katı ve sıvı atıkların artması ve buna benzer birçok örnek su kirliliğinin ortaya çıkmasına ve doğanın dengesinin bozularak canlı hayatında tehdit edilmesine neden olmaktadır (Schaefer ve Roger, 1991).

Fitalosiyaninlerin ancak keşfinden 27 yıl sonra yapısı tanımlanabilmiştir. Dikkat çeken en önemli özelliğı mavi ve yeşil renklere sahip olmaları olan fitalosiyanin bileşikleri uzun yıllar boyar madde olarak kullanılmıştır. Fitalosiyaninlerin ilk zamanlarda kullanım alanlarının az olmasının sebebi çözünürlüklerinin az olmasından kaynaklanmıştır. Fakat farklı substitüe grupların bağlanması ile çözünürlük problemi aşılmaya çalışılmıştır ve böylece yeni kullanım alanları keşfedilmiştir (Leznoff, 1996).

Parlak mavi ve yeşil renklere sahip olan fitalosiyaninler matba mürekkepleri, plastik, alüminyum, sentetik elyafın renklendirilmesinde, duvar boyacılığında ve tekstilde baskı boyamada yaygın olarak kullanılmaktadır (Robertson, 1940). Ayrıca hidrokarbonların ve kükürdün yükseltgenmesinde, yakıt pillerinde, hidrojenasyon olaylarının katalizlenmesinde olduğu gibi katalitik uygulamalarda da kullanılmaktadır.

Çözünürlüklerinin yüksek olması sebebiyle, sentetik boyar maddeler endüstriyel atıksularda bulunan en yaygın su kirleticileridir. Boyar maddelerin %2'si direkt olarak atık sulara bırakılmaktadır (Pearce ve ark. 2003, Robinson ve ark. 2001). Boyar maddelerin suda 1 ppm'den daha düşük seviyelerde bile bulunması hem sağlık açısından hem de çevresel açıdan istenmeyen bir durum oluşturmaktadır (Robinson ve ark. 2001, Banat ve ark. 1996). Günümüzde ticari olarak elde edilen 100.000 çeşidin üzerinde boyarmadde vardır ve yıllık boyar madde üretimi 7×10^5 tonun üzerindedir (Pearce ve ark. 2003, McMullan ve ark. 2001).

Boyar maddelerin çoğu toksik etki etmekte ve suda yaşayan canlılar için ciddi tehlikeler oluşturmaktadırlar (Vandevivere ve ark., 1998). Sentetik boyar maddelerden fitalosiyaninler aromatik yapıya sahiptirler ve ısıya, ışığa ve yükseltgen maddelere karşı oldukça dayanıklıdır. Bu özellikler nedeniyle, çevrede bozunmadan uzun süre kalabilmektedirler.

Algler su ekositemi ortamında birincil üretici canlılardır. Morfolojilerinde bulunan pigmentlere istinaden güneş ışığının katkısıyla karbondioksit ve suyu organik bileşiklerden karbonhidratlara çevirirler. Dolayısıyla kendileri ve akuatik ortamdaki canlıların hem besin kaynağını oluşturlar hem de çözünmüş oksijen oranının artmasını sağlamaktadırlar. Algler, su ekosisteminde besin zincirinin ilk halkasında bulundukları için kompozisyonları ve yoğunlukları suda meydana gelen fiziksel ve kimyasal farklılıklardan hızlıca etkilenmektedir. Su ekosistemine karışan kimyasallar, biyolojik çeşitliliğe ve özellikle su kompozisyonuna etki etmekte ve alg türlerinde değişiklik oluşturmaktadır (Elliot ve ark., 1992).

Serbest radikaller, atomik orbitali üzerinde eşlenmemiş elektron (e^-) taşıyan moleküller olarak tanımlanmaktadır. (Bast ve ark., 1991; Halliwell ve Gutteridge, 1985; Nawar, 1996). Serbest radikal oluşumunun artmasına paralel olarak oksidatif stres oluşumunun hızlandırmasını sağlamaktadır. (Yan, 1998) Basit olarak oksidatif stres biyolojik sistemde prooksidanlarla antioksidanlar arasındaki dengenin, prooksidanların daha ağır gelmesi ile lehine bozulması olarak tanımlanmaktadır. Hücreler az şiddetli oksidatif stresi bazen tek başlarına tolere edebilirken çoğu zaman

antioksidan enzim sistemleri ile kontrol etmektedirler (Yan, 2014). Ancak, hücre içi savunma sistemlerinin güçlü olmadığı durumlarda, oksidatif stresin tanımında anlatıldığı üzere, reaktif oksijen bileşikleri ile antioksidanlar arasındaki denge bozulmaktadır, oksidatif hasara duyarlı olan DNA, protein, karbonhidratlar ve lipitler gibi hücresel makromoleküller zarar görülmektedir. Yapılan çalışmalar, farklı sitotoksik ajanların hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak serbest radikal üretimine neden olduğunu göstermiştir. (Dokuyucu, 2014).

Oksidatif stres altındaki alglerde antioksidan savunma sisteminde meydana gelen değişiklikler algin maruz kaldığı kimyasala göre tolerans ve duyarlılık derecesini oluşturmaktadır.

Bu çalışmada fitalosiyanın etkilerini *Arthrospira platensis* algi üzerinde tespit ederek oluşturacağı olumlu ya da olumsuz koşulların belirlenmesini tespit etmektedir.

BÖLÜM 2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Fitalosiyaninler ve Tarihçesi

Fitalosiyanin kelimesi Yunanca *naphtha* (mineral yağı) ve *cyanine* (koyu mavi) kelimelerinin bir araya gelmesi ile oluşmaktadır. Renkleri maviden açık yeşile kadar değişebilen fitalosiyanin bileşikler ilk kez 1907’de Braun ve Tcherniac tarafından, kimyasal bir tepkime sırasında, koyu renkli çözünmeyen bir yan ürün olarak elde edilmiştir. 1927’de Freiburg Üniversitesinde yaptıkları bir çalışma sırasında Diesbach ve Von der Weid %23 verimle mavi renkli bakır fitalosiyanin elde etmişler fakat yapısını aydınlatamamışlardır (Diesbach ve ark., 1927).

Fitalosiyaninler düzlemsel konjuge 18π elektron sistemli aromatik bir makro halkadan oluşmaktadır. Fitalosiyaninler, doğada kendiliğinden mevcut hemoglobin, klorofil-*a*, vitamin B12 gibi yapılara benzemelerine rağmen, sentetik ürün olarak bulunmaktadır (Ziolo ve Extine, 1981).

2.2. Fitalosiyaninlerin Genel Özellikleri

Fitalosiyaninler periyodik cetveldeki metallerin hemen hemen hepsi ile kompleks oluşturabilmektedirler. Yalnızca kuvvetli yükseltgenlerin etkisiyle ftalik asit veya ftalimide bölünerek makro halka yok olmaktadır.

Fitalosiyaninler kimyasal ve sıcaklık özelliğiyle kararlılığa sahip gruplardır. Fitalosiyaninlerin yapısında 400-500°C ye kadar yüksek sıcaklıkta bozunma gerçekleşmez (Bekaroğlu ve ark., 2007). Vakum işleminde metal karışımların büyük bir kesiminde 900°C sıcaklığa kadar etkilenmezler. Fitalosiyaninleri kristallendirmek ve süblimleştirmek kolaydır. Sonucun da saf ürünler elde edilir (Bekaroğlu ve ark.,

2010). Fitalosiyanine eklenen metal iyonu cinsinin fizikokimyasal özellikleri belirlenmesinde doğrudan etkisi vardır (Bekaroğlu ve ark., 2011).

2.3. Fitalosiyanın Sınıflandırılması

Fitalosiyanınler süstitüe olmamış fitalosiyanınler, benzen halkası üzerinden süstitüe olmuş fitalosiyanınler, metal üzerinden (aksiyel pozisyondan) süstitüe fitalosiyanınler, subfitalosiyanınler ve süperfitalosiyanınler olmak üzere beş grupta incelenmektedir.

2.3.1. Fitalosiyanınlerin fiziksel özellikleri

Fitalosiyanınler iki önemli fiziksel özelliğe sahip olup bu özelliklerden ilki rengi diğeri ise yüksek kararlığa sahip olmasıdır. Fitalosiyanınlerin renkleri kimyasal ve kristal özelliğine göre koyu maviden metalik bronz yeşile kadar farklılık göstermektedir. Örneğin, bakır fitalosiyanınin rengi substitüe klor atomlarının sayısının artması ile maviden yeşile doğru değişiklik göstermektedir. Fitalosiyanınlerin üretim şekline birçok kristal yapının oluşmasını sağlamıştır. Bu kristal formlarından en önemlisi α -formudur. Termodinamik açıdan daha kararlı olan ise β -formudur. α -formu, 200 °C 'nin üzerinde ısıtma ile β -formuna dönüşür. Bir diğerkristal yapı x-formu olup metalsiz ve düzlemsel metalofitalosiyanınidir (Sharp, 1968).

2.3.2. Fitalosiyanınlerin kimyasal özellikleri

Fitalosiyanınlerin kimyasal özelliklerini merkezindeki boşluğa yerleşecek olan metal iyonu belirlemektedir (Leznof ve Lever, 1993).

Metalli fitalosiyanınlerin elektrovalent ve kovalent olmak üzere genel olarak iki tip bağoluşturular. Elektrovalent fitalosiyanınler çoğunlukla alkali ve toprak alkali metallerle tepkimeye girerler, organik çözücülerde çözünmezler ve yüksek sıcaklıkta süblime olmazlar. Seyretilik anorganikasitler, sulu alkol, hatta su ile tepkimeye

girdiğinde kolayca metal iyonu metalden ayrılmaktadır ve böylelikle metalsiz fitalosiyaninler elde edilmektedir. Kovalent fitalosiyanin kompleksleri ise, elektrovalent olanlara kıyasla daha kararlıdır ve organik çözücülerde çözünebilmektedirler (Değirmencioğlu ve ark., 2010).

2.3.3. Fitalosiyaninlerin çözünlülüğü

Süstitüe olmamış fitalosiyanin komplekslerinin organik çözücülerde çözünlülüklerinin olmaması, yapılacak araştırmalar ve kullanım alanlarını kısıtlamaktadır. Fitalosiyaninlere periferale pozisyonlara süstitüentlerin ilave edilmesi ile mesafeyi artırarak istiflenme durumunu azaltılmakta ve çözünlülük özelliğı kazandırılmaktadır. Bu şekilde çözünlülük problemini periferale pozisyonlara hacimli gruplar ya da uzun zincirlerin ilave ederek ortadan kaldırılırken farklı uygulama alanları ve farklı malzemelerin oluşumu sağlanmaktadır (Darwent, 1982).

2.4. Fitalosiyaninlerin Genel Sentez Metotları

Fitalosiyaninlerin periyodik tablodaki hemen her metalle kompleksleri sentezlenebilmektedir (Leznoff ve Lever, 1996). Değişik gruplardaki alkali-metal fitalosiyaninlerden metal değişimiyle metalli fitalosiyaninler sentezlenebilmektedir.

2.4.1. Süstitüe olmuş fitalosiyaninlerin sentezi

Süstitüsyona uğramamış fitalosiyaninler derişik H_2SO_4 hariç hemen hemen diğer tüm çözücülerde çözünmemektedir. Çözünlülüğü artırmak ve dolayısıyla da fiziksel, kimyasal ve diğer özelliklerini inceleyebilmek için değişik süstitüentli fitalosiyaninler sentezlemek gerekmektedir. Süstitüe edilmiş fitalosiyaninler ile süstitüe olmayanlar arasında önemli farklılıklar mevcuttur. En önemlisi de, dallanmış büyük bir grubun katılımı ile fitalosiyaninin çözünlülüğünün değiştirilmesidir (Kennedy ve ark., 1986).

Fitalosiyenin çekirdeği etrafındaki periferik substituentlerin uzun zincirli olması ya da büyük hacimli gruplar ihtiva etmesi ve metalofitalosiyenlerdeki merkezi metal atomunun yer değiştirmesi durumunda fitalosiyenlerin çözünlüğü artırılabilir (Yaman, 2007).

2.5. Fitalosiyenlerin Kullanım Alanları

Fitalosiyenler parlak mavi, yeşil renklere sahip olmaları, yüksek kimyasal kararlılıkları ve ışığa karşı dayanıklı olmaları nedeniyle geniş bir kullanım alanına sahiptir.

1990'lı yılların başlarında keşfinden sonra fitalosiyenler yoğun mavi-yeşil rengi, yüksek boyama seviyesi, ışığa karşı direnci, farklı çözücülerdeki çözünlüğü ve kimyasal kararlılığı nedeniyle pigment ve boyar madde, tekstil ve kağıt endüstrisinde yoğun olarak kullanılmaktadır.

Günümüzde en fazla üretilen sentetik renklendiricilerinden biri bakır fitalosiyenidir. Fitalosiyenler kimyasal birçok reaksiyon için katalizör olarak görev almaktadırlar. Son yıllarda fitalosiyenler elektrofotografi, mürekkep püskürtmeli baskı, fotokopi aletlerindeki fotoiletken ajanlar gibi ileri teknoloji uygulamalarında da yer almaktadırlar. Fitalosiyenlerin diğer birçok alanda önemi ve kullanımı gelişmektedir. Bunlar arasında kimyasal sensörler, elektrokromizm, sıvı kristaller, Langmuir-Blodgett filmler, fotodinamik tedavi, nonlinear optik uygulamalar, infrared radyasyon absorplayıcıları, moleküler yarı-iletkenler, optik veri depolama ve kromatografik ayırma bulunmaktadır (Misra ve ark., 2006).

Metalfitalosiyenler (MPc'ler); zengin ve özellikle tersinir redoks davranışları, yüksek termal ve kimyasal kararlılıkları, farklı metal iyonları ve substituentler ile kolayca entegre olmaları ve değişik altlık malzemeleri üzerinde kolayca filmlerinin oluşturulabilmesi nedeniyle yeni sensör sistemlerinin dizayn edilmesinde tercih edilmektedir. Bu nedenle MPc'ler, elektrokimyanın birçok teknolojik uygulamasında olduğu gibi sensör uygulamalarında da oldukça fazla çalışılan bir bileşik sınıfıdır.

(Martin, 1978). Söz konusu bileşikler; hidrazin, glikoz, askorbik asit, çeşitli pestisit maddeleri ve ilaç sektöründe kullanılan değişik aktif maddeler de dahil olmak üzere birçok hedef türün algılanması için kullanılmıştır. Aslında, bu tür biyolojik türlerin algılanması için günümüzde en fazla tercih edilen sistemler enzim ihtiva eden biyosensörlerdir. Literatürler incelendiğinde; biyosensör olarak kullanılan biyolojik reseptörlerin ya da enzimlerin bazı önemli sınırlılıklara sahip oldukları gözlenmektedir. Bunlardan bazıları, biyolojik türün düşük stabilitesi, substratlar üzerinde yerleşimi veya hareket zorlukları, substrat yüzeyinden sızıntı ve düşük kimyasal ve termal kararlılıkları olarak sıralanabilir. Bu nedenle araştırmalarda enzimlerin yerine kullanılabilecek taklit enzimler olarak adlandırılan fonksiyone yapay reseptörlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Son on yılda, doğal protein türevi olan porfirin bileşikleri, insektisit gibi birçok zararlı biyolojik hedef türün algılanması için taklit enzim reseptörleri olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (McKeown, 1998).

2.6. Fitalosiyanınlerin Sucul Ekosisteme Girişi ve Etkisi

Sucul ekosistemlerde algler zengin biyolojik çeşitliliğe sahip önemli organizmalardır.

Tatlı, acı ve tuzlu ekosistemlerde, makro ve mikro formlarda bulunan canlılar, yeryüzündeki diğer canlıların yaşamlarını devam ettirmesi açısından oldukça önemlidir. Algler primer üreticiler olması sebebiyle besin ağının ilk basamağında yer almaktadırlar. Klorofil olmak üzere sahip oldukları çeşitli fotosentetik pigmentler besin üretiminde fonksiyonel olmalarını sağlamaktadır.

Dünyanın dörtte üçünün sularla kaplı olduğunu düşünürsek, algler yeryüzündeki biyokimyasal döngüde organik madde aktarımı ve oksijen üretiminde önemli bir yere sahiptir (Reynolds ve Hamilton, 1992).

Evsel, endüstriyel, tarımsal ve diğer uygulamalar sonucu açığa çıkan ve içinde sağlığa zararlı biyolojik ve kimyasal maddeler bulunan atık sular, sucul ekosisteme kontamine olmakta ve alglerin yaşamı için ciddi boyutta risk oluşturmaktadırlar.

Fitalosiyaninlerin kullanım alanlarına bağılı olarak gerek boya endüstrisinde gerek tekstil endüstrisinde kullanımı gerçekleşmektedir. Bu kullanıma istinaden oluşan endüstriyel atıklar toprağa ve suya karışmaktadır. Tekstil endüstrisi atık sularında yer alan fitalosiyaninler renk kirliliğinin yanısıra, suda ışık azalımına neden olmaktadır. Ayrıca suyun renginin değişmesi, tadının ve kokusunun bozulması gibi etkiler oluşmaktadır. Bunun sonucu olarak aglerin fotosentez aktiviteleri negatif olarak etkilenmektedir. Turkuaz, parlak yeşil, mavi fitalosiyaninlerin bazıları bakır içermeleri nedeniyle suda yaşayan canlılar için toksik etki etmektedir (Acemioğlu, 2004; Kaushik, 2009).

2.7. Fitalosiyaninlerin Alg Hücrelerine Alınımı

Alglerin hücresel fonksiyonları için metaller oldukça önemlidir. Fotosentez döngüsü, DNA transkripsiyonu, fosfor alımı ve azot asimilasyonuna katılan enzimler için kofaktör olarak görev almaktadır. Metaller ayrıca mikroalg hücrelerin morfolojisini de etkilemektedir. Metallerin varlığı klorofil, karotenoid ve fikobilinler gibi fotosentez işleminde görev alan pigmentlerin üzerinde de etkilidir. Bununla birlikte, metallerin ve metal fitalosiyaninlerin yüksek konsantrasyonları mikroalg hücrelerinde negatif etkilere neden olabilmektedir (Blaby Haas ve Merchant, 2012).

Metaloid ve metal fitalosiyaninler mikroalgler üzerinde doğrudan etkiye sahiptir. Fitalosiyaninlerin inhibe edici aktivitesi; büyüklüklerine, mikroalg kültürünün yaşına ve büyüme ortamının bileşimine bağlıdır. Alglerin metal partiküllerinin biyoabsorbsiyonu, bu parçacıkların yüzey yükü ile ilişkilidir. Alglerin hücre duvarlarının eleme özelliğinden dolayı birçok parçacık hücre duvarı engelini aşarak, hücre zarına ulaşmak zorundadır. Birçok metal, metalloid ve metal fitalosiyanin alg büyümesi ve metabolizması için stres oluşturabilir veya yönlendirici olarak işlev görebileceği yapılan çalışmalarla gözlenmektedir. Diğer taraftan, bazen de fitalosiyaninlerden salınan metal iyonları siyanobakteri ve alg büyümesine katkı sağlayabilmektedir (Yan ve ark., 2017).

2.8. Alglerin Fitalosiyanini Uzaklaştırması

Mikroorganizmaların iki farklı yöntem ile istenmeyen maddeleri ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Bunlar ilki enerjiye bağımlı olan mekanizma yani biyolojik birikim (bioaccumulation) ile bir diğeri ise enerjiden bağımsız olarak fiziko-kimyasal adsorpsiyon olan biyosorbsiyondur. Bu terim özellikle hücre duvarında meydana gelen fiziksel ve kimyasal adsorpsiyon, iyon değişirme, jelatinleştirme ve mikro presipitasyon gibi çok sayıda işlem için kullanılmaktadır (Aksu ve Tezer, 2000).

Biyosorbsiyon mekanizmasında, mikroorganizmaların hücre duvarı özellikleri ve bunların elektrostatik etkileşimleri önemli rol oynamaktadır. Algler birçok habitatta bol bulunmaları, kolay ve hızlı gelişimleri gibi birçok nedenlerden dolayı potansiyel biyosorbentlerdir. Alg türlerinin hücre yüzeylerinde hidroksil (-OH), karboksil (-COO), amino (-NH₂) ve fosfat (-PO₄) gibi çeşitli fonksiyonel gruplar bulunmaktadır (Aksu, 2005). Her alg türünün kendine özgü hücre duvarı ve hücre duvarını kaplayan fonksiyonel gruplar bulunmaktadır. Alglerdeki bu fonksiyonel gruba istinaden ortamdaki istenilen fitalosiyaninlerin uzaklaştırılmasına yardımcı olunmaktadır.

Uzaklaştırma işleminde alg türlerinin özelliklerini incelediğimizde Kendine özgü bir yüzey yapısı mevcuttur. pH, sıcaklık, başlangıç konsantrasyonu, tuz, metal iyonları, solüsyonun çalkalanması, gibi fiziko-kimyasal değişkenleri farklıdır. Biyosorbent olarak kullanılan farklı biyokütle miktarının olması uzaklaştırma işlemlerinde büyük rol oynamaktadır (Aksu, 2005).

2.9. Çalışmada Kullanılan Fitalosiyaninler

2.9.1. 2(3),9(10),16(17),23(24)-Tetrakis-(Sodyum merkaptotanesulfonat)-bakır(II) fitalosiyanin

Bakır fitalosiyanin ticari olarak 1935'te ICI (International Chemical Imperial) tarafından bakır tuzları, üre ve ftalik anhidritten yola çıkılarak sentezlenmiştir (Keen, 1964). Suda çözünebilen fitalosiyanin boyası ve fitalosiyaninlerin polisulfonat

türevleridir. Fitalosiyeninler yazıcı mürekkebi, boya, plastik ve tekstilde renklendirici olarak kullanılmaktadır. Özellikle yazıcı mürekkeplerinde bakırfitalosiyenin kullanımı oldukça önemli yer tutar. Yeşilimsi mavi renk tonuna sahip bakır ftalosiyenin renkli yazıcılar için uygundur. Işığa, ısıya ve çözücülere karşı dayanıklı olduklarından plastiklerde ve yağlı boyalarda mavi pigment olarak kullanılmaktadır (Bamfield ve Hutchings, 2010).

2.9.2. 2(3),9(10),16(17),23(24)-Tetrakis-(Sodyum merkaptotanesulfonat)-metalsiz fitalosiyenin

Fitalosiyeninler merkezinde iki hidrojen atomu olduğu zaman metalsiz fitalosiyenin (H_2Pc) adını almaktadır.

2.10. Oksidan ve Antioksidan Maddeler

Oksijen yaşam için vazgeçilmezken aynı zamanda da potansiyel bir zehir olarak nitelendirilmektedir. Oksijen renksiz, kokusuz ve atmosfer hacminin beşte birini oluşturan bir gazdır. Oksijen, enerji eldesinde hem bitkiler hem de hayvanlar tarafından değişikliğe uğramadan doğrudan kullanılmaktadır. Oksijen, doğada iki atomu olan ve dış yörüngesinde bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektron içeren serbest radikaldir. Oksijen, çok güçlü bir oksidan olmamasına rağmen, suya redüksiyonu sonucunda birçok reaktif ara ürünler oluşmasına neden olmaktadır (Gutteridge,1994).

Oksidasyon, bir maddenin oksijen ile birleşirken bir elektron kaybettiği kimyasal bir süreçtir. Biyolojik bileşiklerin oksidasyonu, organizmalar için gerekli enerjinin oluşumunu sağlar (Halliwell ve Gutteridge, 1984).

Oksijen, iki elektronu eşleşmemiş şekilde bir elektron dağılımına sahip olup bazen radikal olarak değerlendirilmektedir. Oksijen molekülünün reaktif özelliği olmamasına rağmen diğer radikallerle reaksiyona girebilmektedir. Serbest radikaller en dış halkalarında eşlenmemiş atom veya atom grupları ile diğer bileşiklerle

reaksiyona girerek bir elektron alma eğilimi gösteren ve yüksek oranda reaktif kimyasal ürünlerdir. Serbest radikaller diğer moleküllerle hızla reaksiyona girmeye ve onların yapısını değiştirme özelliğindedir. Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine girebilen bu moleküllere oksidan moleküller veya reaktif oksijen türleri (ROT)'de denmektedir. (Çavdar ve ark., 1997). Bu eşleşmemiş elektronlar yüksek enerjilidir ve eşleşmiş elektronları ayırıp işlevlerine engel olmaktadır. Bu durum serbest radikalleri hem tehlikeli hem de kullanışlı yapmaktadır.

Oksidasyona neden olan serbest radikaller temel olarak oksijen kaynaklı metabolitler, (superoksit anyonları O_2^- , hidrojen peroksit H_2O_2 , hidroksil radikali $OH^\cdot$), hipoklorik asit, kloraminler, azot dioksit, lipid peroksitler ve ozondur (Kaur ve ark. 2001).

DNA, proteinler, yağlar ve küçük hücresel moleküllerin reaktif oksijen türleri ile oksidatif modifikasyonu birçok hastalık ve dejenerasyonlarda yaygın bir rol oynamaktadır (Borek,1991). Hücre içinde diğer moleküller ile hızla reaksiyona girip onların yapısını bozacak oksidan molekülleri ancak antioksidan moleküller tarafından engellenebilmektedir. Serbest radikallerin hücre içerisinde üretimi oldukça fazla olup, üretim ve yıkım dengesini bozmayacak şekilde, birçok koruma ve savunma sistemi tanımlanmıştır. Antioksidanlar, düşük konsantrasyonlarda bile hücre içinde etkili olup oksidasyon hızını anlamlı şekilde indirgeyen ya da geciktiren moleküllerdir (Maxwell, 1995).

Doğal veya farmakolojik olmak üzere iki grup olan antioksidanlar; enzimatik antioksidanlar, önleyici antioksidanlar, süpürücü ya da zincir kıran antioksidanlar olarak sınıflandırılmaktadır (Gutteridge,1994; Halliwell ,1997).

Antioksidanlar dört farklı yol ile oksidanları etkisiz hale getirmektedir (Gökpinar ve ark.,2006). Süpürme etkisi (scavenging): oksidanları zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirmektedir. Antioksidan enzimler ve mikromoleküller bu yolla etki etmektedirler. Söndürme etkisi (quenching): oksidanlara bir hidrojen aktararak inaktive etmektedirler. Vitaminler, flavanoidler, timetazidin ve mannitol bu

şekilde etki etmektedir. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi (Chain Breaking): Hemoglobin, serüloplazmin ve ağır mineraller oksidanları kendilerine bağlar ve inaktive etmektedir. Onarma etkisi (Repair): Oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onarılmaktadırlar.

2.11. Antioksidan Savunma Sistemleri

Organizmalarda iç veya dış kaynaklı serbest radikallerin oluşumunu engelleyecek, zararlı etkilerini azaltacak veya yok edecek “antioksidan savunma sistemleri” veya “antioksidanlar” adı verilen enzimatik ve enzimatik olmayan koruyucu sistemler oluşmaktadır. Hücre içi enzimatik antioksidanları, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GPX) askorbat peroksidaz (APOD) ve glutatyon redüktaz (GR) olup enzimatik olmayanlar ise glutatyon (GSH), membranlara bağlanabilen α -tokoferol ve β -karoten, askorbat, transferin, serüloplazmin ve bilirubindir. Hücre dışı sistemde ise; metallothionein ve Zn gibi iz elementler yer almaktadırlar (Halliwell ve Gutteridge, 1984).

2.11.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz(SOD) antioksidatif stres savunma mekanizmasının en kilit enzimidir. SOD yüksek derecede reaktif olan aktif oksijen türlerinden süperoksit anyon radikallerinin (O_2^-) parçalanmasını katalizleyerek, organizmaların oksijen varlığında canlı kalmasını sağlayan bir enzimdir. Bu reaksiyon oksijen metabolize eden tüm organizmalarda ve bazı anaerobik canlılarda gerçekleştirmektedir ve sonuç olarak moleküler oksijen(O_2) ve hidrojen peroksit(H_2O_2) oluşmaktadır (Scandalios, 1993; Martin, 1978).

Aktif oksijen türleri yüksek reaktif özelliklerinden dolayı herhangi bir koruma mekanizması olmadığında hücre duvarının yapısına ve fonksiyonlarına zarar vermektedir (Hensley, 2000). SOD enzimi, süperoksitleri moleküler oksijen (O_2) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştürdüğünden dolayı süperoksit ve hidrojen peroksitlerin hücre derişimlerini doğrudan belirlemektedir (Van Camp ve ark., 1994)

Birkaç istisna dışında SOD' lar bütün aerobik organizmalarda bulunmaktadır ve aktifleşmiş oksijen ara ürünleri ile zorunlu olarak temas halinde olan bütün hücre bölümlerinde yer almaktadır. Bu mekanizma metal iyonunun ardışık oksidasyon ve redüksiyonuna dayanır. SOD'lar bakır/çinko (Cu/Zn), demir (Fe) ve mangan (Mn) içeren izoenzimler olarak metal kofaktörlerine göre sınıflandırılmaktadır. FeSOD ve MnSOD proteinlere yapı olarak benzemelerine rağmen Cu/ZnSOD'lar farklıdır (Dat ve ark., 2000). SOD izoenzimlerinin inhibitörlere karşı, farklı hassasiyetleri yanında hücredeki dağılımları da ayırt edici bir özelliktir. SOD enzimlerinin miktarı da her bir organizma için farklıdır. Kontrollü gelişim ve çevresel streslerin (UV, ozon, atmosfer kirleticileri, düşük sıcaklık, tuz stresi, kuraklık, sıcak şoku, ağır metal gibi) aktif oksijen türlerini meydana getirerek SOD aktivitesini tetiklediği gösterilmiştir (Van Camp ve ark., 1994). MnSOD ökaryotik hücrelerin mitokondrilerinde, Cu/ZnSOD yüksek bitkilerin kloroplastlarında, peroksizomlarda ve sitosolde bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda FeSOD sadece prokaryotlar ve bitkilerin kloroplastlarında bulunmuştur.

2.11.2. Askorbat peroksidaz (APOD)

İlk olarak 1979 yılında keşfedilen askorbat peroksidaz (APOD), peroksidaz enzimlerinden olup mayadan insana kadar pek çok canlı da bulunmaktadır. Askorbat peroksidaz hidrojen peroksida bağlı olarak farklı substratları katalizlemektedir. Fakat enzimin substratı askorbattır (vitamin C). Askorbatın dışında bazı aromatik substratların (AH₂) da oksidasyonunu katalizlemektedir (Sharp ve Raven, 2003). Fizyolojik koşullar altında reaksiyonun ara ürünü monodehidroaskorbat radikali olup başka bir enzim ile tekrar askorbata indirgenmektedir. Askorbat peroksidaz sitozolde, kloroplastlarda ve peroksizomlarda bulunmaktadır.

2.11.3. Glutasyon redüktaz (GR)

Glutasyon redüktaz (GR), okside glutasyonun (GSSG) glutasyona (GSH) indirgenmesini katalizleyen bir enzimdir. Glutasyon redüktaz redoks döngüsünde önemli bir enzim olup, indirgenmiş hücresel GSH'ın hücrede yeterli seviyede bulunmasını sağlamaktadır. GSH antioksidan olarak görev yapmaktadır ve serbest radikal ve organik peroksitlerle reaksiyona girmektedir. Ayrıca amino asit taşınımında görev almaktadır ve glutasyon peroksidaz ve glutasyon-s-transferaz enzimlerinin substratıdır (Perl ve ark., 2002). GR bir flavoproteindir. GR aktivitesi bitkilerde en fazla kloroplastlarda bulunurken mitokondri ve sitosolde de benzerleri tanımlanmıştır (Creissen, 1994). Okside glutasyonun indirgenmesi çok aşamalı bir reaksiyondur. Başlangıç olarak enzim NADPH tarafından indirgenmektedir. İndirgenmiş GR GSSG molekülü ile reaksiyona girmekte ve bu reaksiyon bir disülfid değişimi ile sonuçlanmaktadır. Sonuçta GSH molekülü ve GRred – SG kompleksi ortaya çıkmaktadır. GRred – SG kompleksinde ikinci bir disülfid değişimi ile sonuçlanan bir elektron düzenlemesi gerçekleşmektedir. İkinci GSH molekülünün enzimden ayrılması ile enzim tekrar okside forma dönüşmektedir (Oxfordbiomed, 2018).

2.11.4. Prolin

Prolin, proteinleri oluşturan 20 aminoasitten biridir. Diğer tüm aminoasitler birincil amin grubu taşımakta olup prolin, yan zincirindeki üç karbon atomu bir halka oluşturarak tekrar peptid bağındaki azot atomuna bağlandığı için, birincil amin(-NH₂) grubundan yoksundur. Prolindeki azot ikincil amin olarak nitelendirilmektedir. Prolin bazen immينوasit olarak da adlandırılmaktadır. Esansiyel olmayan ve glukojenik amino asittir. Sentezi ve yıkımı alfa ketoglutarat üzerinden olmaktadır. Prolin dehidrogenaz ile prolin 5-karboksilat sentezlenmektedir. Prolin 5-karboksilattan glutamat semialdehit dehidrogenaz ile glutamat oluşmaktadır ve bunu glutamatın transaminasyonu ile alfa ketoglutarat oluşumu izlemektedir. Prolin, ROS üreten reaksiyonlara maruz kaldığında enzimatik olmayan hidroksilasyona uğrayabilmektedirler. Reaktif oksijen türevlerinin hücre zarını tahrip etmesinden

oluşan osmotik dengesizliği prolin birikimi önlenmektedir. Prolin birikimi tahribin indikatörü olarak da değerlendirilmektedir. Ninhidrin ile tepkimesinden pembe renkli bir bileşik oluşturmaktadır (Türkan, 2004; Temizkan, 2004).

2.11.5. Malondialdehit (MDA)

Malondialdehit (MDA), enzimatik olmayan oksidatif lipid peroksidlerinin parçalanması sonucu oluşan toksik etkili son ürünlerdendir. İki den fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin otooksidasyonunda serbestleşen siklik endoperoksidler MDA'nın asıl kaynağını oluşturmaktadır. MDA miktarının ölçümü, lipid peroksid düzeylerinin saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Lipid peroksidasyonunun; hücre zarının lipid yapısındaki değişiklikler nedeni ile hücre zarı işlevinin bozulması, oluşan serbest radikallerin enzimler ve diğer hücre bileşenleri üzerine etkisi, son ürünler olan aldehitlerin sitotoksik etkileri gibi farklı yollarla hücre hasarına neden olduğu düşünülmektedir. Ayrıca aldehit yapıları bileşiklerin uzun yaşam süreli ve zarları geçebilme özelliğinde olması, lipid peroksidasyonunun hedeflerindeki etkilerinden bu bileşiklerin sorumlu olduğunu düşündürmektedir (Türkan ve ark., 2004).

2.11.6. Hidrojen peroksid (H_2O_2)

Biyolojik çalışmalarda en çok talep gören ve en çok araştırılan radikal reaksiyon zinciri lipid peroksidasyonudur. Radikaller hücrede başta membran lipidleri olmak üzere diğer lipidler, protein ve DNA'da hasara neden olmaktadır. Lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin zar yapısındaki doymamış yağ asidi zincirinin alfa metilen gruplarından bir hidrojen atomunu uzaklaşması ile gerçekleşmektedir. Biyolojik çalışmalarda bu serbest radikalın süperoksit anyonu ve hidroksil radikali olduğu belirlenmektedir. Bu duruma istinaden, lipid peroksidasyonunun oluşmasında asıl etkili radikalın hidroksil grubu olduğu bilinmektedir. Bu radikal, süperoksit radikalinden veya H_2O_2 'den demirin katalitik etkisi altında oluşmaktadır. Bu dönüşümler Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları olarak tanımlanmaktadır. pH 7,2' de süperoksit daha kararlı metabolit olan H_2O_2 'ye dönüşmektedir. Yağ asidi serbest

radikkallerin etkisiyle zincirinden hidrojen atomunun uzaklaşması ve böylelikle bu yağ asidi zincirinin radikal niteliği kazanmasına neden olmaktadır. Meydana gelen lipit radikali dayanıksız bir bileşik olup, bir dizi değişikliğe uğramaktadır.

2.12. *Arthrospira Platensis*

Arthrospira (Spirulina) çok hücreli bir siyanobakteridir. Birçok siyanobakter gibi, *Arthrospira* karanlık ortamlarda yaşamını devam ettirememektedir. (Orio, 1983) *Arthrospira platensis* türün maksimum üreme sıcaklığı 30 °C olarak rapor edilmektedir. Daha yüksek sıcaklıklarda, alglerde üremeyi kontrol eden enzim inaktif hale gelmektedir. Birçok çalışmada *A. platensis* türünün tolere edebileceği maksimum pH'ın 10 ve minimum pH'ın 8'den daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Bu alg türü 7,5-30% tuzluluk oranında olan sularda yaşamına devam ettirebilmektedir (Rutwik ve ark., 2010). Ayrıca bu tür yüksek konsantrasyonda organofosfor pestisit (> 80 ppm) bulunduran ortamlarda da üreyebilmektedir. *A. platensis* hücrelerinde yüksek oranda protein (kuru ağırlığının 70%'ine kadar), yağ asidi, niyasin, fikosiyanin, karotenoid, tiamin, riboflavin, klorofil, vitamin A ve vitamin B12 biriktirmektedir (Alberto ve ark., 2001).

Planktonik bir alg olan *A. platensis*, karbonat ve bikarbonatca zengin tropik ve subtropikal sularda yoğun olarak bulunan bir türdür (Yılmaz ve Duru 2011). *A. platensis*, en çok üretimi yapılan, kozmetik alanında, tıpta, birçok sanayi alanında insan ve hayvan besini gibi geniş bir kullanım alanına sahip olan bir canlılardır (Yılmaz ve Duru 2011).

A. platensis kendi eksenini etrafında kayarak hareket etmektedir ve heterosistleri bulunmaz. Çok hücreli silindirik trikomların kendi uzunluğu boyunca sarmal şekilde sıralanması ile oluşmuştur (Yılmaz ve Duru 2011).

2.13. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada doğrultusunda bakır ve metalsiz fitalosiyanin türevine maruz bırakılan *A. platensis* alginin biyokütle, klorofil-*a*, süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APOD), glutatyon redüktaz (GR), malondialdehit (MDA), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve prolin miktarlarındaki değişim incelenmiştir.

Böylece model organizma olarak seçilen *A.platensis* algi ile farklı fitalosiyanin türevlerinin sucul ekosistemlere olası etkisi birincil üretici konumunda olan algler vasıtasıyla araştırılmış olacaktır.



BÖLÜM 3. MATERYAL VE METOD

3.1. Çalışma Materyali

Çalışmada, Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden temin edilen 2(3),9(10),16(17),23(24)-tetrakis- (sodyum merkaptotanesulfonat)- bakır (II) fitalosiyanin ve 2(3),9(10),16(17),23(24)-tetrakis-(sodyum merkaptotanesulfonat) metallsiz fitalosiyanin formülündeki fitalosiyanin türevleri kullanılmıştır. *A. platensis* (M2) suşu Soley Mikroalg Enstitüsünden temin edilerek ve Sakarya Üniversitesi Bitki Fizyolojisi ve Alg Ekolojisi laboratuvarından alınan yetiştirilmiştir.

3.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışma için gerekli olan ve kullanılan cihazlar Tablo 3.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Kullanılan cihazlar		
Cihaz	İşlev	Marka
Buzdolabı	Numune ve çözeltilerin saklanması	Beko
Etüv	Kurutma ve sterilizasyon	Nüve
Hassas Terazı	Tartım	Schimadzu SLB 320
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	Çözelti hazırlanması	Dragon me M 10068
İklimlendirme kabini	Alg kültürü	Dev/Pet
Soğutuculu Mikrosantifürüj	Süpernatant eldesi	Centrion scientific K3
Soğutuculu Santifürüj	Pelet eldesi	Nüve
Mikropipet	Enzim analizleri	Nichipet (100-1000µL)
Mikropipet	Enzim analizleri	Eppendorf (10-100µL)
Mikropipet	Solüsyon hazırlanması ve enzim analizleri	Eppendorf (1-10 mL)
Otoklav	Sterilizasyon	Alp
pH metre	pH ölçümleri	Metler Toledo

3.3. Yöntem

3.3.1. Hücre kültürünün hazırlanması

A. platensis M2 suşu aksenik koşullarda hazırlanan Spirulina Medium (Aiba ve Ogawa, 1977) ortamında kültüre alınmıştır (Tablo 3.2. ve Tablo 3.3.). 180 mL kültür besiyerine, 20 mL alg kültürü ekimi yapılarak 250 mL'lik erlenlerde on gün beklemeye bırakılmıştır. Kültür koşulları olarak full spektrum lambalar ile aydınlatılan iklimlendirme kabini içinde 5000 lux ışık şiddeti (12 saat aydınlık, 12 saat karanlık) ve 30°C sıcaklık uygulanmıştır.

Tablo 3.2. Spirulina Medium İçeriği (Aiba ve Ogawa, 1977).

Solüsyon (SL)	Hacim (mL)	Bileşik	SL Konsantrasyon
SL- A	500 mL	NaHCO ₃	13.61 g 500 mL ⁻¹
		NaCO ₃	4.03 g 500 mL ⁻¹
		K ₂ HPO ₄	0.50 g 500 mL ⁻¹
		NaNO ₃	2.50 g 500 mL ⁻¹
SL-B	500 mL	K ₂ SO ₄	1.00 g 500 mL ⁻¹
		NaCl	1.00 g 500 mL ⁻¹
		MgSO ₄ .7H ₂ O	0.20 g 500 mL ⁻¹
		FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01 g 500 mL ⁻¹
		EDTA	0.08 g 500 mL ⁻¹
		Mikrobesin tuzu	5.0 mL 500 mL ⁻¹

Tablo 3.3. Mikrobesin tuzlarının içeriği

Solüsyon (SL)	Bileşik	Miktar
SL-1	Distile su	881 mL
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1mL
	MNSO ₄ .4H ₂ O	2 mL
	H ₃ BO ₃	5 mL
	CO(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	5 mL
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	5 mL
	Cu So ₄ .5H ₂ O	1 mL
	EDTA	0.4 g
SL-2	FE SO ₄ .7H ₂ O	0.7 g
	EDTA	0.4 g
	Distile su	100 mL

3.3.2. Uygulanan fitalosiyenin derişimleri

Çalışmada 1/10 oranında seyreltilen sentezlenen fitalosiyenin türevleri konsantrasyonları kullanılmıştır. Bu konsantrasyonlar yapılan ön denemeler sonucunda belirlenen EC50 değerin altında olacak şekilde ayarlanmış olup Tablo 3.4.'de verilmiştir.

Tablo 3.4. *Arthrospira platensis* 'e uygulanan fitalosiyenin derişimleri

Metalsiz	Bakırlı(Cu)
0,125 ppb	0,125 ppb
0,25 ppb	0,25 ppb
0,50 ppb	0,50 ppb
1 ppb	1 ppb
1,5 ppb	1,5 ppb

3.3.3. Deney ortamı ve düzeneği

Fitalosiyenin uygulamalarından önce 250 mL *A. platensis* kültürü hazırlanmış ve 10 gün boyunca ortama adaptasyon için iklimlendirme dolabında belirtilen şartlarda bekletilmiştir. Kùltürler 10 günün sonunda içerdđđ klorofil-*a* miktarı 1 µg mL⁻¹ ve kullanılacak kùltür miktarı 50 mL olacak şekilde yenilenmiştir.

Belirtilen konsantrasyonlarda fitalosiyenin çözeltileri hazırlanmış ve aktifleşmiş kùltürlere uygulanmıştır. Ortamın pH'sı 9 olarak ayarlanmıştır. Deneyler üç tekrarlı yapılmıştır. Bu süre zarfında *A. platensis* M2'nin optik yoğunluk (OD) ve fotosentetik pigment (klorofil-*a*) miktarlarındaki değışim 24 saatte bir ölçülerek kayıt edilmiştir. 7. günün sonunda kùltürler homojenizasyon işlemine tabii tutulmuş ve bu homojenatlar -20°C'de süperoksit dismütaz (SOD), glutatyon redùktaz (GR), askorbat peroksidaz (APOD) enzim deneyleri ve MDA, H₂O₂ ve prolin analizleri için saklanmıştır.

3.4. Ölçüm ve Analizler

3.4.1. Optik yoğunluğun (OD) ve büyüme oranının belirlenmesi

Algin optik yoğunluğu (OD) ve büyüme hızı spektrofotometrede 560 nm 'deki absorbans değerleri ölçülerek bulunmuştur. Ölçümlerde 1/10 oranında besiyeri ile seyreltme yapılmıştır (100 µL kültür, 900 µL Spirulina Medium besiyeri).

Bu esnada kör çözeltisi olarak Spirulina Medium besiyeri kullanılmıştır. Her ölçüm 24 saatte bir olacak şekilde 7 gün boyunca OD değerindeki değişim izlenmiştir. Böylelikle büyüme oranı hesaplanmıştır.

3.4.2. Fotosentetik pigment analizi (Klorofil-a)

Klorofil-a ölçümü için 1/10 oranında saf metanol ile ekstraksiyon yapılmıştır (100 µL kültür, 900 µL saf metanol). Bunun için 1 dk. vortekslenen örnekler 2 dk. 13.800 rpm ve +4°C'de mikrosantrifüj ile santrifüjlenmiştir. Daha sonra spektrofotometrede 665 nm dalga boyunda absorbansda ölçülmüştür. Kör çözeltisi olarak saf metanol kullanılmıştır (Mackinney, 1941).

3.4.3. Toplam protein analizi

Toplam protein aktivitesinin belirlenmesi için Bradford (1976) yöntemi kullanılmıştır. Alınan 2 mL'lik kültürler 15000 rpm'de +4 °C'de 20 dk. santrifüjlendikten sonra SOD ve GR analizleri için yaklaşık 0.2 g olan pellet elde edilmiştir. Bu pellet homejenizasyon için kullanılmış, gerekli olan ekstraksiyon solüsyonu 100 mM potasyun-fosfat (pH = 7.0), %2'lik PVP (polivinilpirolidon) ve 1 mM Sodyum EDTA (Na₂EDTA) ile hazırlanmıştır. APOD analizi için ise 50 mM Tris-HCl (pH = 7.2), % 2'lik PVP, 1 mM Na₂EDTA ve 2 mM askorbat ile hazırlanmıştır. Son hacmi 5.5 mL olan reaksiyon solüsyonu için sırasıyla 100 µg protein içeren enzim karışımı, 0.031 M Sitrat-Fosfat tamponu (pH = 5.5) ve %0.01'lik Coomassie Brilliant Blue G-250 kullanılmıştır. Örnekler 10-15 sn. süre ile

vorteksleme işlemine tabii tutulduktan sonra, 30 dk. karanlıkta bekletilmiştir. Spektrofotometrede 595 nm’de yapılan ölçümlerden elde edilen sonuçlar ile protein miktarlarındaki değişim daha önce hazırlanmış olan standart grafikten faydalanarak bulunmuştur.

3.4.4. Toplam Süperoksit dismutaz (SOD)

Toplam SOD aktivitesi için Beyer ve Fridovich (1987) metodu kullanılmıştır. 2 mL hacimde alınan kültürlerden 15000 rpm ve +4°C’de 20 dk. santrifüjlendikten sonra elde edilen pellet 100 mM potasyun-fosfat (pH = 7.0), %2’lik PVP (polivinilpirolidon) ve 1 mM Sodyum EDTA (Na₂EDTA) içeren çözelti ile ekstrakte edilmiştir. 14.000 rpm ve +4 °C’de 20 dk. santrifüjden sonra süpernatantlar alınmıştır. 100 mM potasyun-fosfat tamponu (pH = 7.8), 9.9x10⁻³ M metionin, 5.7x10⁻⁵ M NBT (nitroblue tetrazolyum), % 1’lik triton X-100 ile hazırlanan reaksiyon çözeltisine son hacim 1030 µL olacak şekilde ilave edilmiştir. Reaksiyonun başlaması için 0.9 µM riboflavin eklenmesi yapılmıştır. Tüpler 15 dk boyunca 375 µmol m⁻²s⁻¹ şiddetinde ışığa maruz bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda 560 nm’de spektrofotometrede absorbans değerleri okunmuştur. Toplam SOD aktivitesi daha önce hazırlanmış olan standart grafik kullanılarak bulunmuştur (U/mg protein).

3.4.5. Toplam Askorbat peroksidaz (APOD) aktivitesi

Toplam APOD aktivitesi için Wang ve ark. (1991) metodu kullanılmıştır. 2 mL’lik kültürler 15000 rpm ve +4°C’de 20 dk santrifüjlendikten sonra elde edilen pellet 50 mM Tris-HCl (pH = 7.2), % 2’lik PVP, 1 mM sodyum EDTA (Na₂EDTA) ve 2 mM askorbat içeren çözelti ile ekstrakte edilmiştir. 14.000 rpm ve +4 °C’de 20 dk santrifüjden sonra süpernatantlar alınmıştır. 100 µg protein içeren enzim karışımı, 50 mM potasyum-fosfat tamponu (pH = 6.6), 2.5 mM askorbattan oluşan reaksiyon çözeltisine ilave edilmiştir. Reaksiyon, son hacim 1000 µL olacak şekilde 10 mM hidrojen peroksit (H₂O₂) ilavesiyle başlatılmıştır. Absorbans değerleri spektrofotometrede 290 nm’de 1 dk boyunca alınmıştır. Enzim aktivitesi, askorbatın

ekstinksiyon katsayısı (2.8 mM/cm.290 nm) ile reaksiyonun başlangıç hızından hesaplanmıştır (nmol askorbat/dakika/mg protein).

3.4.6. Toplam Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesi

Toplam GR aktivitesi için Sgherri ve ark. (1994) metodu uygulanmıştır. Alınan 2 mL'lik kültürler 15000 rpm ve +4°C'de 20 dk santrifüjlendikten sonra elde edilen pellet, 100 mM potasyum-fosfat (pH = 7.0), %2'lik PVP (polivinilpirolidon) ve 1 mM sodyum EDTA (Na₂EDTA) içeren çözelti ile ekstrakte edilmiştir. 14.000 rpm ve +4 °C'de 20 dk santrifüjden sonra süpernatantlar alınmıştır. 100 µg protein içeren süpernatant, 100 mM potasyum-fosfat tamponu (pH = 7.8), 2 mM sodyum EDTA (Na₂EDTA), 0.5 mM okside glutasyon (GSSG) içerisine eklenmiştir. Reaksiyon, son hacim 1000 µL olacak şekilde, 0.2 mM nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) ilavesiyle başlatılmıştır. Absorbans değerleri spektrofotometrede 320 nm'de 1 dk boyunca alınmıştır. Düzeltme, NADPH yokluğunda GSSG yükseltgenmesi ile yapılmıştır. Enzim aktivitesi, NADPH'nin ekstinksiyon katsayısı (6.2 mM/cm. 340 nm) ile reaksiyonun başlangıç hızından hesaplanmıştır (nmol NADPH/dakika/mg protein).

3.4.7. Malondialdehit (MDA) analizi

Malondialdehit miktarının belirlenmesi Heath ve Packer (1968)'e göre yapılmıştır. 15 mL kültür ortamı 4000 rpm ve +4°C'de 15 dk. santrifüjlendikten sonra pellet elde edilmiştir. Elde edilen bu pellet 5 mL 0.1%, triklorikasit (TCA) (4°C) ile homojenize edilmiş, sonra 4100 rpm'de 10 dk santifürüj edilmiştir. 0.5 mL süpernatant, 0.5 mL 0.1 M Tris-HCl (pH 7.6) ve 1 ml TCA-TBA çözeltisi (15% w/v) (trikloroasetik asit-0.375% w/v tiyobarbitürikasit) ile karıştırılmıştır ve 30 dk sıcak su banyosunda (95 °C) bekletilmiştir. Reaksiyon karışımlarının absorbansları 532 ve 600 nm dalga boyunda ölçülmüş ve MDA miktarı ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

3.4.8. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) analizi

H₂O₂ miktarının belirlenmesi Heath ve Packer (1968)'e göre yapılmıştır. 15 mL hacimde alınan kültürlerden 4000 rpm ve +4°C'de 15 dk. santrifüjlendikten sonra yaklaşık 0.2 g olan pellet elde edilmiştir. Elde edilen bu pellet 5 mL 0.1% TCA (4°C) ile homojen edilmiş sonra 4100 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiştir. 0.5 mL süpernatanta, 0.5 mL 0.1 M Tris-HCl (pH = 7.6) ve 1 mL 1 M KI (potasyum iyodür) eklenmiş ve 390 nm dalga boyundaki absorbans değerleri belirlenmiştir. H₂O₂ miktarı daha önce hazırlanmış olan standart grafik yardımıyla hesaplanmıştır.

3.4.9. Prolin analizi

Prolin içeriği Bates ve ark. (1973) tarafından belirlenen metoda göre spektrofotometrede 520 nm' de absorbansın ölçülmesiyle belirlenmiştir. 15 mL hacimde alınan kültürlerden 4000 rpm ve +4°C'de 15 dk. santrifüjlendikten sonra yaklaşık 0.2 g olan pellet elde edilmiştir. Elde edilen bu pellet 10 mL distile su ile homojenize edildikten sonra tüpler sıcak su banyosunda (95 °C) 30 dk. bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda örnek soğutulduktan sonra 10 dk. 4100 rpm'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatanttan prolin miktarı (µmol/g kuru ağırlık) asit-ninhidrin yöntemine göre 520 nm dalga boyunda yapılan okumalara göre spektrofotometrik olarak bulunmuştur.

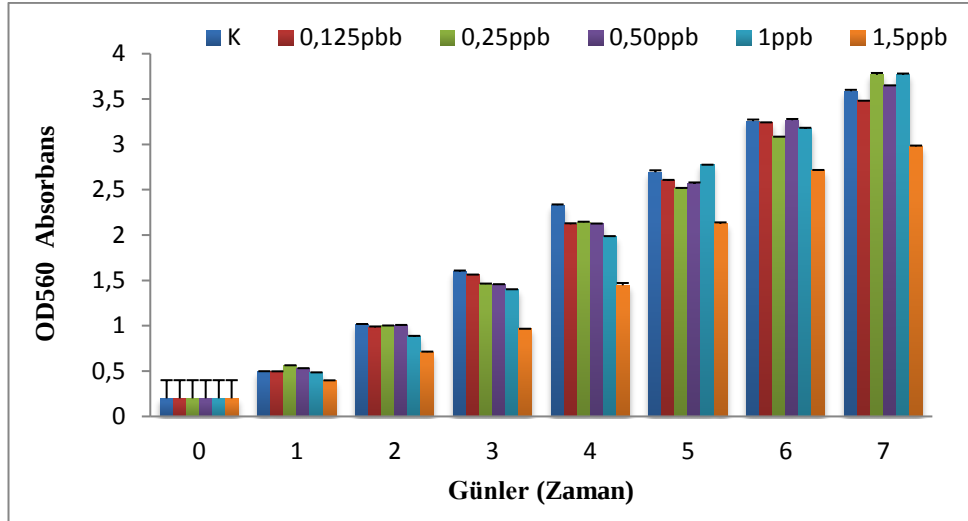
3.4.10. İstatistiksel analizler

İstatistiksel analizler için, verilere SPSS 20.0 paket programında yer alan tek yönlü varyans analizi ile (ANOVA) yapılmış ve değişkenler arasındaki farklılığın belirlenmesi için LSD testi yapılmıştır. Her bir bağımsız değişken için uygulama ve çeşitler arasındaki farkın önem kontrolü %5 düzeyinde hesaplanmıştır.

BÖLÜM 4. BULGULAR

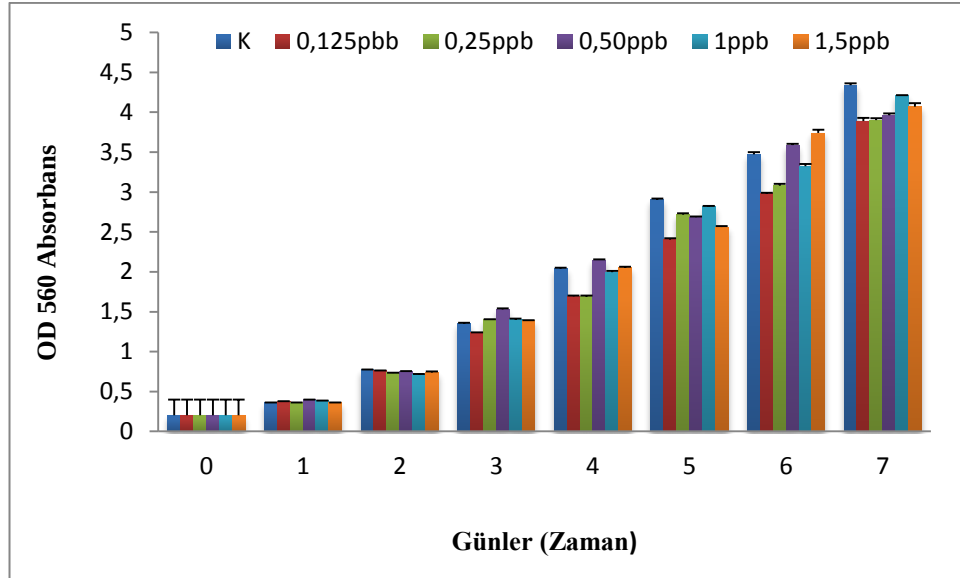
4.1. Optik Yoğukluk (OD)

A. platensis algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı ve metalsiz fitalosiyanin türevlerinin biyokütleye olan etkisi OD 560 değeri ölçülerek Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.'de verilmiştir. Bakır ilaveli fitalosiyanin türevinin, OD 560 değerinde 1. gün 0,125 ppb, 1 ppb ve 1,5 ppb konsantrasyonlarında azalma gözlenmiştir ($p<0.05$). 0,25 ppb ve 0,50 ppb konsantrasyonlarında anlamlı değişim gerçekleşmiştir ($p<0.05$). 2, 3 ve 4. günlerde tüm konsantrasyonlarda kontrol gurubuna göre anlamlı azalma gözlenmiştir ($p<0.05$). 5. gün 1 ppb konsantrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artma gözlemlenirken ($p<0.05$); 6. gün 0,50 ppb konsantrasyonunda anlamlı artma gerçekleşmiştir ($p<0.05$). Diğer konsantrasyonlarda her iki günde anlamlı azalma gerçekleşmiştir ($p<0.05$). 7. gün 0,125 ppb ve 1,5 ppb konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı azalma gerçekleşirken ($p<0.05$), diğer konsantrasyonlarda anlamlı artma gerçekleşmiştir ($p<0.05$). Fitalosiyanin uygulamalarının 24. saatten itibaren biyokütle üzerinde inhibisyon etkisini göstermeye başladığı ve en şiddetli inhibisyonun uygulanan en yüksek konsantrasyonda ortaya çıktığı gözlenmiştir.



Şekil 4.1. *A. platensis* algine uygulanan bakırlı fitalosiyanın türevine bağlı olarak OD 560 değerinin 7 günlük değişimi

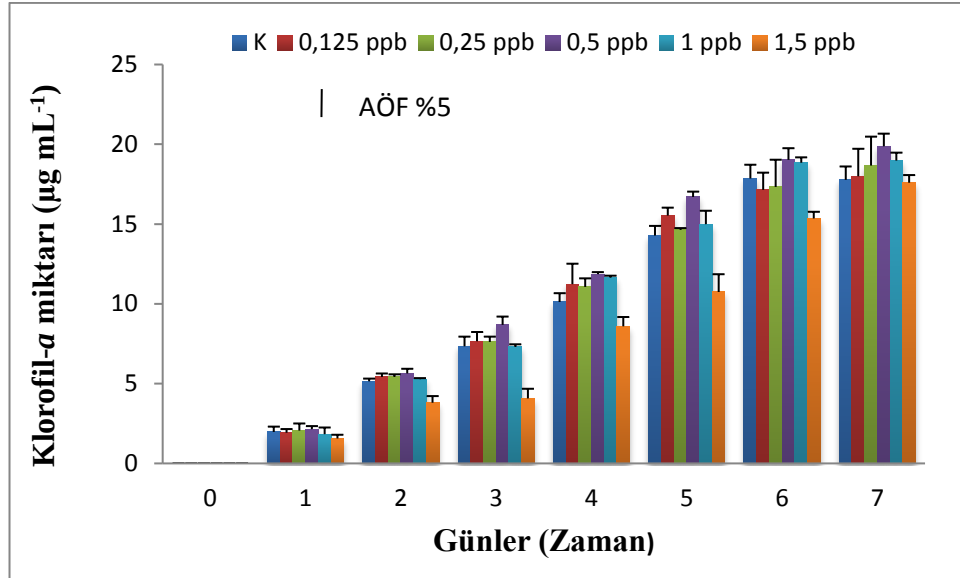
Metalsiz fitalosiyanın türevinin OD560 değerinde 1. gün 0,25 ppb ve 1,5 ppb konsantrasyonlarında azalma gözlenmiştir ($p<0.05$). Diğer konsantrasyonlarda kontrol guruba göre anlamlı artma gözlenmiştir ($p<0.05$). 2. gün tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlenmiştir ($p<0.05$). 3. gün 0,125 ppb konsantrasyonunda kontrol grubuna göre anlamlı azalma gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Diğer konsantrasyonlarda anlamlı artma gerçekleşmiştir ($p<0.05$). 4. gün 0,50 ppb konsantrasyonunda kontrol grubua göre anlamlı artma gerçekleşmiştir ($p<0.05$). 5. gün tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlenmiştir ($p<0.05$). 6. gün 0,50 ppb ve 1,5 ppb konsantrasyonunda kontrol grubua göre anlamlı artma gerçekleşmiştir ($p<0.05$). 7. gün aralığında tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlenmiştir ($p<0.05$). Fitalosiyanın uygulamalarının 24. saatten itibaren biyokütle üzerinde inhibisyon etkisini göstermeye başladığı ve en şiddetli inhibisyonun uygulanan en yüksek konsantrasyonda ortaya çıktığı gözlenmiştir.



Şekil 4.2. *A. platensis* algine uygulanan metallsiz fitalosiyenin türevine bağlı olarak OD 560 değerinin 7 günlük değişimi

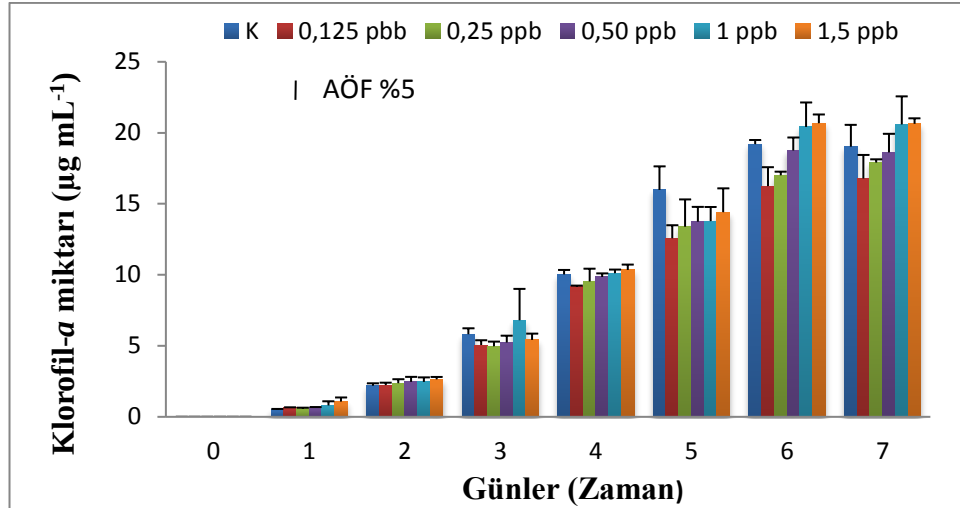
4.2. Fotosentetik Pigment Analizi (Klorofil-a)

A. platensis algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı ve metallsiz fitalosiyenin türevlerinin klorofil-a miktarı üzerindeki etkisi Şekil 4.3. ve 4.4.'de verilmiştir. Bakırlı fitalosiyenin türevinin klorofil-a miktarının kontrol grubuna göre 1. gün tüm konsantrasyonlarında anlamlı değişim gözlenmemiştir. 2. gün 1,5 ppb konsantrasyonunda kontrol grubuna göre anlamlı azalma gözlenmiştir ($p < 0.05$). 3. gün 0,50 ppb konsantrasyonunda kontrol gurubuna göre anlamlı artma gözlemlenirken ($p < 0.05$); 1,5 ppb konsantrasyonu anlamlı olarak azalma göstermiştir ($p < 0.05$). Diğer günler 0,25 ppb, 0,50 ppb ve 1ppb konsantrasyonları anlamlı artarken ($p < 0.05$); 1,5 ppb konsantrasyonunda kontrol grubuna göre anlamlı azalma gözlemlenmiştir ($p < 0.05$).



Şekil 4.3. *A. platensis* algine uygulanan bakırlı fitalosiyanın türevine bağlı olarak klorofil-a miktarının 7 günlük değişimi

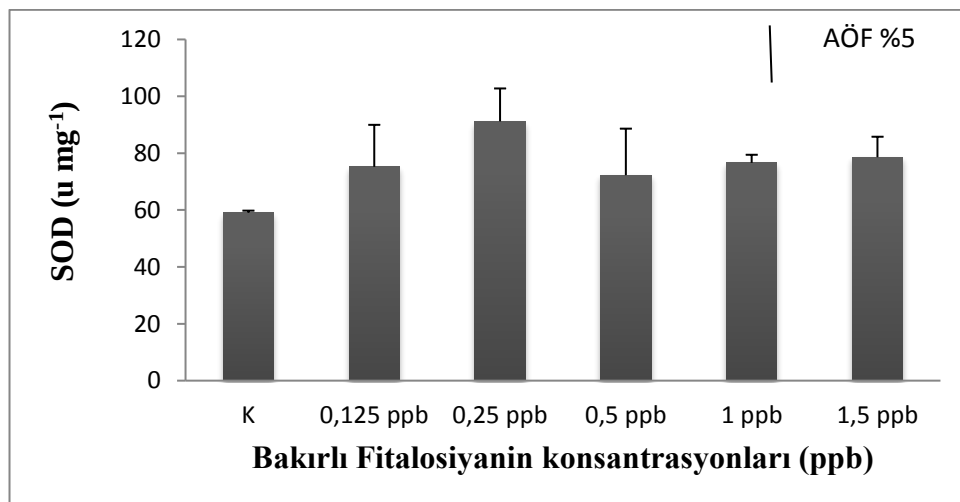
Metalsiz fitalosiyanın türevlerinin klorofil-*a* miktarında kontrol grubuna göre 1. gün ve 4. gün aralığında tüm konsantrasyonlar anlamlı değişim göstermemiştir. 5. gün tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre anlamlı azalma gözlemlenirken ($p < 0.05$); 6. gün 0,125 ppb ve 0,25 ppb konsantrasyonlarında azalma gözlenmiş ($p < 0.05$) 1 ppb ve 1,5 ppb konsantrasyonunda kontrol grubuna göre anlamlı artma gözlenmiştir ($p < 0.05$). 7. günde 0,125 ppb 0,25 ppb ve 0,50 ppb konsantrasyonunda klorofil-*a* miktarındaki değişim kontrol grubuna göre azalma gösterirken ($p < 0.05$); 1 ppb ve 1,5 ppb konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı artma göstermiştir ($p < 0.05$).



Şekil 4.4. *A. platensis* algine uygulanan metalsiz fitalosiyenin türevine bağlı olarak klorofil-a miktarının 7 günlük değişimi

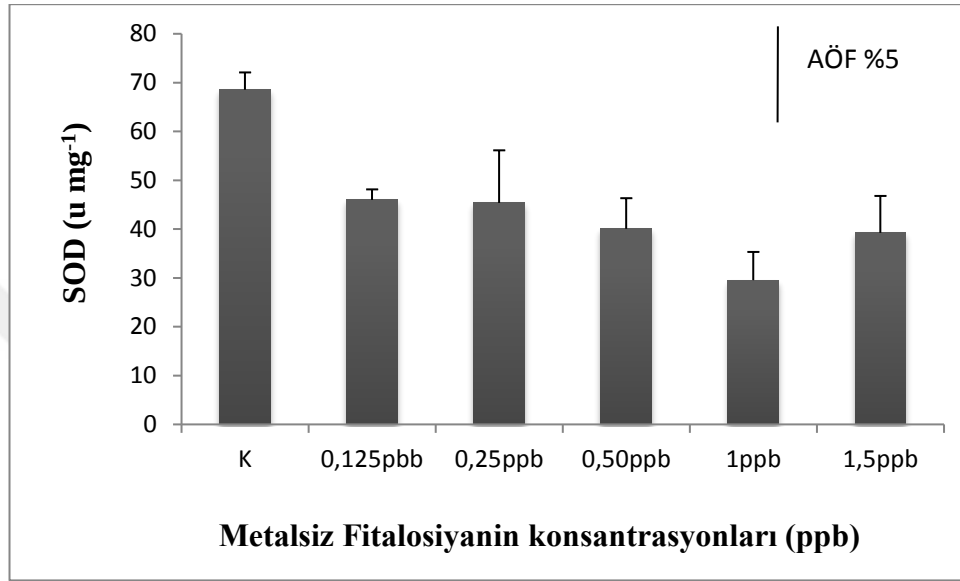
4.3. Toplam Süperoksit Dismutaz Aktivitesi

A. platensis algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı ve metalsiz fitalosiyenin türevlerinin toplam süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi üzerindeki etkisi Şekil 4.5. ve 4.6.'de verilmiştir. Bakırlı fitalosiyenin etkisine maruz bırakılan *A. platensis*'in SOD aktivitesi 0,25 ve 1,5 ppb konsantrasyonlarında kontrole göre anlamlı bir artma göstermiştir ($p < 0.5$). SOD aktivitesinin en yüksek ($90,1 \text{ U mg protein}^{-1}$) ve en düşük ($72,2 \text{ U mg protein}^{-1}$) olduğu değerler sırasıyla 0,25 ppb ve 0,50 ppb bakırlı fitalosiyenin konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.



Şekil 4.5. *A. platensis* algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı fitalosiyenin türevine bağlı olarak Toplam SOD aktivitesinde görülen değişim

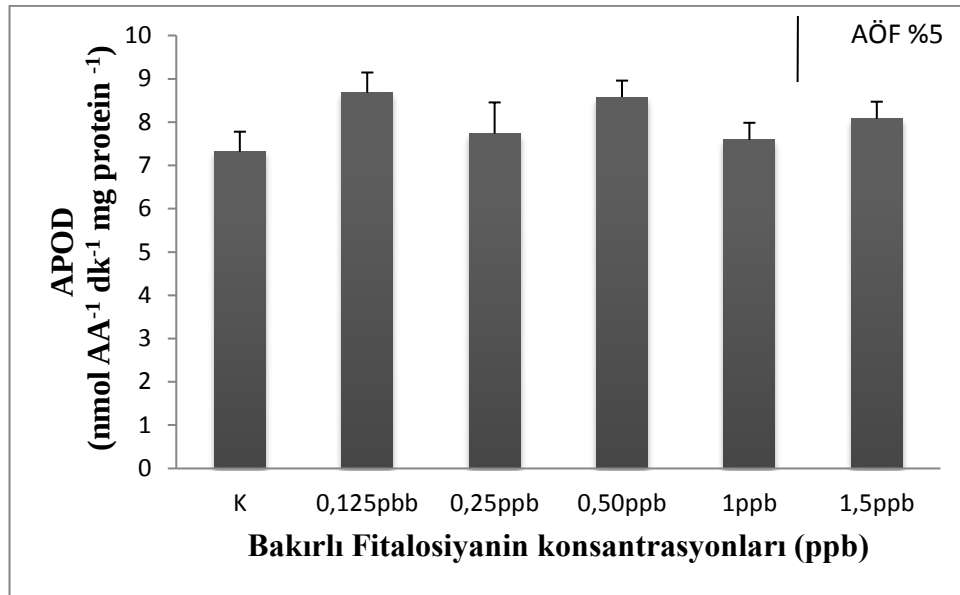
Metalsiz fitalosiyenin türevine maruz bırakılan *A. platensis* alginin tüm konsantrasyonlarda toplam SOD aktivitesi kontrol grubuna göre değişim göstermemiştir. SOD aktivitesinin en yüksek ($45,9 \text{ U mg protein}^{-1}$) ve en düşük ($29,5 \text{ U mg protein}^{-1}$) olduğu değerler sırasıyla 0,125 ppb ve 1 ppb metalsiz fitalosiyenin konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.



Şekil 4.6. *A. platensis* algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki metalsiz fitalosiyenin türevine bağlı olarak Toplam SOD aktivitesinde görülen değişim

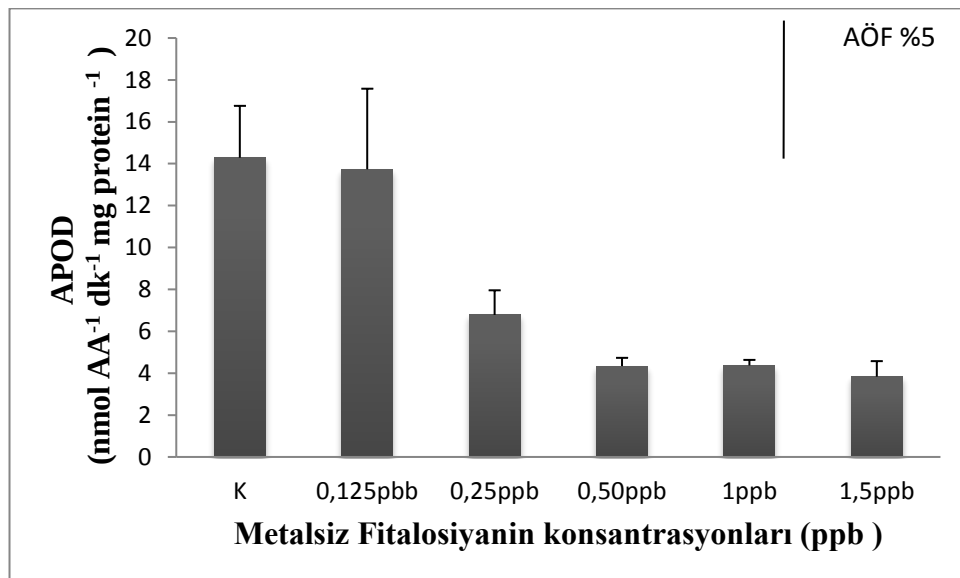
4.4. Toplam Askorbat Peroksidaz Aktivitesi

A. platensis algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı ve metalsiz fitalosiyenin türevlerinin toplam askorbat peroksidaz (APOD) enzim aktivitesi üzerindeki etkisi Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.'de verilmiştir. Bakırlı fitalosiyenin türevlerinin etkisine maruz bırakılan *A. platensis* alginde kontrol grubuna göre tüm konsantrasyonlarda anlamlı artma gözlenmiştir ($p < 0.5$). APOD aktivitesinin en yüksek ($8,6 \text{ nmol askorbat dak.}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$) ve en düşük ($7,59 \text{ nmol askorbat dak.}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$) olduğu değerler sırasıyla 0,125 ppb ve 1 ppb konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.



Şekil 4.7. *A. platensis* algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı fitalosiyenin türüne bağlı olarak toplam APOD aktivitesinde görülen değişim

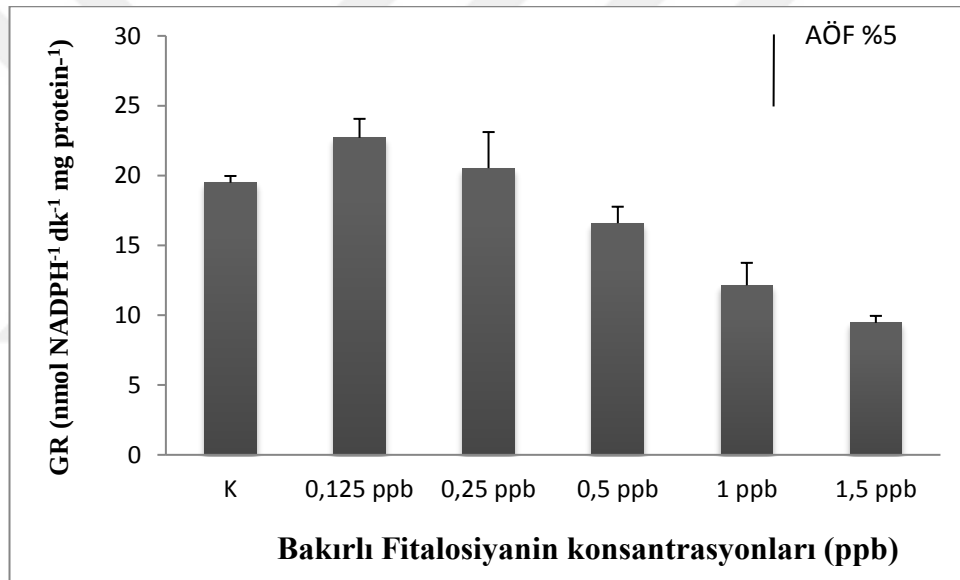
Metalsiz fitalosiyenin türlerinin etkisine maruz bırakılan *A. platensis* alginde kontrol grubuna göre 0,25, 0,50, 1 ve 1,5 ppb konsantrasyonlarında APOD aktivitesi anlamlı azalma göstermiştir ($p < 0,05$). APOD aktivitesinin en yüksek (13,74 nmol askorbat dak.⁻¹ mg protein⁻¹) ve en düşük (3,83nmol askorbat dak.⁻¹mg protein⁻¹) olduğu değerler sırasıyla 0,125 ppb ve 1,5 ppb konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.



Şekil 4.8. *A. platensis* algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki metalsiz fitalosiyenin türüne bağlı olarak toplam APOD aktivitesinde görülen değişim

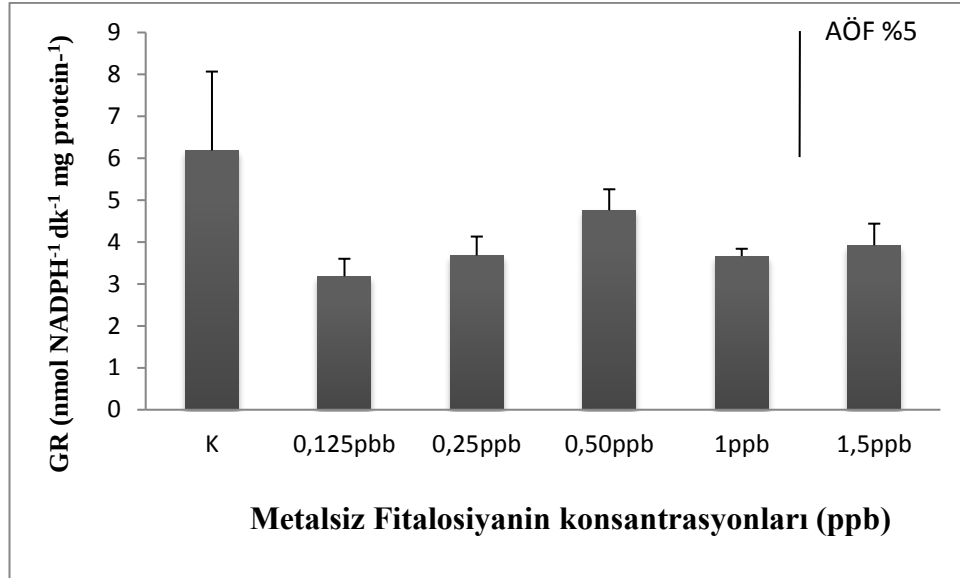
4.5. Toplam Glutasyon Redüktaz Aktivitesi

A. platensis algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı ve metalsiz fitalosiyenin türevlerinin toplam glutasyon redüktaz (GR) enzim aktivite üzerindeki etkisi Şekil 4.9. ve Şekil 4.10.'da verilmiştir. *A. platensis* kültürlerinde GR enzim aktivitesi kontrole göre istatistiksel olarak 1 ve 1,5 ppb bakırlı fitalosiyenin konsantrasyonlarında anlamlı bir azalma göstermiştir ($p < 0,05$). GR aktivitesinin en yüksek ($22,7 \text{ nmol NADPH dk.}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$) ve en düşük ($9,4 \text{ nmol NADPH dk.}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$) olduğu değerler sırasıyla 0,125 ppb ve 1,5 ppb bakırlı fitalosiyenin konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.



Şekil 4.9. *A. platensis* algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı fitalosiyenin türevine bağlı olarak Toplam GR aktivitesinde görülen değişim

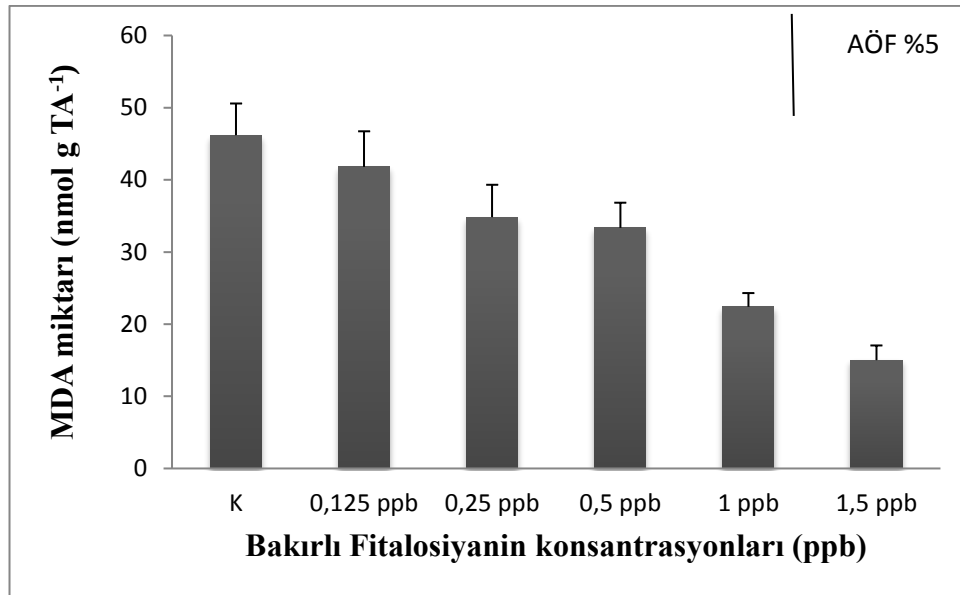
0,125 ppb, 0,25 ppb, 0,50 ppb, 1 ppb ve 1,5 ppb metalsiz fitalosiyenin türevlerinin konsantrasyonlarına maruz bırakılan *A. platensis* kültürlerinde GR enzim aktivitesi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermemiştir. GR aktivitesinin en yüksek ($4,76 \text{ nmol NADPH dk.}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$) ve en düşük ($3,18 \text{ nmol NADPH dk.}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$) olduğu değerler sırasıyla 0,50 ve 0,125 ppb metalsiz fitalosiyenin konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.



Şekil 4.10. *A. platensis* algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki metalsiz fitalosiyanin türevine bağlı olarak toplam GR aktivitesinde görülen değişim

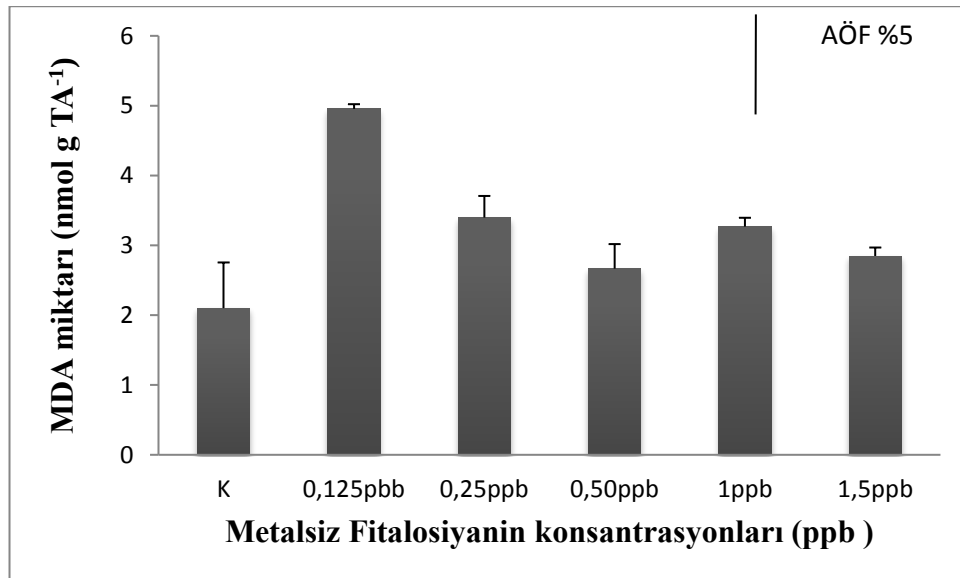
4.6. Malondialdehit (MDA) Miktarı

A. platensis algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı ve metalsiz fitalosiyanin türevlerinin MDA miktarına etkisi Şekil 4.11. ve 4.12.'de verilmiştir. *A. platensis*'in MDA miktarı 1 ve 1,5 ppb bakırlı fitalosiyanin konsantrasyonlarında anlamlı azalma göstermiştir ($p < 0,05$). MDA miktarının en yüksek ($41,79 \text{ nmol g TA}^{-1}$) ve en düşük ($15,02 \text{ nmol g TA}^{-1}$) olduğu değerler sırasıyla 0,125 ve 1,5 ppb bakırlı fitalosiyanin konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.



Şekil 4.11. *A. platensis* algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı fitalosiyani türevine bağlı olarak MDA miktarında görülen değişim

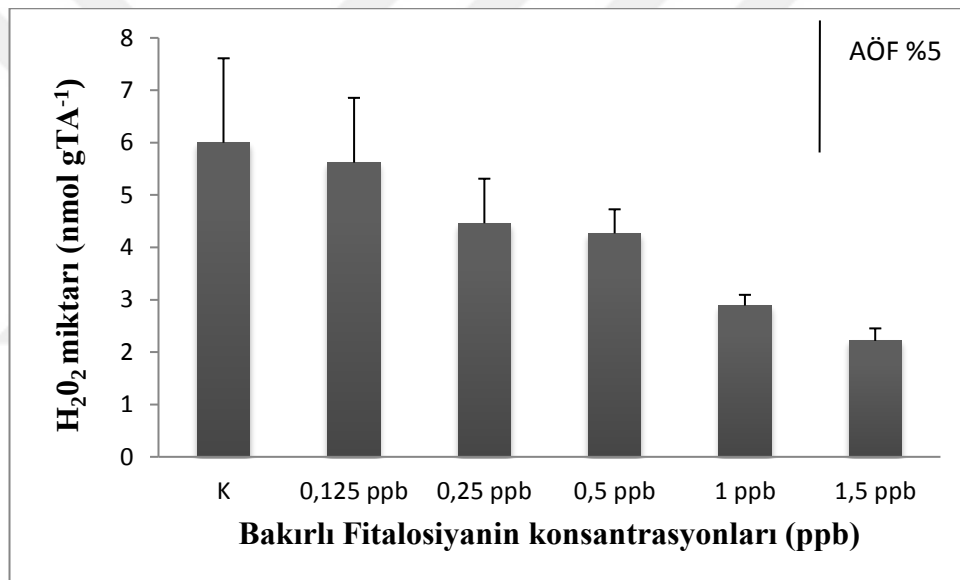
0,125 ppb, 0,25 ppb, 0,50 ppb, 1ppb ve 1,5 ppb konsantrasyonlarında metalsiz fitalosiyani türevlerinin etkisine maruz bırakılan *A. platensis* alginin 0,125, 0,25 ve 1 ppb konsantrasyonunda MDA miktarı anlamlı artma göstermiştir ($p < 0,05$). MDA miktarının en yüksek ($4,95 \text{ nmol g TA}^{-1}$) ve en düşük ($2,67 \text{ nmol g TA}^{-1}$) olduğu değerler sırasıyla 0,125 ppb ve 0,50 ppb metalsiz fitalosiyani konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.



Şekil 4.12. *A. platensis* algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki metalsiz fitalosiyani türevine bağlı olarak MDA miktarında görülen değişim

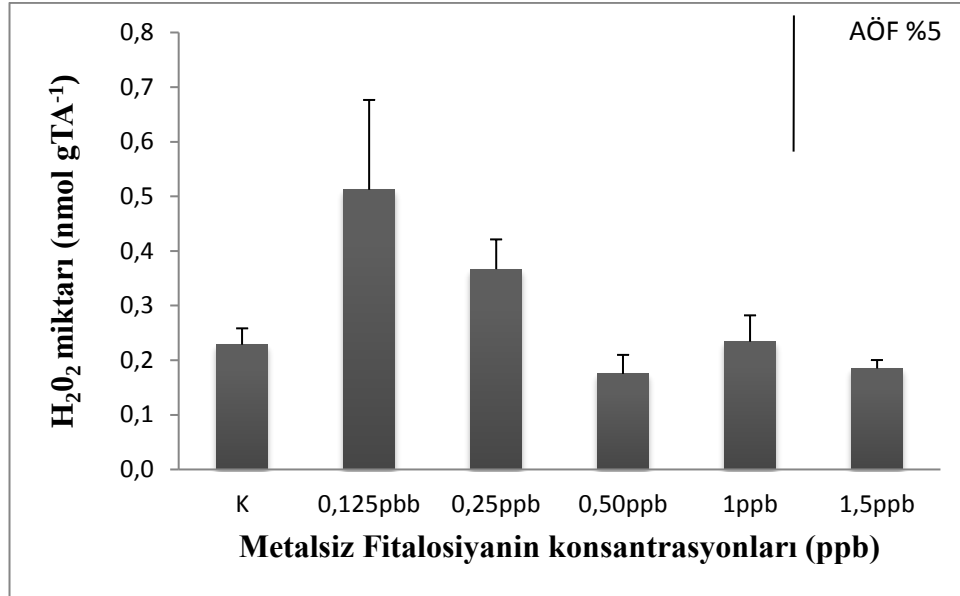
4.7. Hidrojen peroksit (H₂O₂) Miktarı

A. platensis algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı ve metalsiz fitalosiyanin türevlerinin H₂O₂ miktarına etkisi Şekil 4.13. ve 4.14.'de verilmiştir. 0,125, 0,25 ve 0,50 ppb konsantrasyonlarında bakırlı fitalosiyanin etkisine maruz bırakılan *A. platensis* kültürlerinin H₂O₂ miktarı kontrole göre anlamlı olarak değişim göstermemiştir. H₂O₂ miktarı 1 ppb ve 1,5 ppb konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p < 0.5$). H₂O₂ miktarının en yüksek (5,62 nmol g TA⁻¹) ve en düşük (2,21 nmol g TA⁻¹) olduğu değerler sırasıyla 0,125 ve 1,5 ppb bakırlı fitalosiyanin konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.



Şekil 4.13. *A. platensis* algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı fitalosiyanin türevine bağlı olarak H₂O₂ miktarında görülen değişim

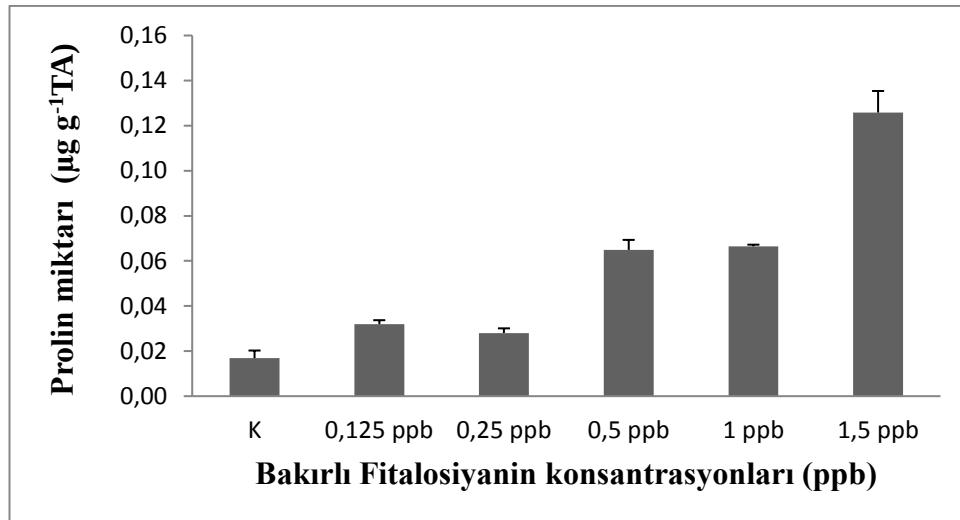
Metalsiz fitalosiyanin etkisine maruz bırakılan *A. platensis* kültürlerinin H₂O₂ miktarı kontrole göre 0,25, 0,50, 1 ve 1,5 ppb konsantrasyonlarında anlamlı değişim göstermemiştir. 0,125 ppb konsantrasyonunda kontrole göre anlamlı artmıştır ($p < 0,05$). H₂O₂ miktarının en yüksek (0,51 nmol g TA⁻¹) ve en düşük (0,17 nmol g TA⁻¹) olduğu değerler sırasıyla 0,125 ppb ve 0,50 ppb konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.



Şekil 4.14. *A. platensis* algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki metalsiz fitalosiyenin türevine bağlı olarak H₂O₂ miktarında görülen değişim

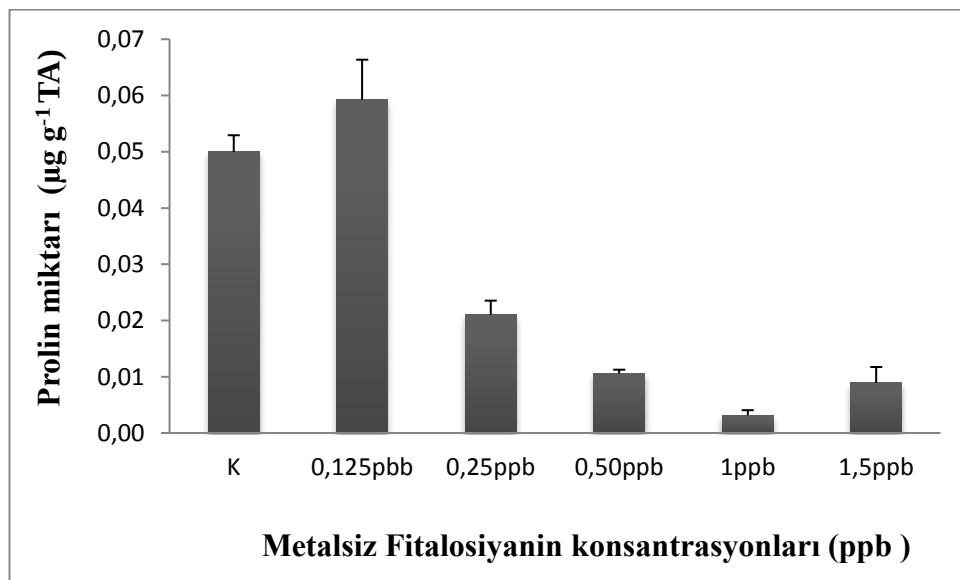
4.8. Serbest Prolin Miktarı

A. platensis algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı ve metalsiz fitalosiyenin türevlerinin serbest prolin miktarına etkisi Şekil 4.15. ve 4.16.'de verilmiştir. 0,125, 0,25, 0,50, 1 ve 1,5 ppb konsantrasyonunda bakırlı fitalosiyenin etkisine maruz bırakılan *A. platensis* kültürlerinin serbest prolin miktarı kontrole göre istatistiksel olarak artma göstermiştir ($p < 0.05$). Serbest prolin miktarının en yüksek ($0,13 \mu\text{mol g TA}^{-1}$) ve en düşük ($0,03 \mu\text{mol g TA}^{-1}$) olduğu değerler sırasıyla 1,5 ve 0,25 ppb konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.



Şekil 4.15. *A. platensis* algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı fitalosiyenin türüne bağlı olarak serbest prolin miktarında görülen değişim

0,25, 0,50, 1 ve 1,5 ppb konsantrasyonunda metalsiz fitalosiyenin etkisine maruz bırakılan *A. platensis* kültürlerinin serbest prolin miktarı kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı azalma göstermiştir ($p < 0.05$). Serbest prolin miktarının en yüksek ($0,05 \mu\text{mol g TA}^{-1}$) ve en düşük ($0,008 \mu\text{mol g TA}^{-1}$) olduğu değerler sırasıyla 0,125 ppb ve 1,5 ppb konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.



Şekil 4.16. *A. platensis* algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki metalsiz fitalosiyenin türüne bağlı olarak serbest prolin miktarında görülen değişim

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan bu çalışmada *A. platensis* alginin üzerine bakırlı ve metalsiz fitalosiyenin türevlerinin farklı konsantrasyonlarda etki etmesi sonucu algin OD560, klorofil-*a* miktarı, bazı antioksidant enzimlerin aktiviteleri (süperoksit dismutaz, askorbat peroksidaz ve glutatyon redüktaz) ile H₂O₂, malondialdehit ve prolin miktarı değerlerinde görülen değişimler araştırılmıştır.

Bitki ve algler üzerinde çevresel stres faktörlerinin etkilerini anlamak amacıyla yapılan çalışmalardan birisi klorofil içeriğini belirlemektir. Bakırlı ve metalsiz fitalosiyenin türevlerinin OD560 ve klorofil-*a* miktarı ölçümlerinde düşük konsantrasyonlarda algin büyümesi ve klorofil-*a* miktarı kontrole göre artma gösterirken, yüksek konsantrasyon olan 1,5 ppb konsantrasyonunda kontrol grubuna göre azalma gözlenmiştir.

Hou ve ark. (2007) *L. minor* bitkisi ve Cuve Cd metalleri ile yapmış olduğu çalışmada (0.05 mgL⁻¹) düşük konsantrasyonunun fotosentetik pigmentlerin aktivitesini arttırdığı, (10-20 mgL⁻¹) yüksek konsantrasyonların ise pigmentlerin inhibe olmasına neden olduğu tespit edilmiştir (Hou ve ark., 2007). Bitkilerin büyüme ve gelişimi için Cu miktarının önemli bir besin olmasına rağmen, fazla miktardaki Cu fotosentez için güçlü bir inhibitör olduğu tespit edilmiştir (Frankart ve ark., 2002). Ayrıca, kadmiyumun bitki gelişimi için önemli olmayan metal iyonu olup, pigmentler aktivitesi için Cu'dan daha toksik olduğunu bildirmişlerdir (Kupper ve ark., 1996).

Bakır fitalosiyenin uygulanan *A. platensis* algi kültürlerinin toplam SOD aktivitesi 0,25 ppb ve 1,5 ppb konsantrasyonlarında kontrole göre artma gözlenmiştir. Qian ve ark. (2008) Glufosinate pestisitinin *Chlorella vulgaris* algin üzerindeki

çalışmalarında SOD aktivitesini artırdığını rapor etmişlerdir. Qian ve ark. (2009) Paraquat pestisitini *C. vulgaris* algi üzerinde denemişler ve SOD enzim aktivitesinin arttığını rapor etmişlerdir. Bu çalışmalarda uygulanan pestisit O_2^- ve diğer serbest radikallerin üretimini artırması sonucu SOD aktivitesinin arttığı düşünülmektedir.

Metalsiz fitalosiyenin türevleri uygulanan *A. platensis* kültürlerinin toplam SOD aktivitesi tüm konsantrasyonlarda kontrole göre anlamlı değişim göstermemiştir. Wang ve ark. (2012) yılında *Scenedesmus obliquus* algi üzerine Cypermethrin uygulamış ve bu pestisit yüksek konsantrasyonlarda SOD aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir. Bunun sebebini de Cr metalinin direkt olarak SOD genine etki etmesine ve bu genin yapısının bozmasına neden olmaktadır.

Bakırlı fitalosiyenin uygulamasında GR enzim aktivitesi 1 ppb ve 1,5 ppbonsantrasyonlarda anlamlı olarak azalmıştır. Mishra ve ark. (2006) *Ceratophyllum demersum*'a bitkisindeki yüksek konsantrasyonlarda Pb uygulaması sonucu GR enzimaktivitesinde azalma meydana geldini rapor etmişlerdir. Gr enzim aktivitesinde meydana gelen azalmanın glutatyon halkasına etki eden sülfidril grupları ile metallerin direkreaksiyonu sonucundaolabileceğini belirtmişlerdir. Bu sonuçlara göre çalışmamızda GRaktivitesinde meydana gelen azalmaların, hücrelerin canlılığını kaybetmesinden veya enzimin yapısınınbozulmasından söylenebilir.

Metalsiz fitalosiyenin türevlerinin uygulamasında GR enzim aktivitesi bütün konsantrasyonlarda istatikselsel olarak anlamlı değişim göstermemiştir. Sandalio ve ark. (2001) *Pisum sativum* bitkisinde kadmiyum metali ile yaptığı çalışmada GR enzim aktivitesinde anlamlı bir değişim gözlememiş olup, bu duruma neden olarak okside glutatyon miktarının diğer enzimler tarafından kullanılmış olabilmesi olarak belirtmişlerdir (Dewez, 2005). Farklı stres faktörlerinin etkisi ile Glutatyon redüktaz, okside glutatyonun (GSSG) glutatyona (GSH) indirgenmesini katalizleyerek GSH'ın hücrede yeterli seviyede kalmasını sağlayan bir enzimdir.

Bakırlı fitalosiyenin uygulamasında APOD enzim aktivitesi 0,25 ppb konsantrasyonda istatistiksel olarak anlamlı artarken, diğer konsantrasyonlarda

(0.125 ppb, 0.50 ppb , 1 ppb, 1,5ppb) değışme gözlenmemiştir. Nagalakshmi ve Prasad (1998) Cu metali ve *Scenedesmus bijugatus* algi ile yaptığı çalışmada artan bakır konsantrasyonlarında APOD aktivitesinde artış gözlemlemişlerdir. Devez ve ark. (2005) *Scenedesmus obliquus* algiüzerine yaptıkları çalışmada artan bakır konsantrasyonlarına bağı olarak APOD aktivitesinde artış olmasına rağmen belli konsantrasyonlardan sonra sabit kaldığını belirtmişlerdir. Artan APOD aktivitesinin artan reaktif oksijen türleri konsantrasyonunu belirtmektedir. (Nagalakshmi ve Prasad, 1998). Yüksek konsantrasyonundaki APOD aktivitesindeki değışim olmamasının nedeni enzimlerin yüksek dozda ağır metal uygulanması sonucu yapısının bozulmasından kaynaklanmış olabilir.

Yaptığımız çalışmada, *A. platensis* 'daki askorbatperoksidaz aktivitesinin, ortamda bulunan metalsiz fitalosiyanin konsantrasyonundaki artış ile ters orantılı olarak azaldığı gözlenmiştir. Metalsiz fitalosiyanin türevlerinin uygulamasında 0.50 ppb, 1 ppb ve 1,5 ppb konsantrasyonlarda APOD aktivitesi kontrol grubuna bağı azalmıştır. Oksidatif stresin artması sonucu APOD aktivitesinin inhibe olduğu bazı çalışmalarda rapor edilmiştir (Weckx ve Clijsters, 1996). Örneğin salisilik asitin ve 2,6 dikloroizoniconitik asitin yüksek konsantrasyonlarında APOD aktivitesini inhibe olduğu tespit edilmiştir (Durner ve Klessig, 1995). Bu çalışmalar sonucunda yüksek konsantrasyonlarda APOD enzimini inhibe ettiği söylenebilir.

Bakır grubu fitalosiyanin uygulanan *A. platensis* kültürlerinin MDA miktarı 1 ppb ve 1,5 ppb konsantrasyonlarında anlamlı azalma gözlenmiştir. MDA miktarında ve H₂O₂ miktarındaki değışimler arasında pozitif bir ilişki gözlenmektedir. Lipid peroksidasyonun sonucunda malondialdehit ürünü oluşmaktadır ve malondialdehit miktarının belirlenmesi, oksidatif zararın belirlenmesinde en basit yöntem olarak kullanılmaktadır (Zhang ve ark., 1996). MDA membrandaki doymamış yağ asitlerinin ayrışma ürünlerinden biridir. Hücrede serbest radikallerin kontrol altına alınması ile lipit peroksidasyonu engellenmiş olup ve MDA üretimi azalmıştır. Zhang ve ark. (2007) *Kandelia candel* ve *Bruguiera gymnorrhiza* bitkilerinde ağır metal stresi üzerine yaptıkları çalışmada MDA konsantrasyonundaki azalmanın, artan antioksidan enzim aktivitelerinden kaynaklandığını ve böylece membran

hasarını önlemiş olabileceği belirtmişlerdir. Benzer şekilde bizim çalışmamızda düşük konsantrasyonlarda MDA miktarının artması, hücre zarında lipid peroksidasyonunun arttığını gösterirken yüksek konsantrasyonlarda MDA miktarının azalmaya başlamasının artan antioksidan enzim aktivitesiyle kontrol altına alındığını gösterdiği düşünülmektedir.

Metalsiz fitalosiyanin türevlerinin uygulandığı *A. platensis* algı kültürlerinin MDA miktarı, artan konsantrasyon ile birlikte arttığı gözlenmiştir. Maleva ve ark. (2009) beş gün süre ile *Elodea canadensis* bitkisine farklı konsantrasyonlarda (1, 10 ve 50 μM) nikel sülfat uygulamış ve konsantrasyon artışına bağlı olarak MDA miktarının da paralel olarak artma olduğunu gözlemlemiştir. Elde edilen sonuçlara göre artan oksidatif stres ile membrandaki lipid peroksidasyon artışı gerçekleşmekte ve buna bağlı MDA miktarında artış gözlenmektedir.

Metalsiz fitalosiyanin türevlerinin uygulanan *A. platensis* algı kültürleri üzerinde H_2O_2 miktarında 0,125 ppb konsantrasyonda anlamlı artma göstermiştir. Bu durumda bu konsantrasyonda H_2O_2 miktarının ve APOD aktivitesi arasında ters orantıdan bahsedilebilir. APOD enzim aktivitesinin değişmediği konsantrasyonlarda anlamlı artışlar olmamıştır. APOD enzimi antioksidan savunma sisteminde kilit bir enzimdir ve hücrelerdeki H_2O_2 miktarını direkt olarak belirler (Asada, 1992).

Prolin amino asidi, hücrede, enzim ve membran bütünlüğünü sağlayan özelliğe sahiptir. Organizmalarda özellikle stres koşulları altında hayatta kalma ve prolin birikimi arasında güçlü bir bağ vardır. Bakır grubu fitalosiyanin uygulanan *A. platensis* kültürlerinin serbest prolin miktarı tüm konsantrasyonlarında anlamlı olarak artmıştır. Megateli ve ark. (2009) *L. gibba* bitkisi üzerinde farklı konsantrasyonlar da (0, 10^{-1} ve 10^{-4}mgL^{-1}) bakır, kadmiyum ve çinko metalleri ile değişik sürelerde (2, 4, 6, 8 ve 10 gün) yapmış oldukları çalışmada prolin miktarının uygulama süresine paralel olarak arttığını gözlemlemiştir (Megateli ve ark., 2009). Rai ve ark. (2004) *Ocimum tenuiflorum* L. bitkisi üzerine kromun etkisini araştırılmış ve artan konsantrasyon ve uygulama süresi ile birlikte prolin birikiminde artış olduğunu gözlemlemiştir (Rai ve ark., 2004). Aynı şekilde, *Vetiveria zizanioides* bitkisine

Çinko, kadmiyum, ve EDTA uygulanmış ve bu uygulamaların bitkide kontrol grubundan daha fazla prolin birikimine yol açtığı belirlenmiştir (Weihong ve ark., 2009). Tüm veriler değerlendirildiğinde, yapılan çalışma sonuçları ile bizim sonuçlarımız paralellik göstermekte ve artan fitalosiyanın konsantrasyonu ile birlikte prolin miktarında artış meydana gelmektedir.

Metalsiz fitalosiyanın türevleri uygulanan *A. platensis* kültürlerinin serbest prolin miktarı kontrol grubuna göre incelendiğinde anlamlı olarak azalış gösterdiği gözlemlenmiştir. Ewald ve Shclee (1983) *Trebouxia* algı üzerinde sülfitin etkisini araştırmış ve yaptıkları çalışmada prolin sentezini inhibe ettiği için serbest prolin miktarını azalttığını bulmuşlardır. Veriler değerlendirildiğinde, yapılan çalışma sonuçları ile bizim sonuçlarımız paralellik göstermektedir.

Sonuç olarak yaptığımız çalışmada artan fitalosiyanın türevlerinin konsantrasyonlarına bağlı olarak biyokütle ve klorofil-*a* miktarında her iki fitalosiyanın grubu için farklılıklar gözlenmiştir. Antioksidan enzim aktiviteleri ve diğer parametrelerde meydana gelen değişimler kullanılan fitalosiyanın türevinin çeşidi ve konsantrasyonlara göre farklılık göstermiştir. Bu farklılık uygulanan fitalosiyanın türevlerinin farklı oranlarda ROS üretme kabiliyetinden ileri gelmektedir. Fitalosiyanın türevlerinin endüstriyel kullanımı esnasında bu çalışmada kullanılan konsantrasyonların baz alınması, fitalosiyanın türevlerinin sucul ekosisteme vereceği zararın hafifletilmesinde bir basamak oluşturacaktır. *A. platensis*'in ekolojik ve ekonomik öneme sahip siyona bakterilerden olup, fitalosiyanın türevleriyle kontamine olmuş atık suların arıtılmasında da bu alglerin kullanılabileceği bu çalışma ile gösterilmiştir.

KAYNAKÇA

- ALavoie, J De la Noue 1985. Hyperconcentrated cultures of *scenedesmus obliquus*: a new approach for wastewater biological tertiary treatment Water Research, 19(11):1437–1442.
- Algaebase database of information on algae 2014, Eylül. <http://www.algaebase.org>.
- Banat I.M., Nigam, P., Singh, D., Marchant, R. 1996. Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents a review Bioresour Techno, 58 (3): 217-227.
- Benarjee, M., Mishra, S., Chatterje, J. 2004. Scavenging Nickel and Chromium Toxicity in *Aulosira fertilissima* by Immobilization: Effect on Nitrogen Assimilating Enzymes, Electron. J. Biotechnol., 7, 13-14.
- Blaby-Haas, C.E., and Merchant, S.S. 2012. “The ins and outs of algal metal transport”, Biochim. Biophys. Acta, vol. 1823, pp. 1531–1552.
- Creighton, T.E. , 1999. (Ed) Encyclopedia of Molecular Biology, 1-4, pp. 632-634.
- Creissen, G., Edwards, A., Mullineaux, P.M. 1994. Glutathione Reductase and Ascorbate Peroxidase. In Foyer, C.H., and Mullineaux, P.M., (Eds.), Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants, CRC Press, Boca Raton, pp. 343-364.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D., Van Breuegem, F. 2000. Dual Action of the Active Oxygen Species During Plant Stress Responses, Cell. Mol. Life. Sci., 57, 779-795.
- De Diesbach, H. et Von der Weid, E., 1927. Quelques sels complexes des o-nitriles avec le cuivre et la pyridine, *Helv. Chim. Acta*, 10(1), 886-888
- Dibyendu Kamilya, Sudipto Sarkar, Tapas K Maiti, Sukumar Bandyopadhyay, and Bimal C Mal 2006. Growth and nutrient removal rates of *spirulina platensis* and *nostoc muscorum* in fish culture effluent: a laboratory-scale study. Aquaculture Research, 37(15):1594–1597.
- Durner J., Klessig D.F. 1995. Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. Proc Natl Acad Sci U S A, 92 (24): 11312–11316.

- E. Corbin McGriff and Ross E McKinney 1972.. The removal of nutrients and organics by activated algae. *Water Research*, 6(10):1155–1164.
- E. Wolfgang Becker 1994. *Microalgae: biotechnology and microbiology*, volume 10. Cambridge University Press.
- E. Yabaş, M. Sülü, F. Dumludağ, A. R. Özkaya, B. Salih, Ö. Bekaroğlu. (2012). Electrical and electrochemical properties of double-decker Lu(III) and Eu(III) phthalocyanines with four imidazoles and N-alkylated imidazoles, *Polyhedron.*, 42, 196-206.
- EB Sydney, TE Da Silva, A Tokarski, AC Novak, JC De Carvalho, AL Woiciecohwski, C Larroche, and CR Soccol 2011. Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. *Applied Energy*, 88(10):3291–3294.
- Frankart, C., Eullaffroy, P., Vernet, G. 2002. Photosynthetic Responses of *Lemna minor* Exposed to Xenobiotics, Copper and Their Combinations, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 53, 439-445.
- Giorgos Markou and Dimitris Georgakakis 2011. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: a review. *Applied Energy*, 88(10):3389–3401.
- Giuseppe Torzillo and Avigad Vonshak 1994. Effect of light and temperature on the photosynthetic activity of the cyanobacterium *spirulina platensis*. *Biomass and Bioenergy*, 6(5):399–403.
- Halliwell ve Gutteridge, 1984. Formation of thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts: the role of superoxide and hydroxyl radicals. 15;128(2):347–352.
- Hayrullah Karabulut, Mehmet Şükrü Gülay, 2016. Antioksidanlar Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji AD, 15030, BURDUR
- He, M., Yan, Y., Pei, F., Wu, M., Gebreluel, T., Zou, S., and Wang, C 2017. “Improvement on lipid production by *Scenedesmus obliquus* triggered by low dose exposure to nanoparticles”, *Scientific REPORTS*, vol. 7, pp. 1-12.
- Hensley, K., Robinson, K.A., Gabbita, P.S., Salsman, S., Floyd, R.A 2000. Reactive Oxygen Species, CellSignaling and Injury, *Free Radical Bio. Med.*, 28, 1456-1462.
- 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 Physiol. Biochem.*, 45, 62-69.
- I Rawat, R Ranjith Kumar, T Mutanda, and F Bux. 2011. Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, 88(10):3411–3424.

- JC Dillon, AP Phuc, and JP Dubacq 1995. Nutritional value of the alga spirulina.
- Jorge Alberto Vieira Costa, Karla Leal Cozza, Lucielen Oliveira, and Glenio Magagnin 2001. Different nitrogen sources and growth responses of spirulina platensis in microenvironments. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 17(5):439–442.
- K Matusiak 1975. Studies on the purification of wastewater from the nitrogen fertilizer industry by intensive algal cultures. i. growth of chlorella vulgaris in wastes. Acta Microbiologica Polonica, 25(3):233–242.
- Kanoun-Boulé, M., Vicente, J.A.F., Nabais, C., Prasad, M.N.V., Freitas, H. 2009. Ecophysiological Tolerance of Duckweeds Exposed to Copper, Aquatic Toxicol., 91, 1–9.
- Kennedy, B. J., Murray, K. S., Zwack, P. R., Homborg, H. ve Kalz, W. 1986. Spin States in Iron (III) Phthalocyanines Studied by Mössbauer, Magnetic Susceptibility and ESR Measurements, Inorg. Chem., 25, 2539-2545.
- Kotaro Kawaguchi 1980. Microalgae production systems in asia. Algae biomass: production and use sponsored by the National Council for Research and Development, Israel and the Gesellschaft fur Strahlen-und Umweltforschung (GSF), Munich, Germany; editors, Gedaliah Shelef, Carl J. Soeder. 25(3):233–242.
- Kupper, H., Kupper, F., Spiller, M. 1996. Environmental Relevance of Heavy Metal-Substituted Chlorophylls Using the Example of Water Plants, J. Exp. Bot., 47, 259-266.
- Lever A.B.P. 1965. Phthalocyanines: Properties and Applications, Vol. 4, New York.
- Leznoff, C. C., Lever, A. B. P. 1989. Phthalocyanines: Properties and Applications, Vol.1, New York.
- Leznoff, C. C., Lever, A. B. P. 1989. Phthalocyanines: Properties and Applications, Vol.7, New York.
- Magdalena Przytocka-Jusiak, Marek Duszota, Kazimierz Matusiak, and Roman Mycielski 1984. Intensive culture of chlorella vulgaris/aa as the second stage of biological purification of nitrogen industry wastewaters. Water Research, 18(1):1–7.
- Martin, J.F. 1978. Le Lagunage En Traitement Tertiaire, Experimentation A Partir De Plantes Aquatiques Superieures, La Technique De L'eau Et De L'assainissement, No: 376-Avril, 23-24.
- McKeown, N.B. 1998. Phthalocyanine Materials; Synthesis, Structure and Function. Cambridge University Press.

- McMullan G., Meehan, C., Conneley, A., Kirby, N., Robinson, T., Nigam, P., Banat, I.M., Marchant, R., Smyth, W.F. 2001. Microbial Decolorisation and degradation of textile dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 56 (1-2): 81-87.
- Megateli, S., Semsari, S., Couderchet, M. 2009. Toxicity and Removal of Heavy Metals (Cadmium, Copper And Zinc) by *Lemna gibba*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 72, 1774–1780.
- Michael A Borowitzka 1998. Limits to growth. In *Wastewater treatment with algae*, pages 203–226.
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Kumar, R., Seth, C.S., Gupta, D.K. 2006. Lead Detoxification by Coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) Involves Induction of Phytochelatins and Antioxidant System in Response to its Accumulation, *Chem.*, 65, 1027-1039.
- Misra, N., Ajay, G. 2006. Effect of Salinity and Different Nitrogen Sources on the Activity of Antioxidant Enzymes and Indole Alkaloid Content in *Catarantus roseus* Seedlings, *J., Plant Physiol.*, 164, 11-18.
- Nicola Powell, Andrew N Shilton, Steven Pratt, and Yusuf Chisti 2008. Factors influencing luxury uptake of phosphorus by microalgae in waste stabilization ponds. *Environmental Science & Technology*, 42(16):5958–5962.
- Orio Ciferri 1983. Spirulina, the edible microorganism. *Microbiological Reviews*, 47(4):551.
- Oxisresearch™A Division of OXIS Health Products 2018. Inc. Spectrophotometric Assay for Glutathione Reductase for Research, <http://www.Oxfordbiomed.Com>, Catalog Number Data Sheet.
- Ö. Bekaroğlu. (2010). Ball Type Phthalocyanines : Synthesis and Properties, in J. Jiang (Ed), *Structure and Bonding, Functional Phthalocyanine 100 Molecular Materials*, Vol. 135, pp. 105-136.
- P Perego, A Converti, and M Del Borghi 2003. Effects of temperature, inoculum size and starch hydrolyzate concentration on butanediol production by *bacillus licheniformis*. *Bioresource Technology*, 89(2):125–131.
- Pearce C.I., Lyod, J.R., Guthrie, J.T. 2003. The removal of colour from textile wastewater using wholebacterial cells: a review. *Dyes Pigments*, 58 (3): 179-196.
- Perl-Treves, R. 2002. Perl, A., Molecular Oxygen and its Reactive Derivates. (D. Inze and M. Van Montagu Eds.) *Oxidative Stress in Plants*, Taylor & Francis Inc., London, pp. 1-31.

- Rai, V., Vajpayee, P., Singh, S.N., Mehrotra, S. 2004. Effect of Chromium Accumulation on Photosynthetic Pigments, Oxidative Stress Defense System, Nitrate Reduction, Proline Level and Eugenol Content of *Ocimum tenuiflorum* L., Plant Sci., 167, 1159–1169.
- Rama Devi, S., Prasad, M.N.V. 1998. Copper Toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), A Free Floating Macrophyte: Response of Antioxidant Enzymes and Antioxidants, Plant Sci., 138, 157–165.
- Robertson, J. M., J. 1935. Chem. Soc., 615.
- Rutwik Ravindra Mandakini Thengodkar and S Sivakami 2010. Degradation of chlorpyrifos by an alkaline phosphatase from the cyanobacterium spirulina platensis. Biodegradation, 21(4):637–644.
- Scandalios J. G. 1993. Oxygen Stress and Superoxide Dismutases, Plant Physiol., 101, 7-12.
- Schaefer, Roger 1991; "Çevre Yönetimi ve Teknoloji", Çevre Üzerine, TÇSV Yayın, s. i 13, Ankara.
- Sharp J. H., Lardon M., J. 1968. Phys. Chem., 72, 3230.
- Sharp, K.H., Raven, E. 2003. Enzyme-Substrat Interactions in Ascorbate Peroxidase, University of Leicester, Cambridge, UK, NPR, 10, pp. 303.
- Shraddha, S., Eapen, S., D'Souza, S.F. 2006. Cadmium Accumulation and Its Influence on Lipid Peroxidation and Antioxidative System in an Aquatic Plant, *Bacopa monnieri* L., Chem., 62, 233-246.
- Sreenivasulu, N., Ramanjulu, S., Ramachandra-Kini, K., Prakash, H.S., Shekar-Shetty, H., Savithri, H.S., Sudhakar, C. 1999. Total Peroxidase Activity and Peroxidase Isoforms as Modified by Salt Stress in Two Cultivars of Fox-Tail Millet with Differential Salt Tolerance, Plant Sci., 141, 1-9.
- Stanley E Manahan 2000. Environmental Chemistry, volume 7. CRC press.
- T. Ceyhan, A. Altındal, A. R. Özkaya, Ö. Çelikbıçak, M. K. Erbil, B. Salih, Ö. Bekaroğlu. (2007). Synthesis, characterization and electrochemical properties of novel metal free and zinc(II) phthalocyanines of ball and clamshell types, *Polyhedron*, 26, 4239-4249.
- Temizkan, G., Arda, N. 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Nobel Yayınları, 2. Baskı, 69- 106.
- Thomas G Reeves 1972. Nitrogen removal: a literature review. Journal (Water Pollution Control Federation), pages 1895–1908.
- Thomas, A.L. 1990. Phthalocyanine research and applications. CRC Press, Florida.

- Türkan, İ., Bor, M., Özdemir, F., Koca, H. 2004. Differential Responses of Lipid Peroxidation and Antioxidants in the Leaves of Drought-Tolerant *P. acutifolius* Gray and Drought-Sensitive *P. vulgaris* L. Subjected to Polyethylene Glycol Mediated Water Stress, *Plant Sci.*, 168, 223-231.
- Türkan, İ. 2004. Comparative Lipid Peroxidation, Antioxidant Defence System and Proline Content in Roots of Two Rice Cultivars Differing in Salt Tolerance., *Environ. Exp. Bot.*, 53, 247-257.
- Van Camp, W., Van Montagu, M., Inze, D. 1994. Superoxide Dismutases. In: Foyer, C.H., Mullineaux, P.M. (Eds.), *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*, CRC Press, BocaRaton, pp. 317-341.
- Vandevivere, P.C., Bianchi, R., Verstraete, W. 1998. Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: review of emerging Technologies. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 72 (4). 289-302.
- Weckx J.E.J, Clijsters M. M. 1996. Oxidative damage and defense mechanisms in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* as a result of root assimilation of toxic amounts of copper. *Physiol. plantarum.* 96 (3): 506–512.
- Weihong, X.U., Wenyi, L.I., Jianping, H.E, Singh, B., Zhiting, X. 2009. Effects of Insoluble Zn, Cd, EDTA on the Growth, Activities of Antioxidant Enzymes and Uptake of Zn and Cd in *Vetiveria zizanioides*, *J. Environ. Sci.*, 21, 186–192.
- Yaman, H. (2007). Suda Çözünür Yeni Fitalosiyenin Bileşiklerinin Sentez ve Karakterizasyonu, *Yüksek Lisans Tezi, G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze, Kocaeli.*
- Zhang, J., Kirkham, M.B. 1996. Lipid Peroxidation in Sorghum and Sunflower Seedlings as Affected by Ascorbic Acid, Benzoic Acid, and Propyl Gallate, *J. Plant Physiol.*, 149, 489-493.

ÖZGEÇMİŞ

Sena ÇAĞATAY ÖZPINAR, 21.09.1989'da Kocaeli'de doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Sakarya'da tamamladı. Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü 2012 yılında bitirdi. 2012 yılında Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü'nde Yüksek Lisans eğitime başladı. 2013 yılında Sakarya Finansbank şubesinde portföy olarak çalışmaya başladı. Halen aynı kurumda Bankacı olarak çalışmaya devam etmektedir.