

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SÜLFONAT GRUPLARI İLE SUBSTİTUE EDİLMİŞ SUDA ÇÖZÜNÜR  
FİTALOSİYANİNLERİN *CHLORELLA VULGARIS* GELİŞİMİ VE  
ANTİOKSİDAN PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşe Gül TEKBABA

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ  
Tez Danışmanı : Doç. Dr. Tuğba ONGUN SEVİNDİK

Haziran 2019

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SÜLFONAT GRUPLARI İLE SUBSTİTUE EDİLMİŞ SUDA ÇÖZÜNÜR  
FİTALOSİYANİNLERİN *CHLORELLA VULGARIS* GELİŞİMİ VE  
ANTİOKSİDAN PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşe Gül TEKBABA

Enstitü Anabilim Dalı

:

BİYOLOJİ

Bu tez 20/06/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği 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.

Ayşe Gül TEKBABA  
19.06.2019

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her konuda bilgi ve desteğini almaktan çekinmediğim değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. Tuğba ONGUN SEVİNDİK'e, çalışmanın tüm aşamalarında yardımlarını esirgemeyen, bütün bilgi birikimini bana aktarmaya çalışan ve beni her zaman teşvik eden değerli hocam sayın Arş. Gör. Dr. Hatice TUNCA'ya, her zaman çalışmalarla ilgili konuları danışmaktan çekinmediğim değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Ali DOĞRU'ya ve diğer bölüm hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında manevi desteklerinden güç aldığım arkadaşlarım Ebru TORLAK, Arş. Gör. Muhammed HAS, Fatma Zehra KARAKİPRİK ve Talha AKKUŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her konuda desteklerini sağlayan Tenis Eskrim Dağcılık Spor Kulübü Eğitim ve Geliştirme Vakfı Başkanı Sayın Prof. Dr. Mehmet Emin TINAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen babaannem Naide TEKBABA, babam Altan TEKBABA, annem Şerife TEKBABA, kardeşlerim Hakan ve Yusuf Emre TEKBABA'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bu çalışmanın maddi açıdan desteklenmesine olanak sağlayan Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığına (Proje No: 2018-2-7-172) teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	viii
TABLolar LİSTESİ .....	x
ÖZET.....	xi
SUMMARY .....	xii

## BÖLÜM 1.

GİRİŞ .....	1
-------------	---

## BÖLÜM 2.

LİTERATÜR ÖZETİ .....	3
2.1. Fitalosiyeninler (Pc) .....	3
2.1.1. Fitalosiyeninlerin tarihi .....	4
2.1.2. Fitalosiyeninlerin sentezi.....	4
2.1.3. Fitalosiyeninlerin kullanım alanları .....	6
2.1.3.1. Tekstil ve boyar madde .....	6
2.1.3.2. Elektrofotografi.....	7
2.1.3.3. Nonlineer optik cihazlar.....	7
2.1.3.4. Optik veri depolama .....	7
2.1.3.5. Fotodinamik terapi.....	8
2.1.3.6. Sıvı kristal.....	9
2.1.3.7. Kimyasal sensör yapımı.....	9
2.1.3.8. İnfrared absorplayıcı .....	9
2.1.3.9. Katalizör .....	10

2.2. Fitalosiyeninlerin Sucul Ekosisteme Giriş ve Etkisi .....	10
2.3. Çalışmada Kullanılan Fitalosiyenler .....	11
2.3.1. Tetrakis-(sodyum mercaptoethansülfonat)-metalsiz fitalosiyenin .....	11
2.3.2. Tetrakis-(sodyum merkaptoethansülfonat) bakır (II) fitalosiyenin .....	12
2.4. <i>Chlorella Vulgaris</i> .....	12
2.5. Serbest Radikaller .....	13
2.5.1. Tekli uyarılmış oksijen ( $^1O_2$ ).....	14
2.5.2. Süperoksit radikali ( $O_2^{\bullet-}$ ) .....	15
2.5.3. Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ).....	16
2.5.4. Hidroksil radikali ( $OH^{\bullet-}$ ).....	16
2.6. Antioksidan Sistem.....	17
2.6.1. Endojen antioksidanlar .....	18
2.6.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD) .....	18
2.6.1.2. Katalaz (KAT).....	19
2.6.1.3. Askorbat peroksidaz (APOD).....	20
2.6.1.4. Glutasyon redüktaz (GR) .....	20
2.6.1.5. Guaiakol peroksidaz (GPOD).....	21
2.6.1.6. Glutasyon .....	22
2.6.1.7. Prolin.....	22
2.6.2. Eksojen antioksidanlar .....	23
2.6.2.1. Tokoferoller .....	23
2.6.2.2. Karotenoidler .....	24
2.6.2.3. Askorbik asit (C vitamini) .....	24
2.6.2.4. Fenolik bileşikler .....	25
2.7. Çalışmanın Amacı .....	25

### BÖLÜM 3.

MATERYAL VE METOD .....	26
3.1. Çalışma Materyali .....	26
3.2. Kullanılan Cihazlar .....	26

3.3. Yöntem .....	27
3.3.1. Hücre kültürünün hazırlanması .....	27
3.3.2. Uygulanan fitalosiyanın konsantrasyonları .....	28
3.3.3. Deney ortamı ve düzeneği .....	29
3.4. Ölçüm ve Analizler.....	29
3.4.1. Optik yoğunluğun (OD) ve büyüme oranının belirlenmesi .....	29
3.4.2. Fotosentetik pigment analizi (Klorofil- <i>a</i> ) .....	29
3.4.3. Toplam çözüner protein analizi.....	30
3.4.4. Süperoksit dismutaz aktivitesi (SOD).....	30
3.4.5. Askorbat peroksidaz aktivitesi (APOD).....	31
3.4.6. Glutasyon redüktaz aktivitesi (GR) .....	31
3.4.7. Malondialdehit (MDA) miktarı .....	32
3.4.8. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarı.....	32
3.4.9. Prolin miktarı.....	32
3.4.10. İstatistiksel analizler .....	33
BÖLÜM 4.	
BULGULAR.....	34
4.1. Optik Yoğunluk (OD).....	34
4.2. Fotosentetik Pigment Analizi (Klorofil- <i>a</i> ) .....	36
4.3. Toplam Süperoksit Dismutaz Aktivitesi.....	38
4.4. Toplam Askorbat Peroksidaz Aktivitesi .....	40
4.5. Toplam Glutasyon Redüktaz Aktivitesi .....	42
4.6. Malondialdehit (MDA) miktarı .....	44
4.7. Hidrojen Peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) Miktarı .....	46
4.8. Serbest Prolin Miktarı .....	48
BÖLÜM 5.	
TARTIŞMA VE SONUÇ .....	51
KAYNAKÇA .....	58
ÖZGEÇMİŞ .....	70

## SİMGELER VE KISALTMALAR

$^1\text{O}_2$	: Tekli uyarılmış oksijen
%	: Yüzdellik ifadesi
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
$\mu\text{g}$	: Mikrogram
$\mu\text{L}$	: Mikrolitre
$\mu\text{mol}$	: Mikromol
$\mu\text{s}$	: Mikrosaniye
Al	: Alüminyum
AÖF	: Anlamlı Önemli Fark
APOD	: Askorbat peroksidaz
AsA	: Askorbat
BG11	: Blue-Green Medium
cm	: Santimetre
Co	: Kobalt
$\text{CO}_2$	: Karbondioksit
CoPc	: Kobalt fitalosiyenin
Cr	: Krom
Cu	: Bakır
DBN	: Diazabisiklononen
DBU	: Diazabisikloundeken
Dk	: Dakika
EC50	: İlacın maksimum terapötik gücünün yarısını ortaya çıkarabilen doz
EDTA	: Etilendiamintetraasetikasit
Fe	: Demir
FePc	: Demir fitalosiyenin



g	: Gram
GSH	: Glutatyonsülfid
GSSG	: Glutatyondisülfid
H <sub>2</sub> Pc	: Metalsiz fitalosiyanin
KAT	: Katalaz
L	: Litre
Li <sub>2</sub> Pc	: Lityum fitalosiyanin
LP	: Lipid peroksidasyonunu
LSD	: En Az Önemli Fark
M	: Molar
MDA	: Malondialdehit
MDHA	: Monodehidroaskorbat
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
Mn	: Manganez
MPc	: Metalli fitalosiyanin
MPc <sub>2</sub>	: Sandviç fitalosiyanin
ms	: Milisaniye
Na	: Sodyum
NADP	: Nikotinamidadeninükleotitfosfat (indirgenmiş)
NADPH	: Nikotinamidadeninükleotitfosfat (yükseltgenmiş)
NBT	: Nitrobluetetrazolyum
Ni	: Nikel
nm	: Nanometro
NO <sub>x</sub>	: Azot oksit
O <sub>2</sub>	: Moleküler oksijen
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	: Süperoksit radikali
OD	: Optik yoğunluk
OH <sup>•-</sup>	: Hidroksil radikali
Pc	: Fitalosiyanin
pH	: H <sup>+</sup> iyonu konsantrasyonunun kologaritması

Ppb	: Toplam madde miktarının milyarda birlik kısmı
PVP	: Polivinil pirolidon
ROT	: Reaktif oksijen türü
Rpm	: Dakikadaki devir sayısı
sn	: saniye
SOD	: Süperoksit dismutaz
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
TBA	: Tiyobarbitürikasit
TCA	: Trikloroasetikasit
Tris	: Tris (Hidroksimetil) aminometan
V	: Hacim
w	: Ağırlık
WORM	: Write Once Read Many
Zn	: Çinko

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Fitalosiyanın.....	3
Şekil 2.2. Fitalosiyanın ilk sentez yöntemi .....	5
Şekil 2.3. <i>Chlorella vulgaris</i> .....	13
Şekil 4.1. <i>C. vulgaris</i> 'in metalsiz fitalosiyanın konsantrasyonlarına bağlı OD 750 absorbansındaki 7 günlük değişim .....	35
Şekil 4.2. <i>C. vulgaris</i> 'in bakırlı fitalosiyanın konsantrasyonlarına bağlı OD 750 absorbansındaki 7 günlük değişimi .....	36
Şekil 4.3. <i>C. vulgaris</i> 'in metalsiz fitalosiyanın konsantrasyonlarına bağlı klorofil- <i>a</i> miktarındaki 7 günlük değişimi.....	37
Şekil 4.4. <i>C. vulgaris</i> 'in bakırlı fitalosiyanın konsantrasyonlarına bağlı klorofil- <i>a</i> miktarındaki 7 günlük değişimi.....	38
Şekil 4.5. <i>C. vulgaris</i> algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki metalsiz fitalosiyanın türevine bağlı olarak toplam SOD aktivitesinde görülen değişim .....	39
Şekil 4.6. <i>C. vulgaris</i> algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı fitalosiyanın türevine bağlı olarak toplam SOD aktivitesinde görülen değişim .....	40
Şekil 4.7. <i>C. vulgaris</i> algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki metalsiz fitalosiyanın türevine bağlı olarak toplam APOD aktivitesinde görülen değişim .....	41
Şekil 4.8. <i>C. vulgaris</i> algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı fitalosiyanın türevine bağlı olarak toplam APOD aktivitesinde görülen değişim .....	42
Şekil 4.9. <i>C. vulgaris</i> algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki metalsiz fitalosiyanın türevine bağlı olarak toplam GR aktivitesinde görülen değişim .....	43

Şekil 4.10. <i>C. vulgaris</i> algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı fitalosiyanın türevine bağlı olarak toplam GR aktivitesinde görülen değişim .....	44
Şekil 4.11. <i>C. vulgaris</i> algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki metalsiz fitalosiyanın türevine bağlı olarak MDA miktarında görülen değişim .....	45
Şekil 4.12. <i>C. vulgaris</i> algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı fitalosiyanın türevine bağlı olarak MDA miktarında görülen değişim .....	46
Şekil 4.13. <i>C. vulgaris</i> algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki metalsiz fitalosiyanın türevine bağlı olarak H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarında görülen değişim .....	47
Şekil 4.14. <i>C. vulgaris</i> algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı fitalosiyanın türevine bağlı olarak H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarında görülen değişim .....	48
Şekil 4.15. <i>C. vulgaris</i> algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki metalsiz fitalosiyanın türevine bağlı olarak serbest prolin miktarında görülen değişim .....	49
Şekil 4.16. <i>C. vulgaris</i> algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı fitalosiyanın türevine bağlı olarak serbest prolin miktarında görülen değişim .....	50

## TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. Fitalosiyeninlerin genel sentez yöntemleri .....	5
Tablo 2.2. Bazı antioksidan enzim ve moleküllerin temel görevleri.....	18
Tablo 2.3. Antioksidanların sınıflandırılması.....	18
Tablo 3.1. Kullanılan cihazlar .....	26
Tablo 3.2. BG11 ortamı içeriği.....	27
Tablo 3.3. BG11 konsantre stok solüsyonu içeriği.....	27
Tablo 3.4. A5 stok solüsyonu içeriği.....	27
Tablo 3.5. <i>Chlorella vulgaris</i> 'e uygulanan fitalosiyenin konsantrasyonları .....	28

## ÖZET

Anahtar kelimeler: *Chlorella vulgaris*, antioksidan, SOD, GR, APOD, MDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, prolin

Fitalosiyeninler (Pc) sentetik olarak elde edilen en önemli boyar madde gruplarından olması nedeni ile endüstriyel alanda çok geniş kullanım alanlarında sahiptir. Endüstriyel boyalar, kalem ve yazıcı mürekkepleri, optik veri depolama ve fotodinamik kanser tedavileri uygulama alanlarından sadece birkaçıdır. Pc'ler çok çeşitli sentez yöntemleri ile elde edilebilmektedirler. Bu yöntemlerden biri olan yüksek sıcaklıktaki sentez yönteminde oluşan polar gruplarından dolayı suda çözünabilir özellik kazanmaktadır. Ayrıca bileşik oluşturduğu metale göre de farklı özelliklere sahip olmaktadır. Bu suda çözünme özelliklerinden dolayı fitalosiyeninlerin de, ağır metaller, herbisitler, pestisitler ve nanoplastikler gibi sucul ekosistemi tehdit etmesi ve fotosentez üretim kapasitesinde önemli yere sahip olan yeşil alglerde stres koşulları oluşturması mümkün görülmektedir. Bu çalışmada, iki farklı fitalosiyenin türevinin *Chlorella vulgaris* alginin klorofil-*a* ve OD 750 değerlerinde ve antioksidan parametrelerinde (toplam SOD, APOD, GR, prolin, MDA ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) oluşturduğu değişimler incelenmiştir.

Çalışmada, *C. vulgaris* alginin OD 750 ve klorofil-*a* değerlerinde her iki fitalosiyenin türevinin de artan konsantrasyonlarla birlikte azalmaya sebep olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte bakırlı fitalosiyenin düşük konsantrasyonlarda (0.5 ve 1 ppb) algin gelişimini teşvik ettiği gözlenmiştir. SOD enzim aktivitesinde, bakırlı fitalosiyenin uygulanan (6 ppb) gruba göre metalsiz fitalosiyenin uygulanan (2 ppb) grubun daha yüksek konsantrasyonda artış gösterdiği tespit edilmiştir. GR enzim aktivitelerinde bakırlı fitalosiyenin uygulanan grupta 6 ppb konsantrasyonda artış ölçülürken; metalsiz fitalosiyenin uygulanan grupta 1, 2 ve 4 ppb konsantrasyonlarda artış ölçülmüştür. Bununla birlikte metalsiz fitalosiyenin grubunda APOD enzim aktivitesinde bütün konsantrasyonlarda azalma olduğu belirlenirken; bakırlı fitalosiyenin uygulanan grupta APOD enzim aktivitesinde bütün konsantrasyonlarda artma olduğu gözlenmiştir. Prolin miktarında, bakırlı fitalosiyenin uygulanan grubun düşük konsantrasyonunda (0.5 ppb) artış görülürken; metalsiz fitalosiyenin uygulanan gruptaki prolin miktarı (0.5, 1 ve 4 ppb) düzensiz azalma göstermiştir. MDA ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarlarına baktığımızda bakırlı fitalosiyenin uygulanan grubun düşük konsantrasyonunda (0.5 ppb) bu değerlerin arttığı gözlemlenirken; metalsiz fitalosiyenin uygulanan grubun tüm konsantrasyonlarında azalma tespit edilmiştir. Sonuç olarak metalsiz fitalosiyenin, bakırlı fitalosiyenine göre hücrede daha yüksek oranda oksidatif stres oluşturduğu gözlemlenmiş olup; toksik etkisinin fazla olduğu görülmüştür.

# THE EFFECT OF WATER-SOLUBLE PHTHALOCYANINES SUBSTITUED WITH SULFONATE GROUPS ON *CHLORELLA VULGARIS* GROWTH AND ANTIOXIDANT PARAMETERS

## SUMMARY

Keywords: *Chlorella vulgaris*, antioxidant, SOD, GR, APX, MDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, proline

Phthalocyanines (Pc) which were synthesized synthetically, are one of the most important dyestuff groups as a result of having a wide range of industrial applications. Industrial dyes, pen and printer inks, optical data storage and photodynamic cancer treatments are just a few of their applications. PCs can be obtained by a variety of synthesis methods. They formed water-soluble properties as a result of their polar groups in high-temperature synthesis method. Furthermore, they have different properties with different metal compounds. Due to these water solubility properties, it is possible that phthalocyanines threaten aquatic ecosystem such as heavy metals, herbicides, pesticides and nanoplastics and create stress conditions in green algae which have an important place in photosynthetic production capacity. In this study, the effects of two different phthalocyanine derivatives on chlorophyll-*a* and OD 750 values and antioxidant parameters (total SOD, APX, GR, Proline, MDA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) were investigated on *Chlorella vulgaris* algae.

In the study, it was observed that *C. vulgaris* algae caused a decrease in OD 750 values with increasing concentrations of both phthalocyanine derivatives. However, it was observed that copper phthalocyanine promotes algae growth at low concentrations (0.5 and 1 ppb). It was found that SOD enzyme activity was increased at a higher concentration in the metal-free phthalocyanine-treated (2 ppb) group than copper-phthalocyanine-treated (6 ppb) group. In the GR enzyme activities, an increase of 6 ppb concentration was measured in the group treated with copper phthalocyanine; An increase in concentrations of 1, 2 and 4 ppb were measured in the metal-free phthalocyanine-treated group. On the other hand, it was determined that all concentrations decreased the activity of APX enzyme in the metal-free phthalocyanine group; In the group treated with copper phthalocyanine, APX enzyme activity increased at all concentrations. The amount of proline was increased in low concentration (0.5 ppb) of the group treated with copper phthalocyanine. The amount of proline (0.5 and 4 ppb) in the metal-free phthalocyanine treated group showed an irregular decrease. The amount of MDA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, increased in low concentration (0.5 ppb); in copper phthalocyanine group, while decreased at all concentrations in metal-free phthalocyanine group. As a result, it was observed that metal-free phthalocyanine produced higher oxidative stress than copper phthalocyanine in the cell.

## BÖLÜM 1. GİRİŞ

Çevre; “belirli bir yaşam mekânında etkili olan fiziksel, kimyasal ve biyotik faktörlerin bütünlüğü” veya daha geniş olarak “bir canlının veya canlılar topluluğunun yaşamını sağlayan ve onu sürekli olarak etkisi altında bulunduran süreçler, enerjiler ve maddesel varlıkların bütünlüğü” olarak tanımlanmaktadır (Kocataş, 1994). Birbiriyle bu kadar etkileşim halinde olan bir hayat döngüsünde insanoğlunun plansız davranışları çevreyi olumsuz yönde etkilemektedir.

Hızlı nüfus artışına bağlı olarak artan tüketim talepleri fitolasiyaninlerin kullanım alanlarının gelişmesine katkı sağlamıştır. Maalesef fitolasiyaninlerin çevresel etkileri konusunda geçmişten gelen çok geniş bir literatür bulunmamaktadır. İnsanoğlunun artan kullanım talepleri ve çalışmaları sonucunda son yıllarda fitolasiyaninlerin çevreye etkileri üzerinde araştırmalar yoğunlaşmıştır.

Fitalosiyenin diatomik oksijen varlığında uygun dalga boylu ışık ile etkileşime girmesi, bu bileşiklerin fotodinamik bir ajan olarak davranmasına ve bunun sonucunda singlet oksijen ve diğer serbest oksijen radikallerinin oluşmasına neden olmaktadır. Bu durum çeşitli canlılarda sitotoksik etki oluşturmaktadır (Jancula ve ark., 2008; Jancula ve Marsalek, 2011). Fitalosiyenin bakterisidal ve fungisidal etkileri pek çok çalışmanın konusu olmuştur (Merchat ve ark., 1996; Minnock ve ark., 1996; Bertoloni ve ark., 1992). Drabkova ve ark. (2007), altı ayrı alg üzerinde 12 farklı fitalosiyenin türevinin algisitik ve siyanositik özellikte olduğunu ortaya çıkarmış ve bu fitalosiyenin *Scenedesmus quadricauda* üzerinde önemli ölçüde toksik olduğunu rapor etmişlerdir. Jancula ve ark. (2008), 31 farklı fitalosiyenin bileşimini test etmişler ve heterosiklik halka içeren katyonik fitalosiyenin fitoplankton türleri için en güçlü toksik etkiye sahip olduğunu ve bazı katyonik fitalosiyenin düşük konsantrasyonlarda bile fitoplankton türleri için zararlı olduğunu bulmuşlardır (e.g. <1



mg L<sup>-1</sup>). Kabuklularda ise bu toksisite daha yüksek dozlarda ortaya çıkmaktadır (3.6-50 mg L<sup>-1</sup>) (Jancula ve ark., 2008). Bunun sonucu olarak fitalosiyanın türevlerinin algler üzerindeki seçici etkisinden dolayı potansiyel algisit olduğu düşünülmektedir. Ağır metaller, pestisitler, herbisitler gibi fitolasiyaninlerin de özellikle sulak alanlara kontaminasyonunun geri dönüşülemez sonuçlar doğurmasından önce önlem almak için bu çalışmalara daha da önem verilmesi gerekmektedir.

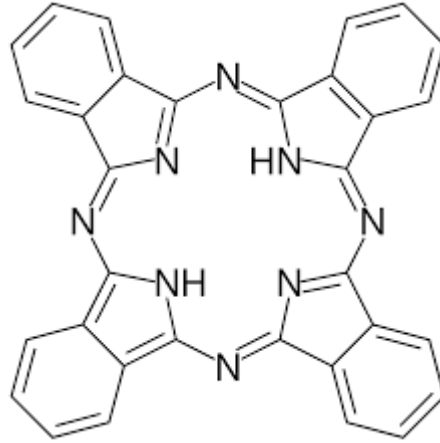
Sucul ekosistemin birincil üreticileri olan algler, ekosistemde oluşan değişimlerden direkt olarak etkilenmektedir. Algler ortamdaki olumlu ya da olumsuz şartlarda hızlı bir cevap mekanizması oluşturmaktadır. Sonuç olarak canlının fotosentez kapasitesinde, biyokütle miktarında ve üreme kapasitesinde kayıplar olduğundan sucul ekosistem komunitesinde tür dağılımı etkilenmektedir. Besin zinciri yolu ile de yüksek yapılı organizmalara kadar etkiler görülebilmektedir (Pierzynski ve Schwab, 1992). Bu sebeple algler, zararlı kimyasalların etkilerinin araştırılmasında kullanılan önemli bir canlı grubudur. Bu çalışmada ticari kullanımı giderek artmakta olan fitalosiyanın aquatik sistemdeki çevresel etkilerini değerlendirmek üzere model organizma olarak seçilen *Chlorella vulgaris* alginin gelişimi ve antioksidan parametreleri üzerinde [süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APOD), glutasyon redüktaz (GR), malondialdehit (MDA), hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve prolin] bakırlı ve metalsiz olmak üzere iki farklı fitalosiyanın türevinin etkisi incelenmiştir.

## BÖLÜM 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1. Fitalosiyanimler (Pc)

Fitalosiyanim kelimesi Yunanca nafta (kaya yağı) ve siyanin (koyu mavi) kelimelerinden türetilmiştir. Fitalosiyanimler (Pc), çok sağlam yapılı, renkli ve makrosiklik bileşiklerdir.

Geçmişten günümüze kadar 70'den fazla element fitalosiyanim sentezinde kullanılmıştır. Yüksek konjugasyonlu 18- $\pi$  elektrona sahip 8 karbon ve 8 azot üyelerinden oluşmaktadır (Şekil 2.1.) (Akkuş, 2011).



Şekil 2.1. Fitalosiyanim

Metalli fitalosiyanimlerde (MPc) merkezdeki hidrojenlerin yerine metal atomu geçer. Ortadaki metal, porfirin halkasının iki azotu ile kovalent bağlıdır, aynı halkanın diğer iki azotu ile de koordine kovalent bağlıdır. Merkezde iki hidrojen atomu olduğu zaman metallsiz fitalosiyanim ( $H_2Pc$ ) olarak adlandırılmaktadır.

Metalli ve metallsiz fitalosiyeninlerin sentezi ve özelliklerinin incelenmesiyle ilgili çok sayıda makale yayınlanmıştır. Araştırmacıların yoğun bir şekilde fitalosiyeninler üzerinde çalışmaları geniş bir uygulama alanı oluşturmaktadır (Kantar, 2004).

### **2.1.1. Fitalosiyeninlerin tarihi**

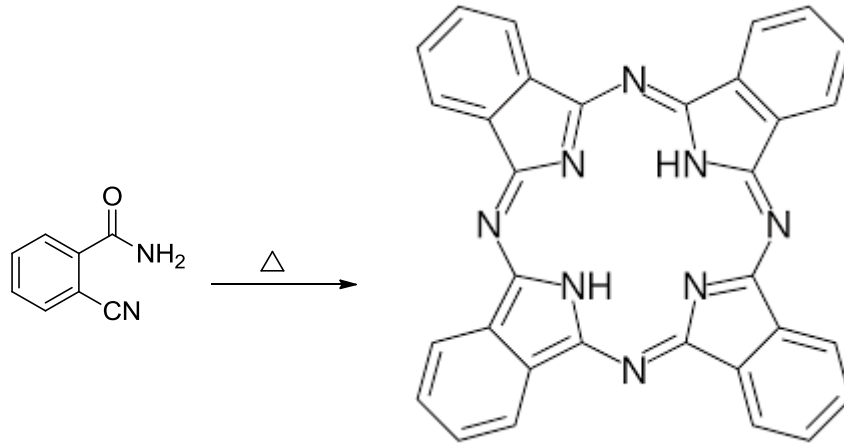
Fitalosiyeninler ilk kez 1907 yılında, Braun ve Tcherniac isimli araştırmacılar tarafından fitalimid ve asetikanhidrit ile *o*-siyanobenzamidin sentezi sırasında rastlantı sonucu mavi renkli bir yan ürün olarak bulunmuştur. Yapısı 1930 yılında aydınlatılmış olup çok çeşitli kullanım alanlarına sahiptir. Sentetik olarak elde edilen boyar madde gruplarından (Moser, 1983). 1927 yılında piridin içinde *o*-dibromobenzen ve bakır (I) siyanürden, 1,2-disiyanobenzen sentezi sırasında bakır kompleksi olarak elde edilmiştir.

1928 yılında Scottish Dyes şirketi fitalik anhidrit ve amonyaktan fitalimid sentezi sırasında cam kaplı reaktörün çatlaması ve çelik dış tabakanın ürün ile reaksiyonu sonucu mavi renkli olan bu ürün oluşmuştur. Beyaz fitalimid içerisinden izole edilen bu ürünün pigment maddesi olarak kullanılabilceği keşfedilmiştir. Daha sonraları bu şirket ICI firmasının bir yan kuruluşu olarak Reginald Linstead ile ortak çalışmaya başlamıştır. Fitalosiyenin molekülünün gerçek yapısı Linstead ve ekibinin çalışmaları sonucunda belirlenmiştir (Linstead, 1934).

### **2.1.2. Fitalosiyeninlerin sentezi**

Fitalosiyeninleri süblimleştirmek mümkündür. Bu nedenle bileşiği saf olarak elde etmek kolaydır. Fitalosiyeninlerin en önemli özelliği termik ve kimyasal kararlılığıdır. Bu nedenle periyodik tablodaki metallerin çoğu ile bileşik oluşturabilmektedir.

Fitalosiyenin ilk olarak etanol içerisinde *o*-siyanobenzamid'in reflüks (geri akım) edilmesi ile elde edilmiştir (Şekil 2.2.). Fitalosiyenin sentezinde ilk olan bu yöntem ile oluşan metallsiz fitalosiyenin (H<sub>2</sub>Pc) verimi düşüktür.



Şekil 2.2. Fitalosiyenin ilk sentez yöntemi

Fitalosiyenin sentezinde daha ekonomik, daha kısa sürede ve daha verimli reaksiyonlar geliştirmek için amaçlanan çalışmalar giderek artmaktadır. Örneğin mikrodalga enerjisi kullanılarak kurulan reaksiyonun yüksek verimlilikte ve kısa sürede ürün oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu reaksiyon solventsiz ortamda kurulduğundan dolayı oluşan ürünlerin saflaştırılmaları kolaylaşmaktadır (Kingston ve Haswell, 1997). Ayrıca oda sıcaklığında fitalosiyenin elde edebilmek için son yıllarda birkaç çalışma yapılmış olup metalli fitalosiyenin türevleri elde edilmiştir (Nemykin ve ark., 2000). Fitalosiyenin sentezinde en yaygın ve sık olarak kullanılan sentez yöntemlerinden bazıları Tablo 2.1.'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Fitalosiyenin genel sentez yöntemleri

Süstitüe Olmamış Fitalosiyeninler	Metalsiz Fitalosiyenin (H <sub>2</sub> Pc) Sentezi
	Metalli Fitalosiyenin (MPc) Sentezi
	Sandviç Fitalosiyenin (MPc <sub>2</sub> ) Sentezi
Süstitüe Edilmiş Fitalosiyeninler	Benzo-Süstitüe Fitalosiyenin Sentezi
	Tetrasüstitüe Fitalosiyeninlerin Sentezi
	Oktasüstitüe Fitalosiyeninlerin Sentezi
Eksenel Süstitüe Fitalosiyeninler	Oksotitanyum (IV) ve Oksovanadyum (IV) Pc'ler ve İlgili Bileşikler
	Eksenel Olarak Süstitüe Edilmiş SiPc, GePc ve SnPc
Asimetrik Fitalosiyeninler	
Naftalofitalosiyeninler	
Polimerik Fitalosiyeninler	

### 2.1.3. Fitalosiyeninlerin kullanım alanları

Fitalosiyeninlerin oksitleyici reaktifler dışında kimyasal madde, ışık ve ısıya karşı göstermiş olduğu dayanıklılıkları nedeni ile bu konuda yapılan çalışmalar giderek artmaktadır. Fitalosiyenin sentezi sırasında bileşik üzerindeki periferel bölgelere farklı süstitüentlerin bağlanmasıyla birbirinden farklı özelliklere sahip Pc'ler elde edilmektedir. Bu sentez aşamasında oluşan farklı özelliklerden dolayı da Pc'lerin birbirinden farklı birçok uygulama alanı oluşmaktadır.

Matbaada mürekkep olarak, duvar boya üretiminde, sentetik elyafların, plastiklerin, aliminyumların ve kumaşların renklendirilmesinde kullanımı Pc'lerin ilk keşiflerinden günümüze kadar değişmemiştir. Bunlara ek olarak; yakıt pillerinde, tıp alanında (yarı iletken sıvı, sıvı kristal, lazer, yağlayıcı madde vb. olarak) kullanılmaktadır. Ayrıca nano teknolojiye, optik veri depolamada, elektrokatalitik ve fotokatalitik uygulama alanlarında kullanılmaktadır (Liu ve ark., 2004). Fitalosiyeninlerin önemli kullanım alanları şunlardır;

#### 2.1.3.1. Tekstil ve boyar madde

Fitalosiyeninler boya ve pigment maddesi olarak tekstil uygulamalarında çok yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Kumaş renklendirilmesi, baskılama, püskürtme işlemleri ve sentetik elyafları boyamada kullanılan madde olarak fitalosiyeninler ön plana çıkmaktadır. Pc'ler tekstil dışında mavi ve yeşil renkleri nedeni ile dolma kalem mürekkeplerinde, yazıcı tonerlerinde, duvarların, plastiklerin ve metal yüzeylerin renklendirilmesinde tercih edilmektedir.

Kararlı ve yarı kararlı formları kullanım alanlarında farklılık göstermektedir. Örneğin yarı kararlı olan  $\alpha$ -form boyama için kullanılırken, kararlı  $\beta$ -polimorf yazıcı mürekkeplerinde tercih edilmektedir. Suda çözünebilen fitalosiyenin boyaları sadece sülfonik asit içermektedir. Bu Pc'ler pamuk için reaktif boya ve kâğıt için direkt boya olarak kullanılmaktadır (Gordon ve Gregory, 1983).

### 2.1.3.2. Elektrofotografi

Pc'ler substrat görünen kopya üretiminde ve fotokondaktörde kopya işleminde görev yapan önemi oldukça büyük olan kimyasal maddelerdir. Elektrofotografi ise elektriği ve ışığı kopyalama işlemi için kullanan bir teknolojidir.

Kopyalama işlemlerinde fotoiletken olarak amorf selenyum metali kullanılmaktaydı. Zamanla çeşitli nedenler ile yerini organik fotoiletken maddelere bırakmıştır. Organik fotoiletken olarak kullanılan titanil (oxo titanyum) fitalosiyanimler, galyum fitalosiyanim ve alüminyum mu-oxo dimer piyasada önemli paya sahiptir.

Bakır fitalosiyanimler ışığa ve özellikle ısıya karşı diğer Pc'lere göre önemli derecede farklı özellik göstermektedir. Bu nedenle de tonerlerde tercih edilmeleri kaliteyi arttırmaktadır (Koçak ve ark., 2004).

### 2.1.3.3. Nonlineer optik cihazlar

Nonlineer optik cihazların fitalosiyanimli olanları yavaş yavaş artmaktadır. Aslında günümüzde yarı iletken kuantum yapılı cihazlar daha yaygındır. Pc'ler kolaylıkla polarize edilebilen, konjüge  $\pi$ -elektronları ağı nedeniyle nonlineer optik özellik göstermektedir.

İnorganik optik malzemelerin verdiği cevapların organik nonlineer optik malzemelere göre daha yavaş yanıt vereceği düşünülmektedir (Selçukoğlu, 2005).

### 2.1.3.4. Optik veri depolama

Bilginin depolanması ve geri çağırılması optik veri depolamadır. Veriler disketlerde ve bantlarda manyetik olarak depolanmaktadır. Pc'ler kimyasal kararlılıkları yüksek bileşiklerdir. Ayrıcı Write Once Read Many (WORM) üzerine uzun süreli veri depolanmasında en çok tercih edilen malzemeler olmasının nedeni yarı iletken özellikte olmalarındandır. Film haline getirilen Pc malzemesi üzerine verilen noktasal

lazer ısıtma bu malzemeyi noktasal olarak süblimleştirerek oluşturulan delikler sayesinde okuma ve yazma işi gerçekleştirilmektedir (Moussavi ve ark., 1988).

### **2.1.3.5. Fotodinamik terapi**

Klinik tedavide görünür bölge ya da görünür bölgeye yakın veya görünür bölgede dalga boylu ışınların ya da bu ışınlara duyarlı maddelerin tedavide kullanılması fotodinamik terapi olarak tanımlanmaktadır. Kanser tedavileri için farklı bir seçenek olarak kullanılmaktadır. Foto uyarıcı olan ilaç, tümörün dokusuna lazer ışık kullanarak etki etmektedir (Durmuş, 2004).

Burada tümör dokusu için uygun olan foto uyarıcı normal dokuya zarar vermeden sadece tümörlü doku etrafına konumlanmaktadır. Lazer ışık ile de tümör içeren dokulara ve tümörlü hücrelere giriş yapmaktadır.

Kanda ve kan bileşiklerinde bulunan virüsler ve gram negatif bakteriler için çeşitli foto uyarıcılar sayesinde fotodinamik terapi uygulamaları genişletilmektedir (Durmuş, 2004). Bu konuda yapılan ilk çalışmalarda foto uyarıcı olarak hemotoporfirinler kullanılmıştır. Hemotoporfirinler 590-680 nm dalga boyu arasında absorpsiyona sahiptir. Dokularda daha yüksek absorpsiyon yeteneğine sahip bileşikler için çalışmalar sürdürülmektedir.

Foto uyarıcılar 630 nm'den daha uzun dalga boylarında absorban yapabilmeli, sağlıklı dokular için toksik olmamalı, hasarlı dokulara karşı seçici ve yüksek verimlilikte  $^1O_2$  oluşturmalıdır. Pc bileşikleri fotodinamik terapiler için ümit verici malzemelerdir.

Fitalosiyanın merkezindeki metal atomu nedeni ile ışığa duyarlı özellik kazanır. Paramagnetik metalleri (Fe, Co, Cu ve Ni gibi) içeren Pc'lerde fotobiyolojik olarak aktivite gözlenmemişken, diamagnetik metalleri (Al ve Zn gibi) içeren Pc'ler de aktivite gözlenmiştir.

### 2.1.3.6. Sıvı kristal

Tek boyutlu iletken olma potansiyelinden dolayı sıvı kristal fitalosiyanimlere ilgi artmaktadır. Fitalosiyanimler çok farklı metal iyonlarıyla kararlı bir kompleks bileşik oluşturabilme özelliğine sahiptir (Piechocki ve ark., 1982).

Sıvı kristal bileşikler basınç ve titreşime tepki göstererek şekil olarak tepki vermektedir. Bu şekilde çeşitli aygıtların titreşimlerini görünür hale getirmek mümkündür. Sıvı kristal bileşiklerin hesap makinesi, televizyon ekranları ve saat üretimlerinde kullanımları artmaktadır.

### 2.1.3.7. Kimyasal sensör yapımı

Fitalosiyanimler ve metal bileşikleri sensör cihazlarında tekli ya da çoklu kristal tabakalar şeklinde bulunmaktadır. Bu şekilde üretilen cihazlar organik çözücü buharlara ve azotoksit (NO<sub>x</sub>) gibi gazlara karşı tepki vererek uyarıcı özellik olarak kullanılmaktadır (Zhou ve ark., 1996).

### 2.1.3.8. İnfrared absorplayıcı

Fitalosiyanimler en iyi mavi ve yeşil pigment olarak renklendirici niteliğe sahiptir. Klorlanmış yeşil pigmentler organik çözücüler içinde yüksek çözünürlüğe sahiptir ve yavaşça infrared absorplayıcılara dönüşmesi çok önemli bir gelişme olarak görülmektedir.

Planar moleküllerin, Van der Waals ve hidrojen bağı kuvvetleri gibi kararlı bir kristal kafes oluşturmaları en yüksek performansa sahip pigment olmalarını sağlamaktadır. Bu duruma ilk örnek bakırlı fitalosiyanimler olup bunlar büyük makrosiklik yapıda moleküllerdir. Bu bileşiklerin organik çözücülerde çözünebilmesinin nedeni ise sekiz tiyofenol grupla infrared absorplayıcıya dönüşümü ile düzlemselliğin yok olmasıdır.



Pc'ler kâğıt paralar için güvenlik önlemi oluşturmada, otomobillerin ön camlarında ve binaların camlarında ısınmaya neden olan radyasyon ışınlarının geçişini engellemede infrared absorplayıcı olarak kullanılmaktadır (Çerlek, 2005).

### **2.1.3.9. Katalizör**

Fitalosiyanimler birçok önemli kimyasal reaksiyonda kataliz görevi görmektedir. Genellikle reaksiyonlar homojen olan Pc katalizörünün ve reaksiyona giren maddelerin çözelti fazında bulunan katalitik işlemlerdir. Fakat metali fitalosiyanimlerin katı fazda heterojen olarak katalizör görevi gördüğü bilinmektedir. Bu işlemler çözelti fazındakine göre geri dönüşümü ve kazanımı nedeniyle daha kullanışlıdır.

Oksijen indirgenmesiyle düşük maliyete sahip yakıt geliştirmek için katalitik sistem olarak çalışmalar yapılmaktadır. Merox Yöntemi diye bilinen işlemde kristal demir ya da kobalt fitalosiyanimler ham petrol içinde bulunan tiyollerin uzaklaştırılmasında katalizör görevi görmektedir. Kişisel bakım ürünlerinden deodorantların yapımında oluşan hidrojen sülfürün eliminasyonunda ise FePc ve CoPc'ler kataliz görevi üstlenmiştir (Thomas, 1990).

Çevre sağlığı için önemli heterojen reaksiyonlardan biri kalay fitalosiyanim ve kükürtdioksidin yükseltgenmesidir. Bu reaksiyonda klorlu aromatiklerin suda çözünür FePc-*t*-SO<sub>3</sub>H kullanarak yok edilmesi sağlanmaktadır (Thomas, 1990).

## **2.2. Fitalosiyanimlerin Sucul Ekosisteme Girişi ve Etkisi**

Algler; sucul sistemlerde biyolojik açıdan zengin bir çeşitliliğe sahiptir. Ekosistemlerin birçok çeşidinde, mikro ve makro formlarda bulunan bu mikroorganizmalar, dünyadaki diğer canlıların yaşamsal faaliyetlerini devam ettirebilmeleri açısından büyük önem arz etmektedir. Algler besin ağındaki yerleri itibari ile primer üreticilerdir. Sahip oldukları fotosentetik pigmentlerin başında klorofil gelmektedir ve bu fotosentetik pigmentler besin üretimine kaynak sağlamaktadır.

Yeryüzünün dörtte üçü sularla kaplı olduğu için, algler dünya üzerindeki biyokimyasal döngülerde organik madde taşınımı ve oksijen üretiminin büyük bir bölümünü tek başına karşılamaktadır (Reynolds ve Hamilton-Taylor, 1992).

Kimyasal atıklar, endüstriyel atıklar, evsel atıklar ve yanlış tarım uygulamaları sonrasında meydana gelen insan sağlığına ve diğer canlıların sağlığına zarar verecek maddeler sucul ekosistemlere karıştığında algler için ciddi bir tehdit oluşturmakta ve alglerin yaşamsal faaliyetlerini zora sokmaktadır. Bu tip atık sulara bulunan fitalosiyeninler renk değişiminin yanında, suda ışık azalmasına yol açmaktadır. Suyun renk değiştirmesi, tat değişimi ve koku farklılaşması gibi sonuçlara sebep olmaktadır. Bunun sonucunda ise alglerin fotosentez aktivitelerinde negatif yönde bir etki söz konusu olmaktadır. Bakır içeren fitalosiyeninlerin ise suda yaşayan canlı türleri için toksik etki yarattığı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Acemioğlu, 2004; Kaushik ve ark., 2009).

### **2.3. Çalışmada Kullanılan Fitalosiyeninler**

#### **2.3.1. Tetrakis-(sodyum mercaptoethansülfonat)-metalsiz fitalosiyenin**

Fitalosiyeninler farklı fitalik asit türevlerinden elde edilmektedir. Fakat endüstriyel yöntemde fitalikanhidritten elde edilmesi daha ekonomik olsa da fitalonitril kullanılarak bir laboratuvarında daha saf ürünler kolayca sentezlenebilmektedir. Bu nedenle çoğunlukla fitalonitrilden (1,2-disiyanobenzen) fitalosiyenin sentezi yöntemi kullanılmaktadır. Fitalonitrilden metalsiz fitalosiyenin ( $H_2Pc$ ) sentezlemek için çeşitli siklotetramerizasyon yöntemleri vardır. Fitalonitrilin amonyakla reaksiyonu ile diiminoisindolin oluşumu başlamaktadır. Diisoiminoindol  $H_2Pc$ 'yi oluşturmaktadır. İndirgeyici olarak kullanılan hidrokinon içinde eritilmiş fitalonitrilin (ağırlıkça 4:1 oranında) siklotetramerizasyonu ile de  $H_2Pc$  hazırlanabilmektedir. Benzer şekilde oldukça yüksek verim ile metalsiz Pc sentezi için 1,8-diazabisiklo [4.3.0] non-5-ene (DBN) ya da 1,8- diazabisiklo [5.4.0] undek-7-ene (DBU) gibi nükleofilik engelleyici olmayan bazlar da kullanılabilir. Bu baz fitalonitrilin pentanol çözücüsü içerisinde siklotetramerizasyonu için etkili bir maddedir. Bir diğer metotta ise

fitalonitrilin 135-140°C’de n-pentanol veya diğerk alkollerde sodyum veya lityum ile muamelesi veya 135-140°C’de n-pentanol disodyum fitalosiyaniyi vermektedir. Sentezlenen metallo fitalosiyaniinin derişik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile direkt olarak muamelesiyle metalsiz fitalosiyaniine geçilebilmektedir (Arslanoğlu, 2004).

### 2.3.2. Tetrakis-(sodyum merkaptoethansülfonat) bakır (II) fitalosiyaniin

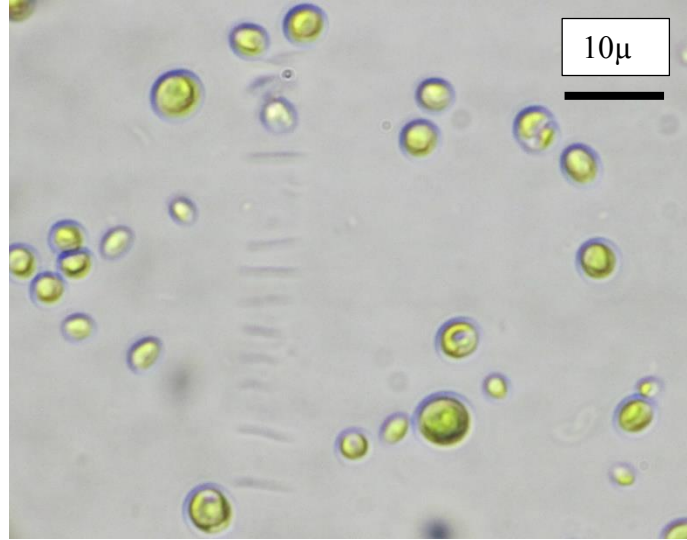
Template etki gösteren metal iyonu kullanılarak fitalonitril ya da diiminoisindolinin siklotetramerizasyonu sonucu metalli fitalosiyaniin (MPc) basit bir şekilde oluşturulabilmektedir. Farklı bir yöntemde fitalik anhidrit veya fitalimidden üre ve metal tuzu (örneğin bakır (II) asetat ya da nikel (II) klorür) gibi bir azot kaynağı varlığında MPc sentezlenebilmektedir. Alternatif olarak MPc, metal tuzu ve H<sub>2</sub>Pc ya da Li<sub>2</sub>Pc arasındaki reaksiyon sonucunda da oluşturulabilmektedir (Selçukoğlu, 2005).

### 2.4. *Chlorella Vulgaris*

Hollandalı bir araştırmacı olan Martinus Willem Beijerinck 1890 senesinde iyi tanımlanmış çekirdekli ilk mikroalgi keşfetmiştir. *Chlorella* ismi Yunanca’da yeşil anlamına gelen “chloros” kelimesinden gelmektedir. 1900’lerin başında, *Chlorella* protein içeriği (%55 kuru ağırlık) ile sıra dıőı besin kaynağı olarak Alman bilim adamlarının dikkatini çekmiştir. *Chlorella* bađıőıklık düzenleyici ve anti-kanser özelliklere sahip olması sebebiyle tıbbi tedavi için kullanılmaktadır. Günümüzde *Chlorella vulgaris* besin takviyesi olarak tüketilmektedir ve içerdiği maddeler boyalar, farmasotikler, hayvan yemi, kozmetik ürünler ve su ürünleri yetiőtiriciliđi gibi amaçlarla da kullanılmaktadır (Safi ve ark., 2014).

Yeşil alglerin (*Chlorophyta*) tek hücreli formlarından olan *Chlorella* 2.8-10 mikron çapında, küre veya elips şekline sahip bir organizmadır (Şekil 2.3.). Sucul ekosistemlerin yanında genellikle nemli topraklarda, buz ve ağaç gövdelerinde de yaşayabilmektedir. Serbest yaşaması yaygın olarak görülse de bazı protozoaların protoplazmasında ve bazı sölenterlerin içinde yaşadıkları da bilinmektedir. *Chlorella*’nın içeriğinde 18 kadar aminoasit ve bazı vitaminler [B1 (tiyamin), B2

(riboflavin), B3 (niyasin), B5 (pantotenik asit), B6 (piridoksin), B7 (biyotin), B9 (folik asit), B12 (kobalamin), C (askorbik asit), E (tokoferol), A (retinol)] bulunmaktadır. Ayrıca sporopollenin adlı etkin madde vücuttaki toksinlerin atılmasını sağlamaktadır (Tanyolaç, 2011).



Şekil 2.3. *Chlorella vulgaris*

## 2.5. Serbest Radikaller

Serbest radikaller atmosferik oksijenin uyarılmış formları olarak bilinmektedir. Hücrelerde sinyal molekülleri olarak işlev görür, fakat aynı zamanda aerobik metabolizmanın önlenemez toksik yan ürünleri (Foyer ve Noctor, 2013; Vaahtera ve ark., 2014) olarak da düşünülmektedir. Büyük olasılıkla dünyada yaklaşık 2.4-3.8 milyar yıl önce ilk atmosferik oksijen molekülleri ile birlikte ortaya çıkmıştır (Halliwell ve Gutteridge, 2007; Mittler ve ark., 2011; Boyd ve ark., 2014) ve o yıllardan bu zamana kadar sürekli aerobik yaşamın bir parçası olmuştur.

Dünya'daki biyolojik sistemler tarafından oluşturulan atmosferik oksijenin çoğu hemen hemen reaktif oksijen türlerine (ROS) dönüştürülmesi mümkündür (Anbar, 2008) (Boyd ve ark., 2014). Reaktif oksijen türlerinden biri olan süperoksiti temizleyen süperoksit dismutaz (SOD) enzimi, yaşamın tüm formlarında bulunduğu ve öbakterilerin arkebakterilerden ayrılmadan önce evrimleştiği bulgusu, bu olasılığı

güçlü bir şekilde desteklemektedir (Miller, 2012). Bu nedenle, dünyadaki aerobik yaşamın gelişimi, ROS varlığında meydana gelmiştir ve ROS'un şu anda farklı biyolojik sistemlerde oynadığı rolleri göz önüne aldığımızda bu gerçek akılda tutulmalıdır.

Sinyal molekülleri olarak ROS, farklı reaktivite seviyeleri, üretim alanları ve biyolojik membranları geçme potansiyeli gibi özelliklerinden dolayı çok yönlüdür (Halliwell ve Gutteridge, 2007; Mittler ve ark., 2011). Büyük olasılıkla ilk olarak hücreler tarafından güvenli olmayan atmosferik oksijen seviyelerini algılamak veya farklı metabolik reaksiyonları izlemek için sinyal molekülleri olarak kullanılmıştır. Ancak o zamandan beri bitkiler, hayvanlar ve çoğu ökaryotik organizmadaki yaşamın neredeyse tüm yönlerini düzenlemek için gelişmiştir. Örneğin yüksek bitkilerde, ROS'un gelişmeyi, farklılaşmayı, redoks seviyelerini, stres sinyallerini, diğer organizmalarla etkileşimi, sistemik tepkileri ve hücre ölümünü düzenlediği bulunmuştur (Foyer ve Noctor, 2013; Mittler ve ark., 2011; Mittler ve ark., 2004).

Aerobik metabolizmanın toksik yan ürünleri olan ROS'lar temel olarak kloroplastlarda, mitokondri ve peroksizomlarda oluşmaktadır. Fakat aynı zamanda yeterince yüksek bir redoks potansiyeline sahip protein veya molekül içeren herhangi bir hücresel bölmede de meydana gelebilmektedirler (Miller, 2012). Daha sonra bu ROS'lar antioksidan sistem tarafından detoksifiye edilmektedir (Mittler ve ark., 2004).

ROS hücresel olarak DNA, RNA, protein ve membran oksidasyonuna neden olmaktadır. ROS'un bu potansiyel toksik etkilerini önlemek için antioksidan mekanizmalar hücrelerde sürekli olarak ortaya çıkar ve temizlenmesinde etkili rol oynar. Bu sürecin tamamı oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 2007; Mittler ve ark., 2011; Mittler ve ark., 2004).

### **2.5.1. Tekli uyarılmış oksijen ( $^1O_2$ )**

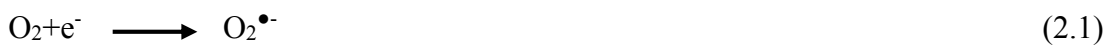
Tekli uyarılmış oksijen ( $^1O_2$ ) yüksek ışık yoğunluğu ve/veya düşük karbondioksit ( $CO_2$ ) asimilasyon hızı altında oluşumu indüklenen üçlü uyarılmış klorofilden  $O_2$ 'ye enerji verilmesi ile oluşur (Gill ve Tuteja, 2010).  $^1O_2$ , 4-100  $\mu s$  arasında olan kısa

ömürlü bir bileşiktir. Farklı biyolojik moleküller ile reaksiyona girebilen, lipid peroksidasyonunu (LP) tetikleyen ve proteinlerde, yağ asitlerinde ve nükleik asitlerdeki yapısal hasarları tetikleyen bir ROS'tur (Mittler, 2017; Tiwari ve ark., 2017) Ca-karoten, tokoferol veya plastokinon gibi hücrel metabolitler, aşırı olduğunda da birkaç savunma geninin sub-regülasyonunu tetikleyen  $^1\text{O}_2$ 'ye indirgenebilmektedir (Krieger-Liszkay ve ark., 2008).

### 2.5.2. Süperoksit radikali ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ )

Bitki hücrelerinde süperoksit radikalının ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) üretimi, moleküler  $\text{O}_2$ 'nin bir elektron olarak indirgenmesiyle gerçekleşen bir işlemdir (Denklem 2.1) (Elstner, 1982; Mano ve ark., 1987; Asada, 1994).  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , hidroksil radikali ve singlet oksijeni gibi daha da toksik  $\text{O}_2$  türlerinin üretilmesinden sorumludur.  $\text{O}_2$  ve bunun türevlerinin üretimi, bitkiler çeşitli biyotik ve abiyotik streslere maruz kaldığında uyarılabilmektedir. Çoğu durumda,  $\text{O}_2$ 'nin indüklenmiş üretimi, hücre duvarları, plazma membranları (Pinton ve ark., 1994; Doke ve ark., 1996; Murphy ve Auh, 1996), sitozol ve mikrozomlar (Çakmak ve Marschner, 1988) peroksizomlar (Rio ve ark., 1998; López-Huertas ve ark., 1999) ve mitokondri gibi farklı hücre bölmelerinde yer alan NAD(P) H-oksitleyici enzim sistemleri tarafından katalize edilmektedir (Gross ve ark., 1977; Çakmak ve ark., 1987).

$\text{O}_2^{\bullet-}$  ve türevlerinin NAD(P)H-oksidadlardan üretimi, örneğin hücre duvarlarının lignifikasyonu (Gross ve ark., 1977), demirin kök tarafından indirgenmesi ve alınması (Çakmak ve ark., 1987), patojen enfeksiyonuna karşı direnç gibi farklı hücrel fonksiyonlarla ilişkilendirilmektedir (Mehdy ve ark., 1996; Bolwell ve Wojtaszek, 1997). Birçok enzimatik ve enzimatik olmayan lipit peroksidasyon işlemi, temel olarak bir elektron donörü olarak, özellikle Fe gibi redoks aktif geçiş metallerinin varlığında, NADPH'ye yüksek bir bağımlılık göstermektedir.



### 2.5.3. Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve süperoksit radikali (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) birincil ROS olarak kabul edilmektedir. Ancak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>'ye kıyasla daha yüksek stabilitesi nedeniyle daha ciddi bir oksidatif hasar riskine sahiptir (Sharma ve ark., 2012).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretimi, peroksit molekülünün iki hidrojen atomu ile birleşmesi sonucu oluşsa da biyolojik sistemlerde asıl oluşumu, süperoksit dismutasyonu ile meydana gelmektedir (Denklem 2.2) (Flora, 2007). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin yüksek toksisitesi kimyasal yapısı ile kolayca açıklanmaktadır. Eşleştirilmemiş elektronları yoktur ve dokulardaki yarı ömrü yaklaşık 1 ms'dir. Bu nedenle biyolojik zarları difüzyonla kolayca geçebilmektedir ve uzun mesafeler arasında dağılabilmektedir. Bulunduğu bölgelerin sayısını arttırabilmektedir (Gupta ve ark., 2015).



### 2.5.4. Hidroksil radikali (OH<sup>•</sup>)

Hidroksil radikali (OH<sup>•</sup>), Cu ve Fe gibi redoks aktif metallerin varlığında O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> arasındaki etkileşime bağlı olarak Haber-Weiss reaksiyonunun bir sonucu olarak oluşan en tehlikeli ROS'tur (Denklem 2.3) (Cuypers ve ark., 2016). Hidroksil radikali, yaklaşık 1 ns'lik bir yarı ömre sahiptir (Mittler ve ark., 2011). Bu nedenle, ana hedefleri üretim bölgelerine yakın bir konumdadır (Sharma ve ark., 2012).

Yüksek reaktivite ve sonuç olarak yüksek toksisiteye yol açan kimyasal özelliklerine ek olarak, OH<sup>•</sup> tüm organik moleküllere ciddi zararlar verebilmektedir. Canlılarda OH<sup>•</sup> metabolizmasından sorumlu enzimatik bir mekanizma dokularda yoktur. Yüksek düzeylerde OH<sup>•</sup> bulunması ise, programlanmış hücre ölümüne sebep olmaktadır (Gill ve Tuteja, 2010; Sharma ve ark., 2012; Demidchik, 2015).



## 2.6. Antioksidan Sistem

Oksidatif stres, serbest radikal üretimi ile antioksidan sistemin ROS temizleme kapasitesi arasındaki dengesizlikten dolayı oluşmaktadır (Pisoschi ve Pop, 2015). Serbest radikal üretiminin artması durumunda, savunma mekanizmaları serbest radikalleri nötralize etmek için yeterli değilse hücre yaralanmasına ve geri dönüşümsüz hasara neden olan çok çeşitli biyomoleküllerde ciddi hasara neden olabilmektedir (Cerqueira ve ark., 2007; Gupta ve ark., 2015; Wang ve ark., 2011).

Bu bağlamda, biyolojik sistemler serbest radikalleri reaktif olmayan türevlere dönüştürmek için savunma mekanizmaları geliştirmiştir (Tablo 2.2.) Bu mekanizmalar endojen ve eksojen olarak iki gruba ayrılmaktadır (Tablo 2.3.). Endojen antioksidanlar, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), askorbat peroksidaz (APOD), glutatyon redüktaz (GR) ve guaiakol peroksidaz (GPOD), glutatyon ve serbest prolin adlı aminoasittir (Krishnamurthy ve Wadhvani, 2012). Eksojen antioksidanlar ise; tokoferoller, askorbik asit, glutatyon, karotenidler ve fenolik bileşiklerdir. Ayrıca enzimler ya da diğer antioksidan moleküller tarafından detoksifiye edilemeyen serbest radikaller hücre membranında lipid peroksidasyonuna neden olarak son ürün olarak malondialdehiti (MDA) oluşturmaktadır. Lipid peroksidasyonu, hücre membranında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin radikaller tarafından çeşitli ürünlere yıkılması olayıdır. Bu yıkım olayı sonucunda oluşan aldehit ürünleri hücre hasarına neden olmaktadır. Bu sebeple MDA miktarı hücredeki oksidatif hasarın düzeyini belirlemede önemli bir parametre olarak kullanılmaktadır (Benzer ve Ozan, 2003).



Tablo 2.2. Bazı antioksidan enzim ve moleküllerin temel görevleri

Bileşikler	Görevleri
Süperoksit dismutaz (SOD)	$O_2^{\bullet-}$ 'i $H_2O_2$ 'ye dönüştürür.
Katalaz (KAT)	$H_2O_2$ 'yi $H_2O$ 'ya çevirir.
Askorbat Peroksidaz (APOD)	$H_2O_2$ 'yi $H_2O$ 'ya çevirir.
Glutatyon redüktaz (GR)	$H_2O_2$ 'yi ve lipit peroksitlerini etkisizleştirir.
Guaiakol peroksidaz (GPOD)	$H_2O_2$ 'yi ve lipit peroksitlerini etkisizleştirir.
Glutatyon	$H_2O_2$ 'yi ve lipit peroksitlerini etkisizleştirir.
Tokoferoller	Lipit peroksitlerini, $O_2^{\bullet-}$ ve $OH^{\bullet-}$ 'ı temizler.
Karotenoidler	Peroksi radikalleri ile $O_2^{\bullet-}$ ve $OH^{\bullet-}$ 'ı temizler.
Askorbik asit	Direk olarak $O_2^{\bullet-}$ , $OH^{\bullet-}$ ve $H_2O_2$ 'yi temizler.
Fenolik bileşikler	$^1O_2$ 'yi temizler.

Tablo 2.3. Antioksidanların sınıflandırılması

Antioksidanlar	
Endojen Antioksidanlar	Enzimatik Antioksidanlar
	Süperoksit dismutaz (SOD)
	Katalaz (KAT)
	Askorbat peroksidaz (APOD)
	Glutatyon redüktaz (GR)
	Guaiakol peroksidaz (GPOD)
Nonenzimatik Antioksidanlar	Glutatyon
	Prolin
Eksojen Antioksidanlar	Vitamin Eksojen Antioksidanlar
	$\alpha$ -Tokoferol (Vitamin E)
	$\beta$ -karoten (Vitamin A)
	Askorbik asit (Vitamin C)
	Fenolik bileşikler
İlaç Olarak Kullanılan Eksojen Antioksidanlar	

## 2.6.1. Endojen antioksidanlar

### 2.6.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

Bakteriler, hayvanlar ve bitkiler gibi çeşitli aerobik organizmaların olduğu her yerde bulunan bir protein olan süperoksit dismutaz (SOD) oksidatif strese karşı ilk enzimatik

savunma hattı olarak kabul edilmektedir (Gratão ve ark., 2005). SOD, hücrede süperoksit radikalının ( $O_2^{\bullet-}$ ) dismutasyonunu sağlar. Bu nedenle SOD hem  $O_2^{\bullet-}$  hem de  $H_2O_2$  seviyelerini etkilemektedir. Ayrıca  $O_2^{\bullet-}$  ile ilişkili toksisiteyi önleyerek ROS detoksifikasyonunda çok önemli bir role sahiptir (Abouzari ve Fakheri, 2015).

Hücre içi seviyeleri  $10^{-5}$  M kadar ulaşabilen bu metaloenzim (Fink ve Scandalios, 2002), yüksek bitkilerde üç sınıfta gruplandırılabilir: Cu/Zn-SOD, Mn-SOD ve Fe-SOD (Perry ve ark., 2010; Sharma ve ark., 2012). Yapısal olarak, Fe-SOD ve Mn-SOD birbiriyle ilişkilidir, ancak Fe aktif merkezdeki Mn iyonunun yerini alamaz; Cu/Zn-SOD, iki metalik iyon iç yapısına sahip olarak, yapısal seviyede farklılıklara neden olan farklı kimyasal ve fiziksel özelliklere sahiptir (Scandalios, 1997). SOD'un tanımlanması KCN ve  $H_2O_2$ 'ye duyarlılıklarına göre negatif boyama ile yapılmaktadır. Her iki inhibitöre duyarlı Cu/Zn-SOD,  $H_2O_2$ 'ye duyarlı Fe-SOD ve KCN ile  $H_2O_2$ 'ye dirençli Mn-SOD şeklinde belirlenmektedir (Azevedo ve ark., 1998).

SOD izoenzimleri farklı hücre bölümlerinde yer almaktadır. Charophyta grubu alglerde ve yüksek bitkilerde Cu/Zn-SOD genellikle sitozol ve tilakoid zarlarında bulunmaktadır. Mn-SOD'un, peroksizomda olduğu bildirilmesine rağmen, temel olarak mitokondriyal matrikste yer almaktadır. Fe-SOD ise, kloroplastların tilakoid membranlarında yer almaktadır (Gill ve Tuteja, 2010).

### **2.6.1.2. Katalaz (KAT)**

Aerobik organizmaların farklı türlerinde bulunan enzimatik işleve sahip bir tetramerik proteindir (Sharma ve ark., 2012). Katalaz (KAT),  $H_2O_2$ 'nin  $H_2O$  ve  $O_2$ 'ye ayrıştırılarak hücre içi detoksifikasyonundan sorumludur (Gill ve Tuteja, 2010; Weydert ve Cullen, 2010).  $H_2O_2$ 'nin ayrışmasında yer alan birkaç enzim olmasına rağmen, KAT bu işlemde merkezi bir rol oynamaktadır. Ayrıca, bir KAT molekülü dakikada 6 milyon  $H_2O_2$  molekülünü parçalama özelliği ile antioksidan enzimler arasında en yüksek parçalama hızına sahiptir (Gill ve Tuteja, 2010).

KAT'ın  $H_2O_2$ 'ye yüksek hassasiyetine rağmen, bu enzimin aktivitesi ancak yüksek  $H_2O_2$  seviyeleri mevcut olduğunda etkilidir. Çünkü  $H_2O_2$ 'ye olan afinitesi APOD gibi diğer enzimlerden nispeten düşüktür (Mittler, 2002).

Bitkiler ekspresyon profillerine göre sınıflandırılmış üç ana KAT sınıfına sahiptir: sınıf I, fotosentetik dokularda bulunur ve ışığa bağımlıdır; sınıf II, büyük ölçüde vasküler dokularda bulunur; III. sınıf ise fidelerin gelişiminin erken aşamalarında ve fidelerin gelişiminde tespit edilmektedir (Gill ve Tuteja, 2010). SOD'a benzer şekilde, KAT aktivitesindeki değişiklikler genellikle oksidatif stres koşullarının oluşmasıyla ilişkilendirilmektedir (Gill ve Tuteja, 2010; Gupta ve ark., 2015).

Katalazın bir diğer antioksidatif rolü ise, Cu veya Fe iyonları tarafından katalize edilen Fenton reaksiyonu yoluyla hidroksil radikalinin ( $OH^{\bullet}$ ) oluşum riskini düşürmektir (Ramarathnam ve ark., 1997).

#### **2.6.1.3. Askorbat peroksidaz (APOD)**

Askorbat peroksidaz (APOD), bitkiler ve algler gibi farklı organizmalarda bulunan ve askorbat (AsA)'tan (Mittler ve ark., 2004; Sharma ve ark., 2012) indirgeyici güç kullanarak  $H_2O_2$  orantısını, su ve monodehidroaskorbat (MDHA) olarak katalize eden bir enzimdir. Bu şekilde, APOD aktivitesi büyük ölçüde AsA'nın mevcudiyetine bağlıdır (Foyer ve Noctor, 2003). KAT'den farklı olarak APOD,  $H_2O_2$  için yüksek bir afiniteye sahiptir ve bu ROS'un düşük seviyeleriyle bile işlevlerini yerine getirebildiğini göstermektedir. Bu durum, APOD'un öncelikle  $H_2O_2$  seviyelerinde gerekli sinyal olaylarının geçişinden sorumlu olduğunu belirtmektedir (Mittler, 2002).

#### **2.6.1.4. Glutasyon redüktaz (GR)**

Glutasyon redüktaz (GR), NADPH'ye bağlı oksidoredüktaz ailesine aittir ve hem prokaryotik hem de ökaryotik organizmalarda bulunmaktadır. GR, kloroplast, sitozol ve mitokondride yer almasına rağmen, fotosentetik dokulardaki aktivitesinin

%80'inden fazlasının kloroplastik izoforma ait olduğu bildirilmiştir (Edwards ve ark., 1990; Ashraf, 2009).

GR, glutatyondisülfid (GSSG)'in glutatyonsülfid (GSH)'e indirgenmesini NADPH oksidasyonu ile birlikte katalize ederek, hücrel olarak indirgenmiş olan GSH havuzunu etkin bir şekilde korumaktadır ve serbest radikallere karşı hücre savunmasında temel bir rol oynamaktadır (Anjum ve ark., 2010; Contour-Ansel ve ark., 2006).

AsA-GSH döngüsünün bir bileşeni olarak GR, ROS detoksifikasyonunda, GSH rejenerasyonunda önemlidir ve bitkilerde abiyotik stres toleransı sağlamaktadır (Hasanuzzaman ve ark., 2012; Hasanuzzaman ve ark., 2010). Artan GR aktivitesi, stres toleransı sağlar ve elektron taşıma zincirinin önemli bileşenlerinin redoks durumunu değiştirme yeteneğine sahiptir. GR'nin stres toleransı sağlamadaki en büyük rolü GSH'nin oluşumunun sağlanması ve bitki hücresindeki GSH/GSSG oranının korunmasıdır (Rao ve Reddy, 2008).

#### **2.6.1.5. Guaiakol peroksidaz (GPOD)**

Guaiakol peroksidaz (GPOD), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, organik ve lipit hidroperoksitlerin miktarını azaltmada kullanan çeşitli izozimleri olan geniş bir ailedir. GPOD, hücrelerin sitoplazmasında bulunup H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den kaynaklanan oksidatif hasara karşı hücreleri korumaktadır. Böylece H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den OH<sup>•</sup>'nin oluşmasını engellemektedir (Sen ve Chakraborty, 2011). Bu metabolize etme reaksiyonları sırasında GSH, hidrojen verici olarak hareket ettiğinden dolayı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve hidroperoksitler indirgenirken GSH okside olur (Reiter ve ark., 1995). Okside glutatyon, glutatyon disülfittir (GSSG). Glutatyon redüktaz (GR) enzimi varlığında okside glutatyon redükte glutatyon haline geri indirgenir. Bu indirgenme reaksiyonu esnasında GR elektron vericisi olarak NADPH'yi kullanır (Sen ve Chakraborty, 2011; Reiter ve ark., 1995). *Capsicum annuum* L. (biber), *Pisum sativum* (bezelye) ve *Lycopersicon esculentum* (domates) başta olmak üzere pek çok bitkide stres koşulları altında GPOD'un koruyucu bir rolü olduğu bulunmuştur (Dixit ve ark., 2001; Leisinger ve ark., 2001).

### 2.6.1.6. Glutasyon

Glutasyon, bitki dokularında sitozol, endoplazmik retikulum, vakuol, mitokondri, kloroplast, peroksizom gibi kısımlarda bulunmaktadır ve oksidatif strese karşı önemli rol oynamaktadır (Jiménez ve ark., 1998; Rausch ve Wachter, 2005). Normal şartlar altında sülfat taşınımının düzenlenmesi, sinyal iletimi, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ve stresle ilişkili genlerin ekspresyonu gibi birçok fizyolojik süreçte görev almaktadır. Aynı zamanda yapılan araştırmalara göre glutasyon bitkilerde hücre farklılaşması, hücre ölümü, patojen direnci ve enzimatik düzenleme gibi büyüme ve gelişme ile ilgili birçok olayda rol almaktadır (Khan ve Singh, 2008).

Glutasyonun sentezlenmesinde iki önemli aşama bulunmaktadır. Birinci aşama glutamin-sistein ligaz (GCL), glutamin ve sisteini bağlayarak  $\gamma$ -glutamilsisteini sentezlenmesidir. İkinci aşama ise glutasyon sentetaz (GSS), sentezlenen  $\gamma$ -glutamilsisteine glisini bağlayarak GSH molekülünü oluşturulmasıdır (Lagman ve ark., 2015).

Glutasyon, glutasyon peroksidaz (GPOD)'ı katalitik etkisiyle lipid peroksidlerini ve  $H_2O_2$ 'yi detoksifiye eder ya da tekli uyarılmış oksijen ( $^1O_2$ ) ve hidroksil radikali ( $OH^\bullet$ )'yi temizler. Ayrıca GSH plazma membranından aminoasit transportunu sağlamaktadır. Ayrıca bazı önemli antioksidanları yeniden oluşturmaktadır ve vitamin E ve vitamin C GSH tarafından düzenlenmektedir. Örneğin GSH direkt olarak vitamin E'nin tokoferol radikalini, dolaylı olarak da askorbatı semidehidroaskorbata indirgeyebilir (Sen ve Chakraborty, 2011).

### 2.6.1.7. Prolin

Ozmotik stresin giderilmesi ve böylece hücre turgorunda azalma olmadan bitkinin gelişmesini sürdürebilmesine 'ozmotik uyum' denir (Rains, 1972). Bir başka ifade ile ozmotik uyum, bitkilerin  $K^+$  ve  $Na^+$  gibi bazı inorganik iyonlar ya da gliserol, sukroz, prolin, betain gibi bazı karbohidrat kökenli maddeleri biriktirme yeteneği olarak tanımlanmaktadır (Hellebusi, 1976). Trikarboksilik asit döngüsünün (TCA döngüsü)

ara maddelerinden sentezlenen amino asitlerden biri olan prolin esansiyel olmayan aminoasit grubunda yer almaktadır.  $\alpha$ -ketoglutarattan bir dizi reaksiyon sonucu sentezlenir. Prolidin halkası içerdiği için amino grubu halka oluşumuna katılmaktadır ve bu nedenle iminoasit olarak da adlandırılmaktadır.

Stres koşulları altında hücredeki prolin sentezinin arttığı bilindiğinden, bazı araştırmacılar prolinin ozmoregülatör olarak görev yaptığını öne sürmektedirler (Jones ve Storey, 1978). Prolinin birikimi, prolinin glutamik asitten sentezlenmesi esnasında NADH ve  $H^+$  kullanıldığı için NADH ve asitliği azaltmaktadır. Bu durumda prolin birikimi bu olayın gerçekleşmesini sağlayan adaptif bir mekanizma olabilir (Venekamp ve ark., 1989). Prolin ayrıca enzimlerin korunmasında (Nikolopoulos ve Manetas, 1991; Laliberté ve Hellebust, 1989; Paleg ve ark., 1984), protein katlanmasının stabilizasyonunda (Low, 1985), protein sentezinde (Kandpal ve Rao, 1985), ve en önemlisi serbest radikallerin yakalanmasında (Smirnoff ve Cumbes, 1989; Hare ve Cress, 1997; Jain ve ark., 2001) rol oynamaktadır. Etkili bir singlet oksijen tutucusudur (AliaSaradhi ve ark., 2001) ve hücrel redoks potansiyelini düzenlemektedir (AliaSaradhi ve Mohanty, 1991). Prolin osmotik düzenleyici (Kishor ve ark., 2005), ve  $OH^{\bullet}$  radikalinin yakalayıcısı olarak (AliaSaradhi ve Mohanty, 1991; Kishor ve ark., 2005), DNA, protein ve zarlar gibi hücrel makromoleküller ile etkileşime girmekte ve bu moleküllerin fonksiyon ve yapılarını stabilize etmektedir (Kishor ve ark., 2005). Prolin miktarındaki artışın stres koşulları altında meydana gelen lipid peroksidasyonuna uyumsal bir cevap olabileceği bildirilmiştir (Fatma ve ark., 2007; Kumar ve ark., 2014). Prolin stres koşullarında serbest radikal üretimini azaltır (AliaSaradhi, 1993). Prolinin *in vitro* olarak ısı ve NaCl stresi kaynaklı enzim denatürasyonlarını azalttığı gösterilmiştir (Hamilton ve Heckathorn, 2001).

## **2.6.2. Eksojen antioksidanlar**

### **2.6.2.1. Tokoferoller**

Tokoferoller plastidlerde, kloroplastların tilakoid membranlarında ve plastoglobulinlerde bulunmaktadır (Blokhina ve ark., 2003). Tokoferoller sadece

fotosentetik organizmalar tarafından sentezlenmektedir. Bu nedenle sadece bitkilerin yeşil dokularında bulunur (Igamberdiev ve ark., 2004). Dört izomer içeren tokoferoller ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tokoferol), 2-metil-6-kromanol halkasında belirli bir sayı ve metil gruplarının pozisyonu ile karakterize edilmektedir.  $\alpha$ -Tokoferol, özellikle  $^1O_2$ ,  $OH^{\bullet}$  ve ayrıca çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucunda meydana gelen bazı lipid radikalleriyle doğrudan etkileşime girebildiği için tilakoid membranlarda diğer izomerlerine göre antioksidan etkisi daha yüksektir (Munné-Bosch ve Alegre, 2002).

### 2.6.2.2. Karotenoidler

Karotenoidler, hem fotosentetik (siyanobakteriler, bitkiler ve algler) hem de fotosentetik olmayan (bazı bakteriler, mantarlar ve omurgasızlar) canlılarda ve bitki dokularının plastidlerinde bulunan lipofilik antioksidan grubunda yer almaktadır (Nisar ve ark., 2015). Karotenoidler, zincir reaksiyonlarını sonlandırmak için lipid peroksidasyon ürünleri ile reaksiyona girerek,  $^1O_2$ 'yi detoksifiye ederek,  $^3Chl^*$  (triplet klorofil) ve  $Chl^*$  (tekli uyarılmış klorofil) ile reaksiyona girerek ve ksantofil döngüsü yoluyla fazla uyarılma enerjisini dağıtarak fotosentetik aktiviteyi korumaktadır (Fini ve ark., 2011).

### 2.6.2.3. Askorbik asit (C vitamini)

Askorbik asit (C vitamini), taze meyvelerde, özellikle de portakal, limon, mandalina ve yeşil yapraklı sebzelerde bulunan antioksidan bileşiktir. Askorbat içeriği meristematik dokularda (Loewus ve Loewus, 1987; Smirnoff ve Pallanca, 1996), çiçekler ve genç meyvelerde (Alhag Dow ve ark., 2007; Hancock ve ark., 2007), kök uçlarında (Arrigoni, 1994) ve yumru köklerde (Tedone ve ark., 2004) yüksek oranda bulunmaktadır. Kimyasal olarak, en sık rastlanan vitamin L-askorbik asit formu olsa da D-arabo-askorbik asit ve L-arabo-askorbik asit izomerik formları da mevcuttur. Askorbik asit, askorbat peroksidaz enziminin katalize ettiği reaksiyonlarda elektron vericisi olarak rol oynayarak bitkileri oksidatif hasardan korumaktadır.

#### 2.6.2.4. Fenolik bileşikler

Fenolik bileşikler yaygın olarak yapraklarda, çiçeklerde ve polen tanelerinde bulunan antioksidan bileşikler grubunda yer almaktadır. Fenolik bileşikler, yapısal olarak flavanoidler (P vitamini), hidrosinamik asit (HCA), taninler ve antosiyaninler olmak üzere dört sınıfa ayrılmaktadır. Bitkilerde üreme ve polenlerin çimlenmesinde, bitki patojenlerine karşı savunmada, çiçek, meyve ve tohumlarda pigmentasyon sağlamada çeşitli rollere sahiptir. Fotosentetik sistemde kloroplastik zarın dış tabakasında tekli oksijen radikali ( $^1O_2$ )'nin detoksifikasyonunda görev alarak oluşacak hasarı azaltmaktadır (Fini ve ark., 2011; Agati ve ark., 2012).

#### 2.7. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada metallsiz ve bakır fitalosiyenin türevlerinin farklı konsantrasyonlarına 7 gün boyunca maruz bırakılan *Chlorella vulgaris* alginin biyokütle, klorofil-*a*, malondialdehit (MDA), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) prolin miktarlarındaki ve süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APOD), glutasyon redüktaz (GR) gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerindeki değişim incelenmiştir.

Böylece model organizma olarak seçilen *C. vulgaris* algi ile farklı fitalosiyenin türevlerinin sucul ekosistem üzerinde olası etkilerinin belirlenmesi için yapılan ekotoksikolojik çalışmalara katkıda bulunulacağı düşünülmektedir.



## BÖLÜM 3. MATERYAL VE METOD

### 3.1. Çalışma Materyali

Çukurova Üniversitesi'nden (Adana, Türkiye) temin edilen *Chlorella vulgaris* algi aksenik koşullar altında Sakarya Üniversitesi Biyoloji Bölümü Bitki Fizyolojisi ve Alg Ekolojisi laboratuvarında kültüre alınmıştır.

### 3.2. Kullanılan Cihazlar

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

Cihaz	İşlev	Marka
Buzdolabı	Numune ve çözeltilerin saklanması	Beko
Etüv	Kurutma ve sterilizasyon	Nüve
Hassas terazi	Tartım	Schimadzu SLB 320
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Çözelti hazırlanması	Dragon med M 10068
İklimlendirme kabini	Alg kültürü	Dev/Pet
Soğutuculu mikrosantrifüj	Süpernatant eldesi	Centrion scientific K3
Soğutuculu santrifüj	Pelet eldesi	Nüve
Spektrofotometre	Absorbans ölçümü	Shimadzu mini UV 1240
Mikropipet	Enzim analizleri	Nichipet (100- 1000 µL)
Mikropipet	Enzim analizleri	Eppendorf (10-100 µL)
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

*C. vulgaris* suşu BG11 ortamında (Rippka ve ark., 1979) aksenik şartlarda yetiştirilmiştir (Tablo 3.2., Tablo 3.3. ve Tablo 3.4.). 250 mL'lik erlenlerde steril olarak hazırlanmış 180 mL'lik kültür besiyerine 20 mL alg kültürü inokule edilmiş ve iklimlendirme kabininde 25°C'lik sıcaklıkta, full spektrum lambaların kullanıldığı 5000 lüks ışık şiddetinde (12 saat aydınlık, 12 saat karanlık) olacak şekilde günde 3 defa çalkalanmak şartı ile 10 gün bekleme bırakılmıştır. Bu süre sonunda 1 µg mL<sup>-1</sup> olacak şekilde kültürler tazelenmiştir.

Tablo 3.2. BG11 ortamı içeriği (Rippka ve ark., 1979)

Bileşik	Miktar
NaNO <sub>3</sub>	1,5 g L <sup>-1</sup>
NaHCO <sub>3</sub>	.1 g L <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1M)	.0,2 mL L <sup>-1</sup>
BG11 konsantre stok solüsyon	.10 mL L <sup>-1</sup>

Tablo 3.3. BG11 konsantre stok solüsyonu içeriği

Bileşik	Miktar
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	7,5 g L <sup>-1</sup>
Sitrik asit	0,6 g L <sup>-1</sup>
EDTA-Na <sub>2</sub>	0,1 g L <sup>-1</sup>
A5 stok solüsyonu	100 mL <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	3,6 g L <sup>-1</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>5</sub> [Fe(C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>2</sub> ]	0,6 g L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2 g L <sup>-1</sup>

Tablo 3.4. A5 stok solüsyonu içeriği

Bileşik	Miktar
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86 g L <sup>-1</sup>
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,81 g L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,31 g L <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,22 mL L <sup>-1</sup>
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,05 g L <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,08 g L <sup>-1</sup>

### 3.3.2. Uygulanan fitalosiyenin konsantrasyonları

Hazırlanan kültür ortamına eklenecek fitalosiyeninler olan 1(4),8(11),15(18),22(25)-Tetrakis-(sodyum 2-merkaptioethansülfonat)- metalsiz fitalosiyenin ve 1(4),8(11),15(18),22(25)-Tetrakis-(sodyum 2-merkaptioethansülfonat) bakır (II) fitalosiyenin için ayrı ayrı stok solüsyonları hazırlanmıştır. Farklı fitalosiyenin konsantrasyonları ayrı ayrı erlenlerde bulunan ve klorofil- *a* değeri 1 µg mL<sup>-1</sup> olan taze *C. vulgaris* kültürlerine eklenmiştir. Bu kültürlere 1(4),8(11),15(18),22(25)-Tetrakis-(sodyum 2-merkaptioethansülfonat)-metalsiz fitalosiyenin bileşiği için kullanılacak konsantrasyonlar 0.5, 1, 2, 4, 6 ve 8 ppb olarak 1(4),8(11),15(18),22(25)-Tetrakis-(sodyum 2-merkaptioethansülfonat) bakır (II) fitalosiyenin bileşiği için kullanılacak konsantrasyonlar 0.5, 1, 2, 4, 6 ve 8 ppb olarak belirlenmiştir.

Bu konsantrasyonlar kullanılan kimyasalın en etkili olduğu konsantrasyonun yarısını ifade eden EC50 değerinin altında belirlenmiş olup Tablo 3.5.'de verilmiştir.

1(4),8(11),15(18),22(25)- Tetrakis-(sodyum 2- merkaptioethansülfonat)-metalsiz fitalosiyenin	1(4),8(11),15(18),22(25)- Tetrakis-(sodyum 2- merkaptioethansülfonat) bakır (II) fitalosiyenin
0.5 ppb	0.5 ppb
1 ppb	1 ppb
2 ppb	2 ppb
4 ppb	4 ppb
6 ppb	6 ppb
8 ppb	8 ppb

### 3.3.3. Deney ortamı ve düzeneği

Fitalosiyenin çözeltileri ilave edilmeden önce aktifleştirme için 200 mL *C. vulgaris* kültürü on gün boyunca iklimlendirme dolabında daha önce belirtilen koşullarda yetiştirilmiştir. Bu sürenin sonunda 50 mL kültür hazırlamak için klorofil-*a* miktarı 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  olacak şekilde yenilenmiştir.

Belirtilen konsantrasyonlarda fitalosiyenin çözeltileri hazırlanmış ve aktifleşmiş kültürlere uygulanmıştır. Deneyler kontrol dahil üç tekrarlı yapılmıştır. Bu süre zarfında *C. vulgaris*'in fotosentetik pigment (klorofil-*a*) ve optik yoğunluk (OD) miktarlarındaki değişim spektrofotometrik olarak her gün ölçülerek kayıt edilmiştir. 7. gün sonunda kültürler homojenizasyon işlemine tabii tutulmuş, ve elde edilen bu homojenatlar  $-20^{\circ}\text{C}$ ' de saklanmıştır.

## 3.4. Ölçüm ve Analizler

### 3.4.1. Optik yoğunluğun (OD) ve büyüme oranının belirlenmesi

Alglerin büyüme oranını hesaplamak için OD 750 değeri spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir. Kör olarak *C. vulgaris* için BG11 kullanılmıştır. *C. vulgaris* alginde 100 mL alg kültürü 900 mL BG11 medyumu ile seyreltilmiştir (1/10 oranında). OD 750 değerindeki değişim her gün ölçüm yapılarak 7 gün boyunca takip edilmiştir. Böylelikle fitalosiyenin etkisine maruz bırakılan *C. vulgaris*'in büyüme oranları belirlenmiştir (García-Domínguez ve Florencio, 1997).

### 3.4.2. Fotosentetik pigment analizi (Klorofil-*a*)

Klorofil-*a* ölçümü için 1/10 oranında saf metanol ile ekstraksiyon yapılmıştır (100  $\mu\text{L}$  kültür, 900  $\mu\text{L}$  saf metanol). Bunun için 1 dk. vortekslenen örnekler 2 dk. 13.800 rpm ve  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de mikrosantrifüj ile santrifüjlenmiştir. Daha sonra spektrofotometrede 665

nm dalga boyunda absorbanlar belirlenmiştir. Kör çözeltisi olarak saf metanol kullanılmıştır (Mackinney, 1941). Klorofil-*a* miktarı Denklem 3.1'e göre hesaplanmıştır:

$$\text{Klorofil-}a \text{ mL}^{-1} = A_{665} \times 13.43 \times 10 \quad (3.1)$$

### 3.4.3. Toplam çözünür protein analizi

Toplam protein aktivitesinin belirlenmesi için Bradford (1976)'un 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 potasyum-fosfat (pH=7.0), %2'lik PVP (polivinilpirolidon) ve 1 mM sodyum EDTA (Na<sub>2</sub>EDTA) ile hazırlanmıştır. APOD analizi için ise 50 mM Tris-HCl (pH=7.2), %2'lik PVP, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA 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 vortekleme 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 yararlanılarak bulunmuştur.

### 3.4.4. Süperoksit dismutaz aktivitesi (SOD)

Toplam SOD aktivitesi için Beyer ve Fridovich (1987)'in metodu kullanılmıştır. 2 mL hacimde alınan 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 (Na<sub>2</sub>EDTA) içeren çözelti ile ekstrakte edilmiştir. 14.000 rpm ve +4°C'de 20 dk. santrifüjden sonra süpernatantlar alınmıştır. 100 mM potasyum-fosfat tamponu (pH=7.8), 9.9x10<sup>-3</sup> M metionin, 5.7x10<sup>-5</sup> 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 ilavesi

yapılmıştır. Tüpler 15 dk. boyunca  $375 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  şiddetinde ışığa maruz bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda  $560 \text{ nm}$ 'de spektrofotometrede absorbans değerleri okunmuştur. Toplam SOD aktivitesi daha önce hazırlanmış olan standart grafik kullanılarak bulunmuştur (U/mg protein).

#### **3.4.5. Askorbat peroksidaz aktivitesi (APOD)**

Toplam APOD aktivitesi için Wang ve ark. (1991)'nin metodu kullanılmıştır. Alınan 2 mL'lik kültürler 15000 rpm ve  $+4^\circ\text{C}$ 'de 20 dk. santrifüjlendikten sonra elde edilen pellet 50 mM tris-HCl (pH=7.2), %2'lik PVP, 1 mM sodyum EDTA ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) ve 2 mM askorbat içeren çözelti ile ekstrakte edilmiştir. 14.000 rpm ve  $+4^\circ\text{C}$ 'de 20 dk. santrifüjden sonra süpernatantlar alınmıştır. 100  $\mu\text{g}$  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  $\mu\text{L}$  olacak şekilde 10 mM hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ilavesiyle başlatılmıştır. Absorbans değerleri spektrofotometrede  $290 \text{ nm}$ '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. Glutasyon redüktaz aktivitesi (GR)**

Toplam GR aktivitesi için Sgherri ve ark. (1994)'nin yöntemine göre belirlenmiştir. Alınan 2 mL'lik kültürler 15000 rpm ve  $+4^\circ\text{C}$ 'de 20 dk. santrifüjlendikten sonra elde edilen pellet, 100 mM potasyum-fosfat (pH=7.0), %2'lik PVP (polivinilpirolidon) ve 1 mM sodyum EDTA ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) içeren çözelti ile ekstrakte edilmiştir. 14.000 rpm ve  $+4^\circ\text{C}$ 'de 20 dk. santrifüjden sonra süpernatantlar alınmıştır. 100  $\mu\text{g}$  protein içeren süpernatant, 100 mM potasyum-fosfat tamponu (pH=7.8), 2 mM sodyum EDTA ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ), 0.5 mM okside glutasyon (GSSG) içerisine eklenmiştir. Reaksiyon, son hacim 1000  $\mu\text{L}$  olacak şekilde, 0.2 mM nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) ilavesiyle başlatılmıştır. Absorbans değerleri spektrofotometrede  $320 \text{ nm}$ '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) miktarı**

Malondialdehit miktarının belirlenmesi Heath ve Packer (1968)'in yöntemine 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% trikloroasetik asit (TCA) (4°C) ile homojenize edilmiş, sonra 4100 rpm'de 10 dk. santrifüj 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 tiyobarbitürİKasit) 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. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının belirlenmesi Heath ve Packer (1968)'in yöntemine 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. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı daha önce hazırlanmış olan standart grafik yardımıyla hesaplanmıştır.

#### **3.4.9. Prolin miktarı**

Prolin miktarının belirlenmesi için Weimberg (1987)'in metodu modifiye edilmiştir. 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 ( $\mu\text{mol/g}$  kuru ağırlık) asit-ninhidrin yöntemine göre 520 nm dalga boyunda yapılan okumalara göre spektrofotometrik olarak bulunmuştur (Bates ve ark., 1973).

#### **3.4.10. İstatistiksel analizler**

İstatistikler için, verilere SPSS 20.0 paket programında yer alan tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapılmış ve değişkenler arasındaki farklılığın belirlenmesi için LSD testi uygulanmıştır. Anlamlı Önemli Fark (AÖF) olan her bir bağımsız değişken için uygulama ve çeşitler arasındaki farkın önem kontrolü %5 düzeyinde hesaplanmıştır.

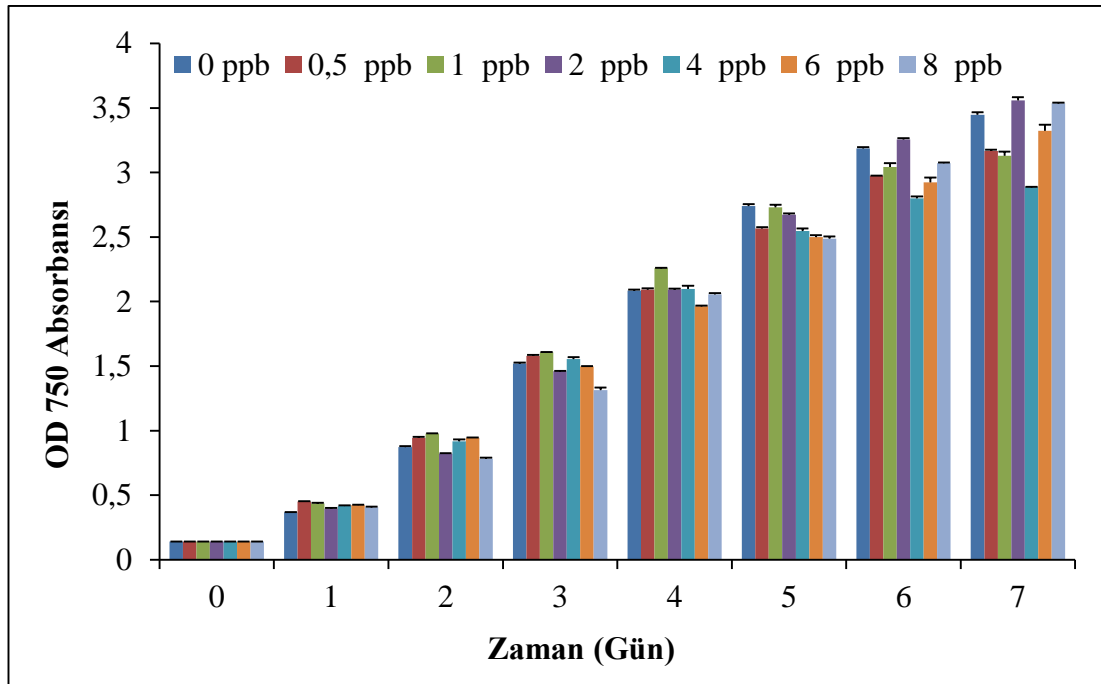


## BÖLÜM 4. BULGULAR

### 4.1. Optik Yoğunluk (OD)

*C. vulgaris* 'e uygulanan farklı konsantrasyonlardaki metallsiz fitalosiyenin bileşiminin OD 750 absorbandsı üzerine etkisi Şekil 4.1.'de verilmiştir.

Birinci günden yedinci güne kadar günler kendi aralarında kıyaslandığında, metallsiz fitalosiyenin etkisine maruz bırakılan *C. vulgaris* kültürlerinde 1. gün tüm konsantrasyonlarda (0.5, 1, 2, 4, 6 ve 8 ppb); 2. gün 0.5, 1, 4 ve 6 ppb konsantrasyonda; 3. gün 0.5, 1 ve 4 ppb konsantrasyonda; 4. gün 0.5, 1, 2 ve 4 ppb konsantrasyonda; 6. günde 2 ppb konsantrasyonda; 7. günde 2 ve 8 ppb konsantrasyonlarda kontrole göre OD 750 absorbandsında istatistiksel olarak anlamlı bir artma olmuştur ( $p<0.05$ ). 2. gün 2 ve 8 ppb konsantrasyonlarda; 3. gün 2, 6 ve 8 ppb konsantrasyonda; 4. gün 6 ve 8 ppb konsantrasyonlarda; 5. gün tüm konsantrasyonlarda (0.5, 1, 2, 4, 6 ve 8 ppb); 6. gün 0.5, 1, 4, 6 ve 8 ppb konsantrasyonlarda; 7. gün 0.5, 1, 4 ve 6 ppb konsantrasyonlarda kontrole göre OD 750 absorbandsında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olmuştur ( $p<0.05$ ).

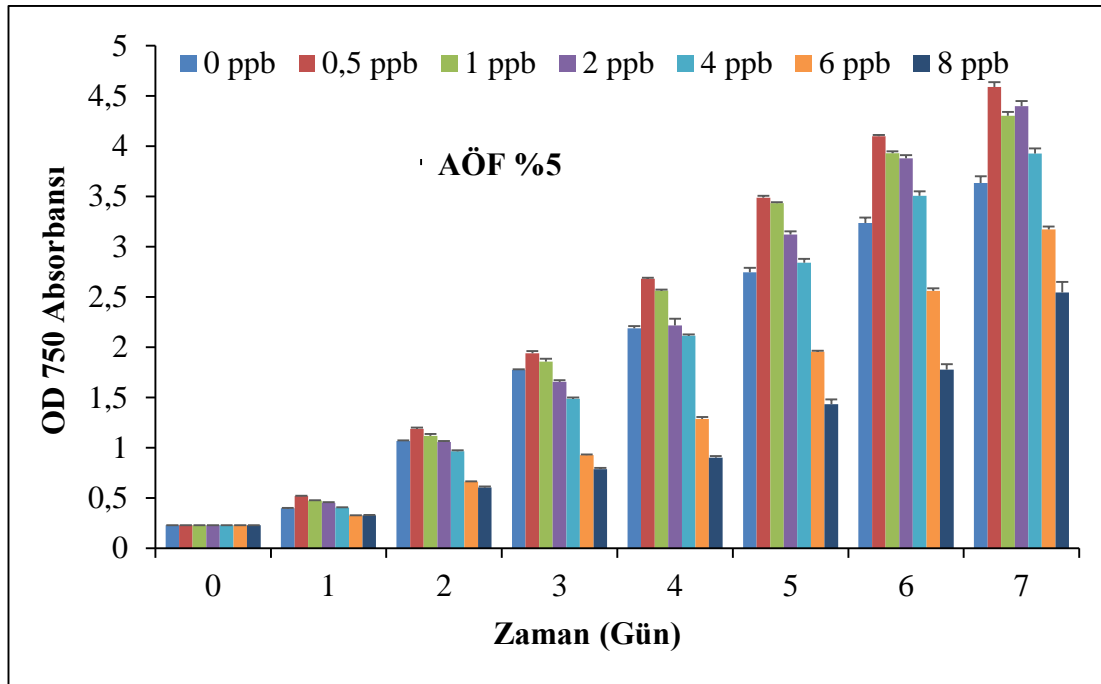


Şekil 4.1. *C. vulgaris*'in metalsiz fitalosiyenin konsantrasyonlarına bağlı OD 750 absorbansındaki 7 günlük değişim

*C. vulgaris*'e uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı fitalosiyenin bileşiminin OD 750 absorbansı üzerine etkisi Şekil 4.2.'de verilmiştir.

Birinci günden yedinci güne kadar günler kendi aralarında kıyaslandığında, bakırlı fitalosiyenin etkisine maruz bırakılan *C. vulgaris* kültürlerinde 1. gün 0.5 ve 1 ppb konsantrasyonlarda; 2. gün 0.5 ppb konsantrasyonda; 3. ve 4. günlerde 0.5 ve 1 ppb konsantrasyonlarda; 5., 6. ve 7. günlerde 0.5, 1, 2 ve 4 ppb konsantrasyonda kontrole göre OD 750 absorbansında istatistiksel olarak anlamlı bir artma olmuştur ( $p < 0.05$ ).

1. gün 6 ve 8 ppb konsantrasyonlarda; 2. gün 4, 6 ve 8 ppb konsantrasyonlarda; 3. gün 2, 4, 6 ve 8 ppb konsantrasyonlarda; 4. gün 4, 6 ve 8 ppb konsantrasyonlarda; 5., 6. ve 7. günlerde 6 ve 8 ppb kontrole göre OD 750 absorbansında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olmuştur ( $p < 0.05$ ).

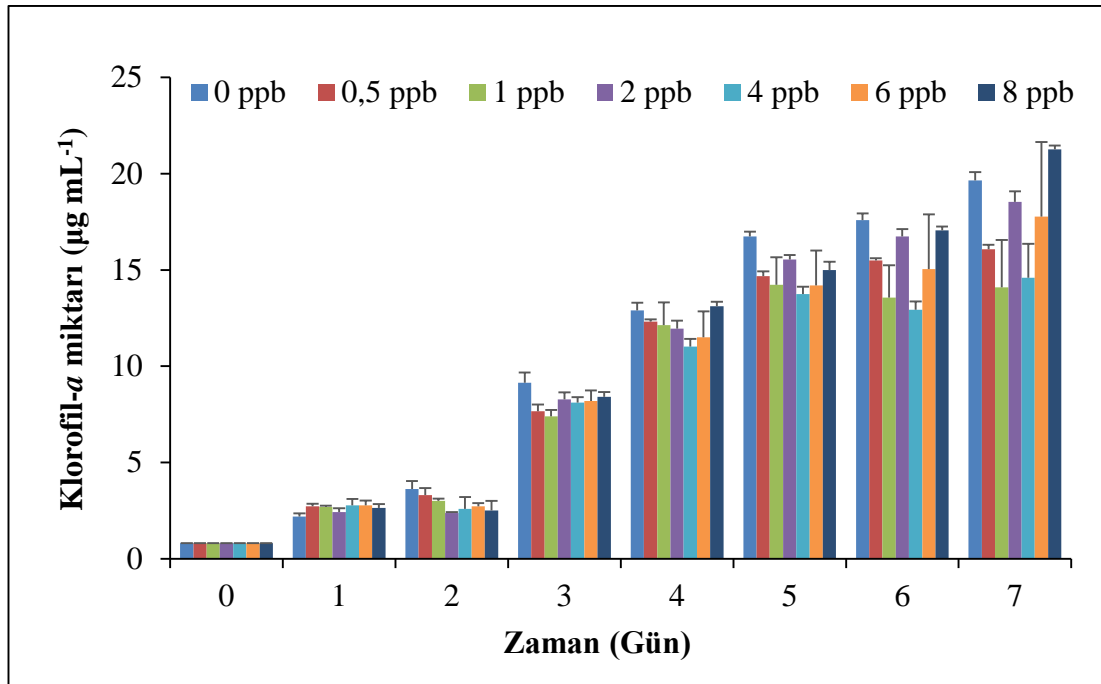


Şekil 4.2. *C. vulgaris*'in bakırlı fitalosiyenin konsantrasyonlarına bağlı OD 750 absorbansındaki 7 günlük değişimi

#### 4.2. Fotosentetik Pigment Analizi (Klorofil-a)

*C. vulgaris*'e uygulanan farklı konsantrasyonlardaki metallsiz fitalosiyenin bileşiminin klorofil-a üzerine etkisi Şekil 4.3.'de verilmiştir.

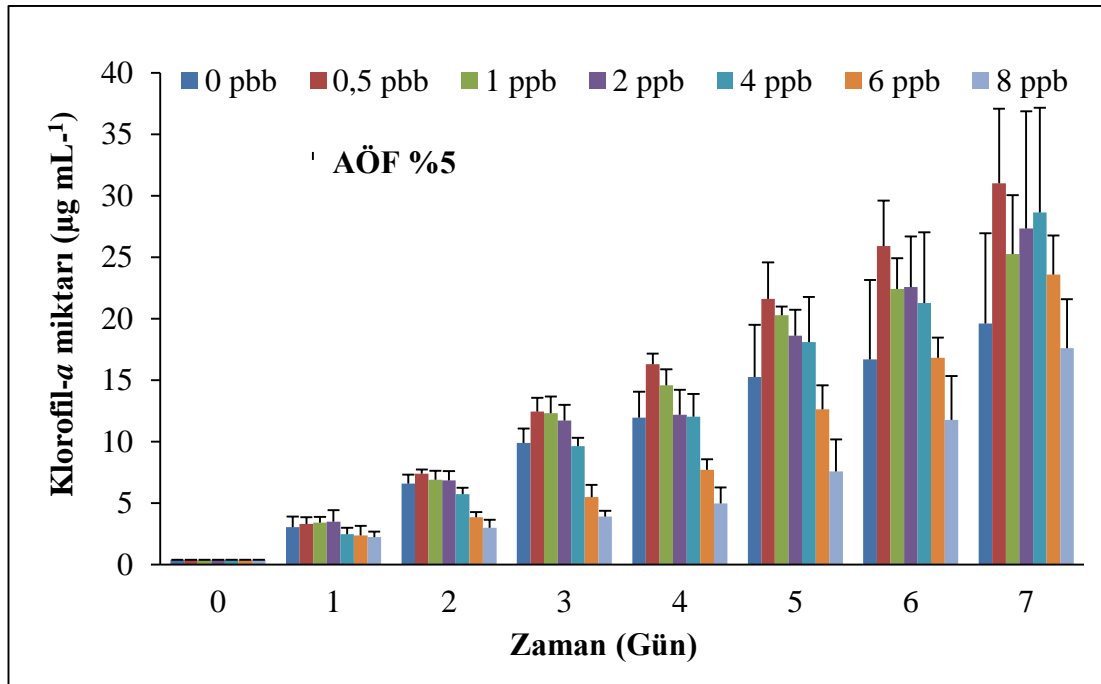
Birinci günden yedinci güne kadar günler kendi aralarında kıyaslandığında, metallsiz fitalosiyenin etkisine maruz bırakılan *C. vulgaris* kültürlerinde 1. gün tüm konsantrasyonlarda (0.5, 1, 2, 4, 6 ve 8 ppb); 4. ve 7. günlerde 8 ppb konsantrasyonda kontrole göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür ( $p < 0.05$ ). 2. ve 3. günlerde konsantrasyonlar kontrole göre kıyaslandığında klorofil-a miktarında tüm konsantrasyonlarda (0.5, 1, 2, 4, 6 ve 8 ppb); 4. gün 0.5, 1, 2, 4 ve 6 ppb konsantrasyonlarda; 5. ve 6. günlerde tüm konsantrasyonlarda (0.5, 1, 2, 4, 6 ve 8 ppb); 7. gün 0.5, 1, 2, 4 ve 6 ppb konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür ( $p < 0.05$ ).



Şekil 4.3. *C. vulgaris*'in metalsiz fitalosiyenin konsantrasyonlarına bağlı klorofil-*a* miktarındaki 7 günlük değişimi

*C. vulgaris*'e uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı fitalosiyenin bileşiğinin klorofil-*a* üzerine etkisi Şekil 4.4.'de verilmiştir.

Birinci günden yedinci güne kadar günler kendi aralarında kıyaslandığında, bakırlı fitalosiyenin etkisine maruz bırakılan *C. vulgaris* kültürlerinde 1., 2. ve 3. günlerde konsantrasyonlar kontrole göre kıyaslandığında klorofil-*a* miktarında 0.5, 1 ve 2 ppb konsantrasyonlarda anlamlı bir artma vardır ( $p < 0.05$ ). 4. ve 5. günlerde konsantrasyonlar kontrole göre kıyaslandığında klorofil-*a* miktarında 0.5, 1, 2 ve 4 ppb konsantrasyonlarda; 6. ve 7. günlerde 0.5, 1, 2, 4 ve 6 ppb konsantrasyonlar kontrole göre kıyaslandığında klorofil-*a* miktarında anlamlı bir artma vardır ( $p < 0.05$ ). 1., 2. ve 3. günlerde 4, 6 ve 8 ppb konsantrasyonlarda; 4. ve 5. günlerde 6 ve 8 ppb konsantrasyonlarda; 6. ve 7. günlerde ise 8 ppb konsantrasyonda klorofil-*a* miktarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı azalma olmuştur ( $p < 0.05$ ).

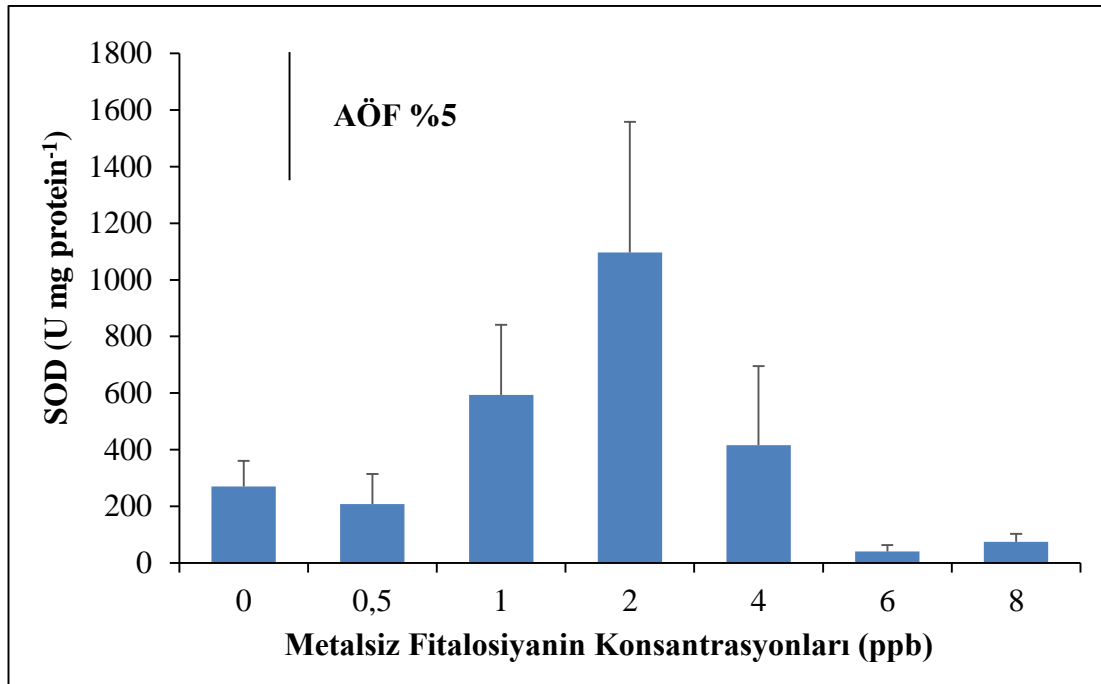


Şekil 4.4. *C. vulgaris*'in bakırlı fitalosiyanın konsantrasyonlarına bağlı klorofil-*a* miktarındaki 7 günlük değişimi

### 4.3. Toplam Süperoksit Dismutaz Aktivitesi

*C. vulgaris*'e uygulanan farklı konsantrasyonlardaki metallsiz fitalosiyanın bileşiminin toplam süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi üzerine etkisi Şekil 4.5.'de verilmiştir.

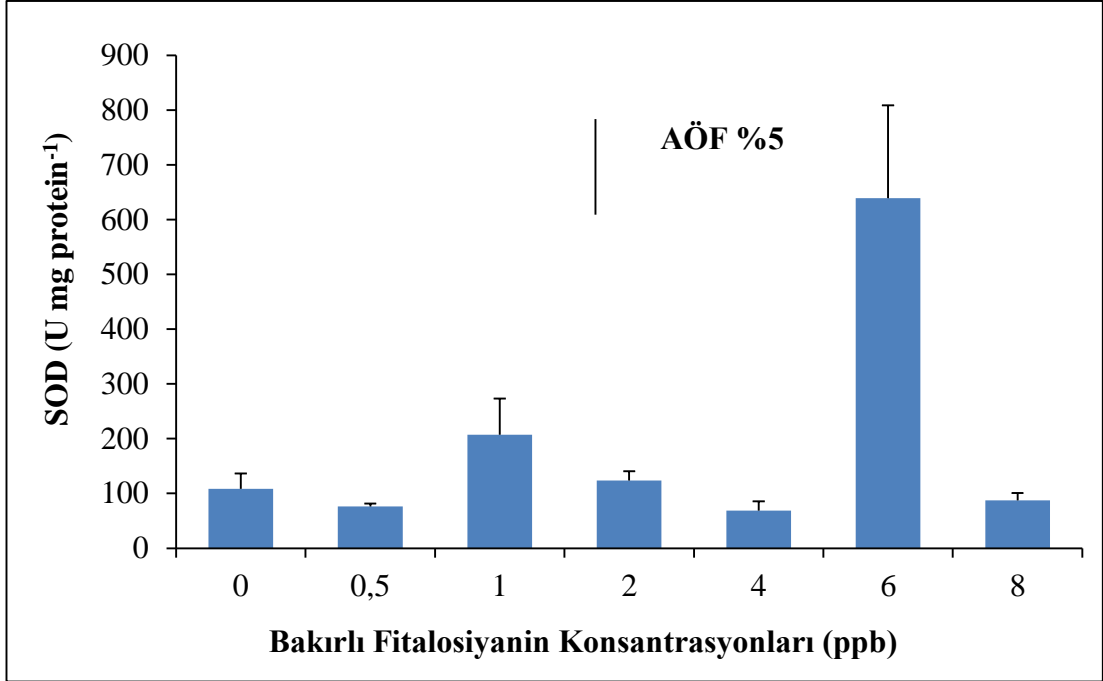
0.5, 1, 4, 6 ve 8 ppb konsantrasyonlarında metallsiz fitalosiyanın etkisine maruz bırakılan *C. vulgaris* kültürlerinin toplam SOD aktivitesi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermemiştir ( $p > 0.05$ ). 2 ppb konsantrasyonda ise toplam SOD aktivitesi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artma göstermiştir ( $p < 0.05$ ). Toplam SOD aktivitesinin en yüksek ( $1096.88 \text{ U mg protein}^{-1}$ ) ve en düşük ( $40.42 \text{ U mg protein}^{-1}$ ) olduğu değerler sırasıyla 2 ppb ve 6 ppb bakırlı fitalosiyanın konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.



Şekil 4.5. *C. vulgaris* algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki metalsiz fitalosiyenin türevine bağlı olarak toplam SOD aktivitesinde görülen değişim

*C. vulgaris*'e uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı fitalosiyenin bileşiğinin SOD aktivitesi üzerine etkisi Şekil 4.6.'da verilmiştir.

6 ppb bakırlı fitalosiyenin konsantrasyonunda toplam SOD aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı artma göstermiştir ( $p < 0.05$ ). 0.5, 1, 2, 4 ve 8 ppb konsantrasyonlarda ise bakırlı fitalosiyenin etkisine maruz bırakılan *C. vulgaris* kültürlerinin toplam SOD aktivitesi kontrole göre istatistiksel olarak değişim göstermemiştir ( $p > 0.05$ ). Toplam SOD aktivitesinin en yüksek ( $639.02 \text{ U mg protein}^{-1}$ ) ve en düşük ( $68.92 \text{ U mg protein}^{-1}$ ) olduğu değerler sırasıyla 6 ppb ve 4 ppb bakırlı fitalosiyenin konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.

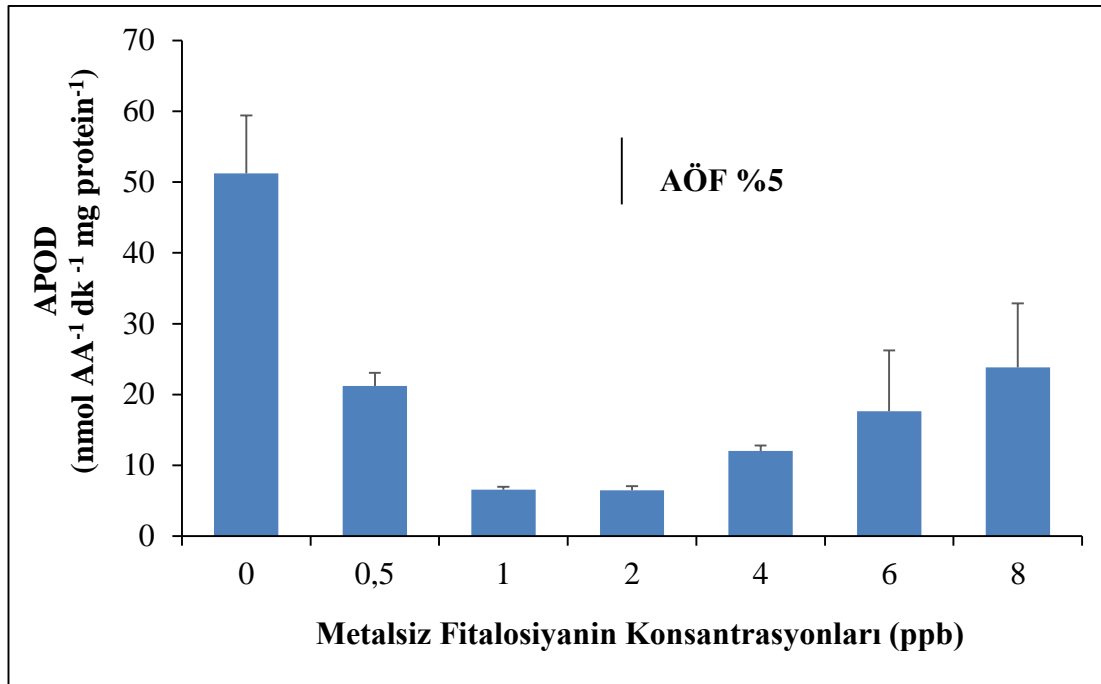


Şekil 4.6. *C. vulgaris* algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı fitalosiyenin türevine bağlı olarak toplam SOD aktivitesinde görülen değişim

#### 4.4. Toplam Askorbat Peroksidaz Aktivitesi

*C. vulgaris*'e uygulanan farklı konsantrasyonlardaki metallsiz fitalosiyenin bileşiğinin toplam askorbat peroksidaz (APOD) aktivitesi üzerine etkisi Şekil 4.7.'de verilmiştir.

0,5, 1, 2, 4, 6 ve 8 ppb konsantrasyonlarında metallsiz fitalosiyenin etkisine maruz bırakılan *C. vulgaris* kültürlerinin toplam APOD aktivitesi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir ( $p < 0.05$ ). Toplam APOD aktivitesinin en yüksek ( $23.8 \text{ nmol AA}^{-1} \text{ dak}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ ) ve en düşük ( $6.47 \text{ nmol AA}^{-1} \text{ dak}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ ) olduğu değerler sırasıyla 8 ppb ve 2 ppb konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.

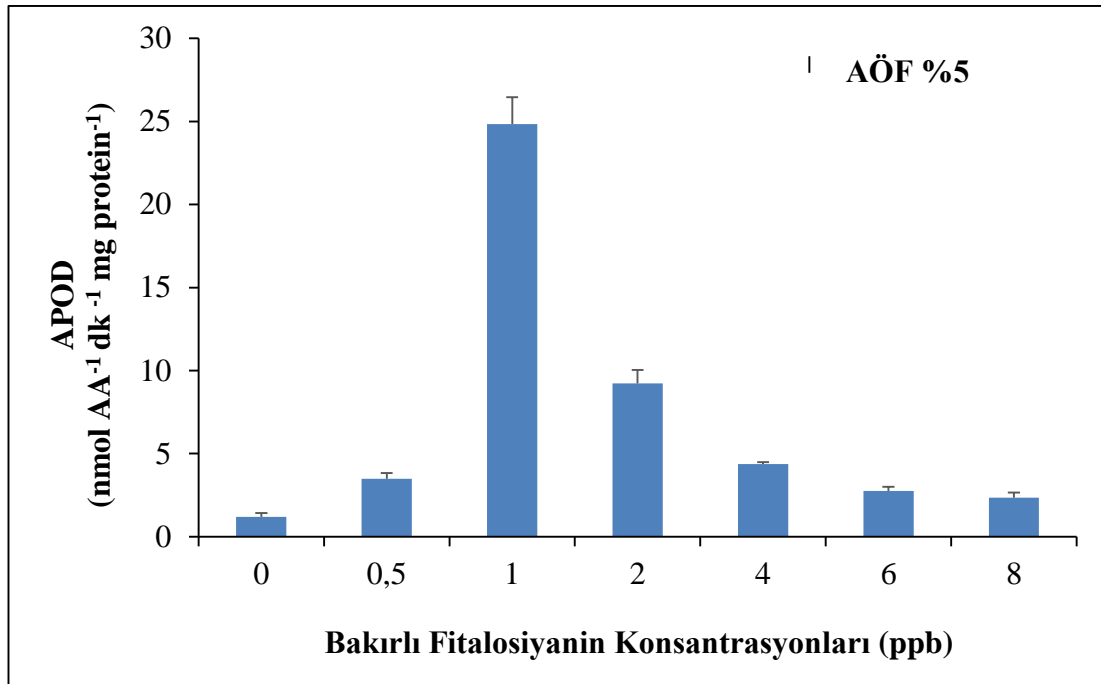


Şekil 4.7. *C. vulgaris* algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki metalsiz fitalosiyenin türevine bağlı olarak toplam APOD aktivitesinde görülen değişim

*C. vulgaris*'e uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı fitalosiyenin bileşiğinin toplam APOD aktivitesi üzerine etkisi Şekil 4.8.'de verilmiştir.

0.5, 1, 2, 4, 6 ve 8 ppb konsantrasyonlarında bakırlı fitalosiyenin etkisine maruz bırakılan *C. vulgaris* kültürlerinin toplam APOD aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı artma göstermiştir ( $p < 0.05$ ). Toplam APOD aktivitesinin en yüksek ( $24.8 \text{ nmol AA}^{-1} \text{ dak}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ ) ve en düşük ( $2.35 \text{ nmol AA}^{-1} \text{ dak}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ ) olduğu değerler sırasıyla 1 ppb ve 8 ppb konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.



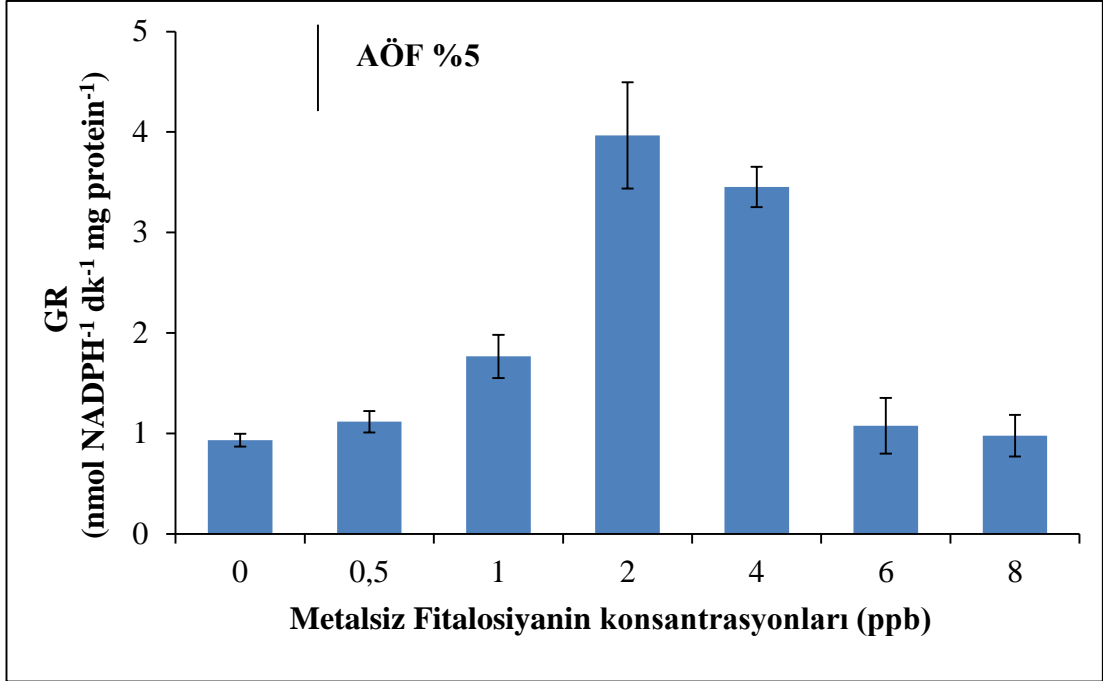


Şekil 4.8. *C. vulgaris* algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı fitalosiyani türevine bağlı olarak toplam APOD aktivitesinde görülen değişim

#### 4.5. Toplam Glutasyon Redüktaz Aktivitesi

*C. vulgaris*'e uygulanan farklı konsantrasyonlardaki metallsiz fitalosiyani bileşiminin toplam glutasyon redüktaz (GR) aktivitesi üzerine etkisi Şekil 4.9.'da verilmiştir.

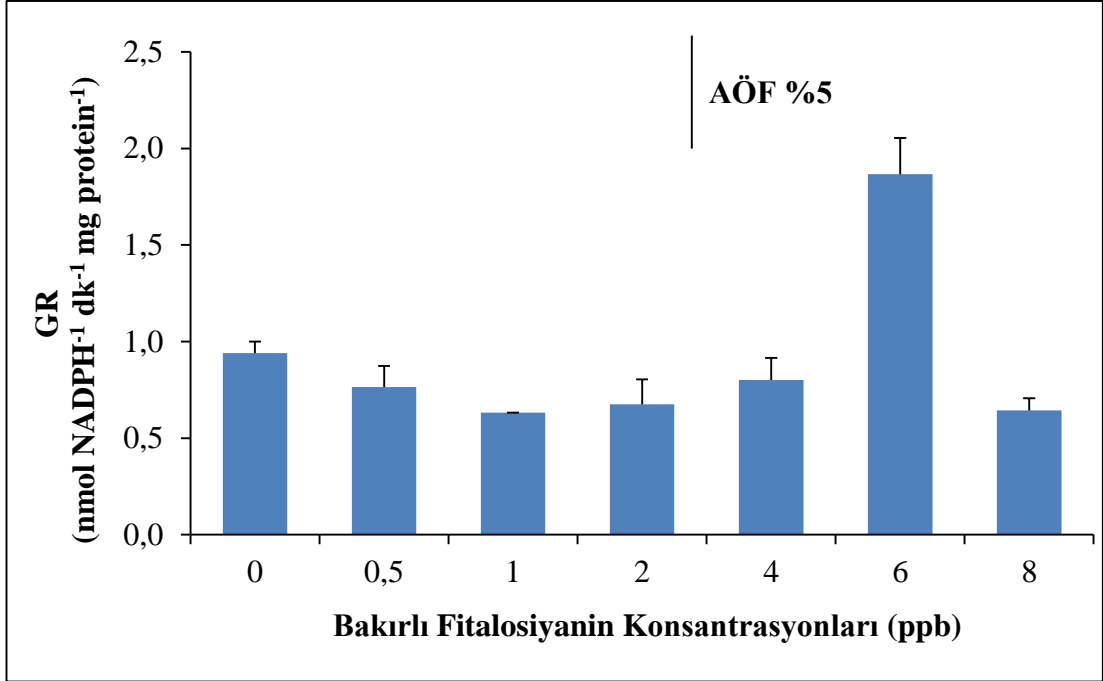
1, 2 ve 4 ppb konsantrasyonlarında metallsiz fitalosiyani etkisine maruz bırakılan *C. vulgaris* kültürlerinin toplam GR aktivitesi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artma göstermiştir ( $p < 0.05$ ). 0.5, 6 ve 8 ppb konsantrasyonlarında metallsiz fitalosiyani bileşiminin etkisine maruz bırakılan *C. vulgaris* kültürlerinin toplam GR aktivitesi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermemiştir ( $p > 0.05$ ). Toplam GR aktivitesinin en yüksek ( $3.9 \text{ nmol NADPH}^{-1} \text{ dk}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ ) ve en düşük ( $0.97 \text{ nmol NADPH}^{-1} \text{ dk}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ ) olduğu değerler sırasıyla 2 ppb ve 8 ppb bakırlı fitalosiyani konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.



Şekil 4.9. *C. vulgaris* algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki metalsiz fitalosiyenin türevine bağlı olarak toplam GR aktivitesinde görülen değişim

*C. vulgaris*'e uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı fitalosiyenin bileşiğinin toplam GR aktivitesi üzerine etkisi Şekil 4.10.'da verilmiştir.

6 ppb konsantrasyonlarında bakırlı fitalosiyenin etkisine maruz bırakılan *C. vulgaris* kültürlerinin konsantrasyonunda toplam GR aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı artma göstermiştir ( $p < 0.05$ ). 0.5, 1, 2, 4 ve 8 ppb konsantrasyonlarda ise bakırlı fitalosiyenin etkisine maruz bırakılan *C. vulgaris* kültürlerinin toplam GR aktivitesi kontrole göre istatistiksel olarak değişim göstermemiştir ( $p > 0.05$ ). Toplam GR aktivitesinin en yüksek ( $1.87 \text{ nmol NADPH}^{-1} \text{ dk}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ ) ve en düşük ( $0.6 \text{ nmol NADPH}^{-1} \text{ dk}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ ) olduğu değerler sırasıyla 6 ppb ve 1 ppb bakırlı fitalosiyenin konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.

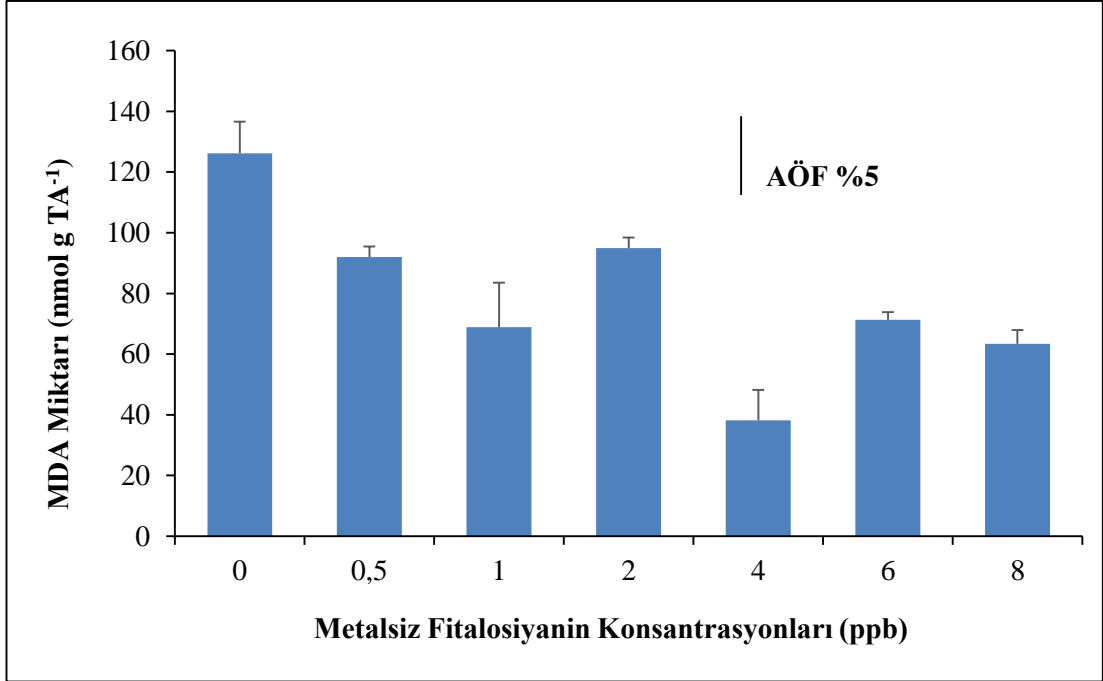


Şekil 4.10. *C. vulgaris* algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı fitalosiyenin türevine bağlı olarak toplam GR aktivitesinde görülen değişim

#### 4.6. Malondialdehit (MDA) miktarı

*C. vulgaris*'e uygulanan farklı konsantrasyonlardaki metallsiz fitalosiyenin bileşiğinin malondialdehit (MDA) miktarı üzerine etkisi Şekil 4.11.'de verilmiştir.

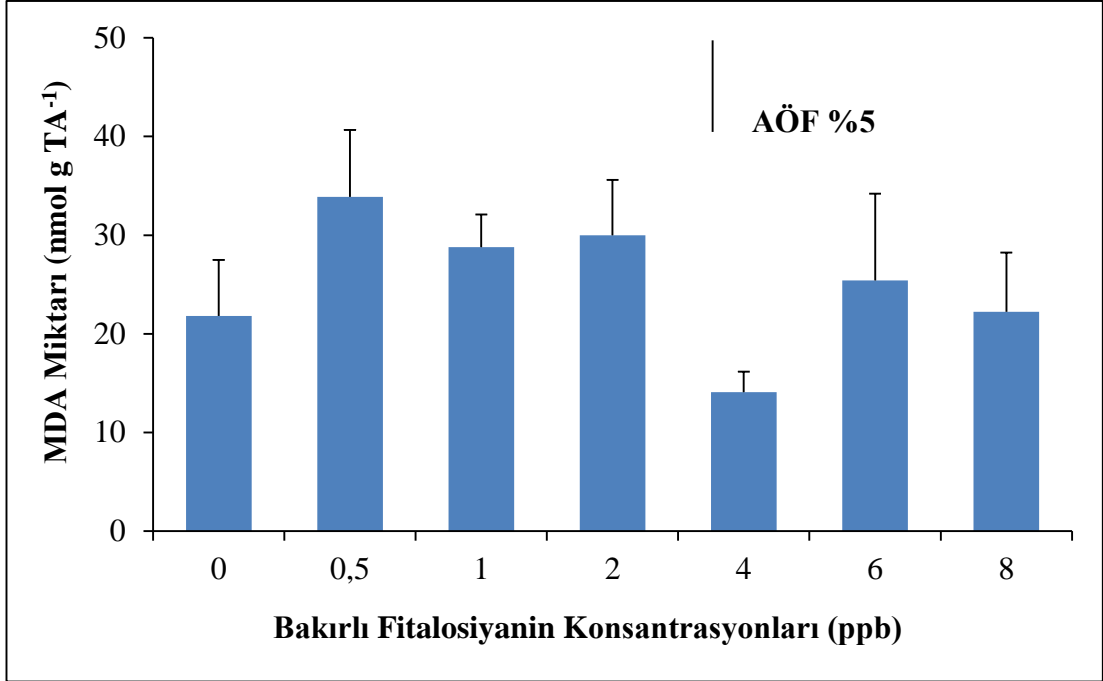
0.5, 1, 2, 4, 6 ve 8 ppb konsantrasyonlarında metallsiz fitalosiyenin etkisine maruz bırakılan *C. vulgaris* kültürlerinin MDA miktarı kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir ( $p < 0.05$ ). MDA miktarının en yüksek ( $94.93 \text{ nmol g TA}^{-1}$ ) ve en düşük ( $38.15 \text{ nmol g TA}^{-1}$ ) olduğu değerler sırasıyla 2 ve 4 ppb bakırlı fitalosiyenin konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.



Şekil 4.11. *C. vulgaris* algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki metalsiz fitalosiyenin türevine bağlı olarak MDA miktarında görülen değişim

*C. vulgaris*'e uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı fitalosiyenin bileşiğinin MDA miktarı üzerine etkisi Şekil 4.12.'de verilmiştir.

0.5 ppb bakırlı fitalosiyenin konsantrasyonunda MDA miktarı istatistiksel olarak anlamlı artma göstermiştir ( $p < 0.05$ ). 1, 2, 4, 6 ve 8 ppb konsantrasyonlarda ise bakırlı fitalosiyenin etkisine maruz bırakılan *C. vulgaris* kültürlerinin MDA miktarı kontrole göre istatistiksel olarak değişim göstermemiştir ( $p > 0.05$ ). MDA miktarının en yüksek ( $33.86 \text{ nmol g TA}^{-1}$ ) ve en düşük ( $14.08 \text{ nmol g TA}^{-1}$ ) olduğu değerler sırasıyla 0.5 ve 4 ppb bakırlı fitalosiyenin konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.

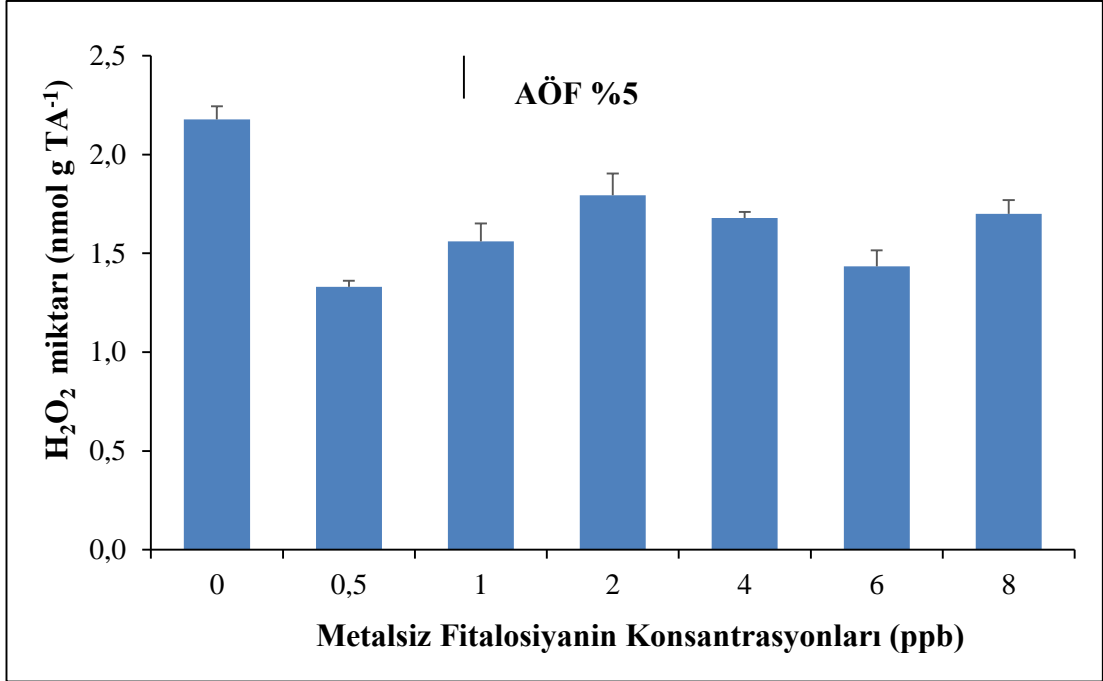


Şekil 4.12. *C. vulgaris* algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı fitalosiyenin türevine bağlı olarak MDA miktarında görülen değişim

#### 4.7. Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Miktarı

*C. vulgaris*'e uygulanan farklı konsantrasyonlardaki metallsiz fitalosiyenin bileşiğinin hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) miktarı üzerine etkisi Şekil 4.13.'de verilmiştir.

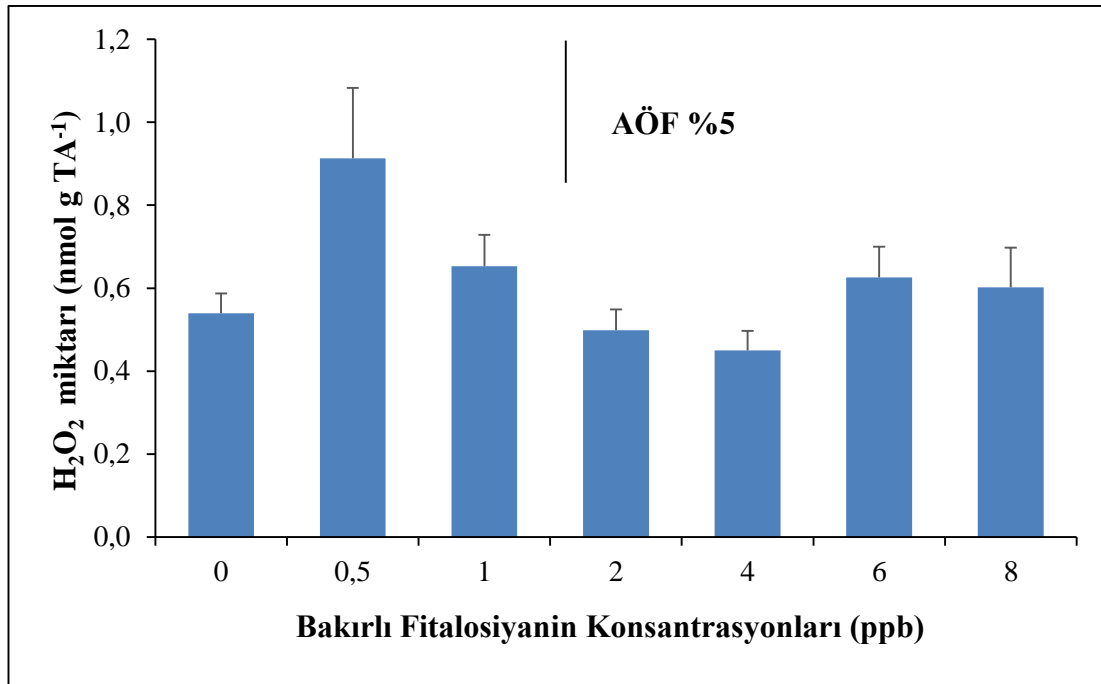
0,5, 1, 2, 4, 6 ve 8 ppb konsantrasyonlarında metallsiz fitalosiyenin etkisine maruz bırakılan *C. vulgaris* kültürlerinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir (p<0.05). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının en yüksek (1.79 nmol g TA<sup>-1</sup>) ve en düşük (1.33 nmol g TA<sup>-1</sup>) olduğu değerler sırasıyla 2 ve 0.5 ppb bakırlı fitalosiyenin konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.



Şekil 4.13. *C. vulgaris* algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki metalsiz fitalosiyenin türevine bağlı olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında görülen değişim

*C. vulgaris*'e uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı fitalosiyenin bileşiğinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı üzerine etkisi Şekil 4.14.'de verilmiştir.

0.5 ppb bakırlı fitalosiyenin konsantrasyonunda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı istatistiksel olarak anlamlı artma göstermiştir ( $p < 0.05$ ). 1, 2, 4, 6 ve 8 ppb konsantrasyonlarda ise bakırlı fitalosiyenin etkisine maruz bırakılan *C. vulgaris* kültürlerinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı kontrole göre istatistiksel olarak değişim göstermemiştir ( $p > 0.05$ ). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının en yüksek (0.91 nmol g TA<sup>-1</sup>) ve en düşük (0.45 nmol g TA<sup>-1</sup>) olduğu değerler sırasıyla 0.5 ve 4 ppb bakırlı fitalosiyenin konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.

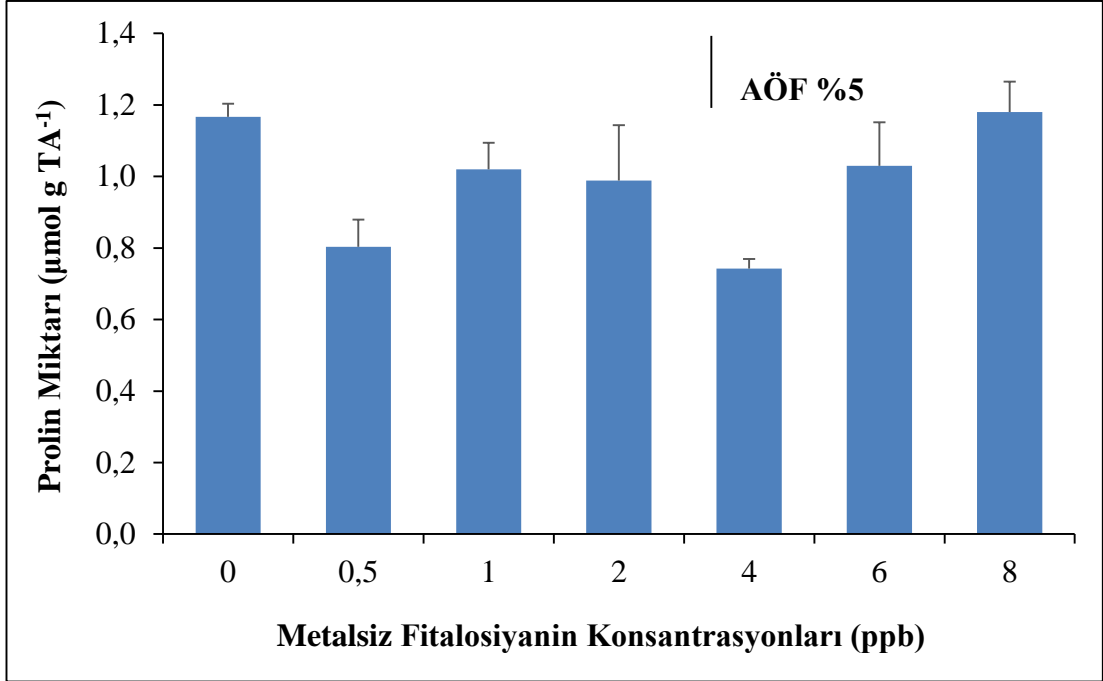


Şekil 4.14. *C. vulgaris* algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı fitalosiyenin türüne bağlı olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında görülen değişim

#### 4.8. Serbest Prolin Miktarı

*C. vulgaris*'e uygulanan farklı konsantrasyonlardaki metallsiz fitalosiyenin bileşiğinin serbest prolin miktarı üzerine etkisi Şekil 4.15.'de verilmiştir.

1, 2, 6 ve 8 ppb konsantrasyonlarında metallsiz fitalosiyenin etkisine maruz bırakılan *C. vulgaris* kültürlerinin serbest prolin miktarı kontrole göre istatistiksel olarak değişim göstermezken ( $p>0.05$ ); 0.5 ve 4 ppb konsantrasyonlarında metallsiz fitalosiyenin etkisine maruz bırakılan *C. vulgaris* kültürlerinin serbest prolin miktarı kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir ( $p<0.05$ ). Serbest prolin miktarının en yüksek ( $1.17 \mu\text{mol g TA}^{-1}$ ) ve en düşük ( $0.74 \mu\text{mol g TA}^{-1}$ ) olduğu değerler sırasıyla 8 ve 4 ppb konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.

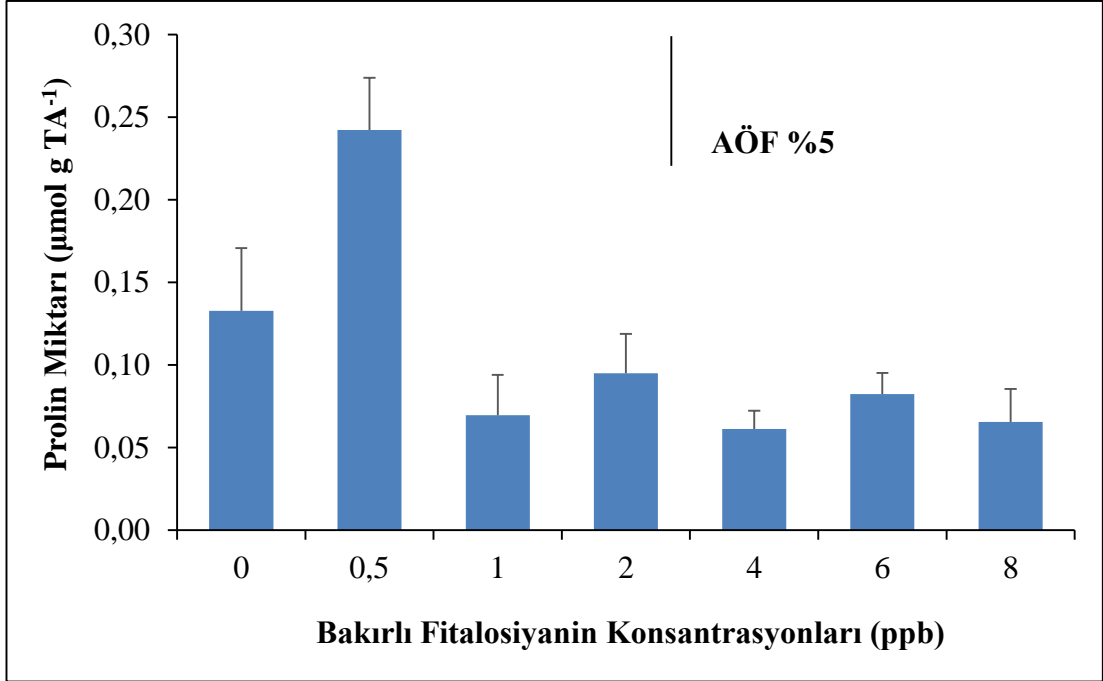


Şekil 4.15. *C. vulgaris* algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki metalsiz fitalosiyenin türevine bağlı olarak serbest prolin miktarında görülen değişim

*C. vulgaris*'e uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı fitalosiyenin bileşiğinin serbest prolin miktarı üzerine etkisi Şekil 4.16.'da verilmiştir.

0.5 ppb bakırlı fitalosiyenin konsantrasyonunda serbest prolin miktarı istatistiksel olarak anlamlı artmış olup ( $p < 0.05$ ); 1, 2, 4, 6 ve 8 ppb konsantrasyonlarda ise bakırlı fitalosiyenin etkisine maruz bırakılan *C. vulgaris* kültürlerinin serbest prolin miktarı kontrole göre istatistiksel olarak değişim göstermemiştir ( $p > 0.05$ ). Serbest prolin miktarının en yüksek ( $0.24 \mu\text{mol g TA}^{-1}$ ) ve en düşük ( $0.06 \mu\text{mol g TA}^{-1}$ ) olduğu değerler sırasıyla 0.5 ve 4 ppb konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.





Şekil 4.16. *C. vulgaris* algine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki bakırlı fitalosiyenin türevine bağlı olarak serbest prolin miktarında görülen değişim

## BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan bu çalışmada *Chlorella vulgaris* algine uygulanan metalsiz ve bakırlı fitalosiyenin türevlerinin farklı konsantrasyonlarının OD 750, klorofil-*a* miktarı, bazı antioksidan enzimlerin aktiviteleri (süperoksit dismutaz, askorbat peroksidaz ve glutasyon redüktaz) ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, malondialdehit ve prolin miktarında neden olduğu değişimler araştırılmıştır.

Algelerde büyüme ve gelişmeyi yorumlamak için klorofil-*a* ve OD 750 değerleri önemli birer parametredir. *C. vulgaris*'de 7 gün boyunca klorofil-*a* ve OD 750 değerlerinde kontrole göre değişimler gözlemlenmiştir. Metalsiz fitalosiyenin uygulamasında klorofil-*a* miktarında 1. gün tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre artış görülürken; 2. günden itibaren klorofil-*a* miktarında düzensiz azalmalar gözlenmiştir. Ayrıca metalsiz fitalosiyenin alg büyümesi üzerine düşük konsantrasyonlarda 4 gün boyunca olumlu etki yaptığı tespit edilse de zamana bağlı olarak tüm konsantrasyonlarda büyüme ve gelişmeyi olumsuz etkilediğini gözlenmiştir. Bakırlı fitalosiyenin uygulanan *C. vulgaris* 'de ise klorofil-*a* miktarında 7 gün boyunca düşük konsantrasyonlarda (0.5, 1, 2, 6 ppb) zamana bağlı olarak önemli derecede artma gözlenmiştir. Büyüme ve gelişim yönünde ise 1. günden itibaren düşük konsantrasyonlarda (0.5, 1, 2 ve 4 ppb) 7 gün boyunca biyokütle miktarının arttığı fakat yüksek konsantrasyonlarda (6 ve 8 ppb) büyüme ve gelişimin inhibe olmaya başladığı görülmüştür. Wong ve Chang (1991) yaptıkları bir çalışmada farklı dozlarda bakır (Cu), krom (Cr) ve nikel (Ni) metallерinin *Chlorella pyrenoidosa* algi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmaya göre; Cu metalinin klorofil miktarı, büyüme ve gelişmede toksik etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca Mamboya ve ark., (2001) *Padina boegesenii* üzerinde Cu metalinin artan konsantrasyonlara bağlı olarak algin gelişimi ve biyomasında azalmaya neden olduğunu bulmuşlardır. Cvetkovic ve ark. (1991) *Selenastrum capricornutum* üzerinde yaptıkları bir çalışmada Cu metalinin

0.5 mg L<sup>-1</sup>'den yüksek konsantrasyonlarda algin büyümesini zamana bağlı olarak geri dönüşümsüz olarak inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Günsel ve ark. (2018), suda çözünebilir alfa tetra substitue çinko fitalosiyanın türevinin *A. platensis* üzerinde büyümeyi önleyici etkileri olduğunu bulmuşlardır. Bu durum fitalosiyanın mikrotübül fonksiyonunu bozması nedeniyle gerçekleşmiş olabilir. Jancula ve ark. (2008), substitue edilmiş fitolasiyanin türevlerinin çevresel bölgelerindeki pozitif yükün, *Pseudokirchneriella subcapitata* ve *Synechococcus nidulans* gibi fitoplanktonlara karşı inhibitör etkisi oluşturduğunu rapor etmişlerdir. Ralph ve Burchett (1998), dört ağır metalin (Pb, Zn, Cu ve Cd) laboratuvar ortamında *Halophila ovalis* alginde fotosentez kapasitesi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Bu dört ağır metalin fotosentez üzerine etkileri karşılaştırıldığında Cu ve Zn'nin, Pb ve Cd'ye oranla daha toksik etkilere sahip olduğunu raporlamışlardır. Piotrowska-Niczyporuk ve ark. (2012), Cd, Pb ve Cu metallerinin 100 µM'lik konsantrasyonlarının *Chlorella vulgaris* üzerindeki etkilerini araştırmak için yaptıkları bir çalışmada, Cd'nin klorofil-*a* ve askorbat miktarında en büyük azalmaya neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Cao ve ark. (2011), farklı konsantrasyonlarda (10<sup>-12</sup> ve 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>) uygulanan manganın (Mn) *Amphidinium* sp.'de büyüme hızı üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Sonuçta Mn konsantrasyonu yükseldikçe zamana bağlı olarak önce artış sonra azalma olduğunu gözlemlemişlerdir. Surosz ve Palinska (2004), *Anabaena flos-aquae* ile yaptıkları bir çalışmada artan bakır konsantrasyonlarına bağlı olarak algin klorofil-*a* miktarında azalma olduğunu bildirmişlerdir. Pempkowiak ve Kosakowska (1998), kadmiyum uygulanan *Chlorella vulgaris* alginin hücre sayısı, biyokütle ve klorofil-*a* miktarındaki değişimlerini analiz etmişlerdir. Sonuç olarak kadmiyum konsantrasyonu arttıkça hücre sayısı, biyokütle ve klorofil-*a* miktarında azalma olduğunu bildirmişlerdir. Xylander ve Braune (1994), *Haematococcus lacustris* algi üzerinde farklı konsantrasyonlarda (1 ve 100 µM) nikel (NiSO<sub>4</sub> 6H<sub>2</sub>O) metalinin etkilerini araştırmışlardır. Sonuçta nikelin yüksek konsantrasyonuna bağlı olarak algin protein ve karbohidrat miktarında azalma gözlemlemişlerdir. Literatürde fitalosiyanın türevleri ve ağır metaller üzerine yapılan bu çalışmaların düşük konsantrasyonlarda büyüme ve klorofil-*a* miktarı üzerinde arttırıcı, yüksek konsantrasyonlarda ise inhibe edici etki gösterdikleri belirlenmiştir. Bu sonuçlar yapmış olduğumuz çalışma sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızda, metalsiz fitalosiyenin uygulanan *C. vulgaris* kültüründe 2 ppb konsantrasyonda; bakırlı fitalosiyenin uygulanan *C. vulgaris* kültürlerinde yüksek konsantrasyonda (6 ppb konsantrasyonda) SOD aktivitesinin arttığı, diğer konsantrasyonlarda kontrole göre bir değişim göstermediği görülmektedir. Stres koşullarında SOD aktivitesi genellikle artmaktadır (Allen, 1995). SOD, bitkilerde antioksidan sistemin önemli bir enzimatik bileşenidir ve süperoksit radikalini hidrojen peroksida parçalayan reaksiyonu katalizlemektedir (Abouzari ve Fakheri, 2015). Piotrowska-Niczyporuk ve ark. (2012), Cu uygulanan *C. vulgaris* alginde SOD aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir. Yine *Scenedesmus bijugatus* alginde bakır (Cu) stresi üzerinde çalışma yapan Nagalakshmi ve Prasad (2001), SOD aktivitesinde artış gözlemlendiğini belirtmişlerdir. Okamoto ve ark. (1996), *Tetraselmis gracilis* algi üzerinde antioksidan enzimlerine kadmiyum ağır metalinin etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, kadmiyumun artan konsantrasyonlarına bağlı olarak SOD aktivitesinde artış olduğunu bildirmişlerdir. Tripathi ve ark. (2006), *Scenedesmus* sp. algi üzerinde bakır ve çinko ağır metallerinin etkilerini araştırmışlardır. Sonuç olarak SOD aktivitesinin her iki ağır metalin artan konsantrasyonlarına bağlı olarak arttığını gözlemlenmiştir. Li ve ark. (2006), *Pavlova viridis* algi üzerinde bakır ve çinko ağır metallerinin SOD aktivitesinde metallerin yüksek konsantrasyonlarında arttığını bildirmişlerdir. Bahsedilen çalışmalar ile yapılan bu çalışmanın sonuçlarının paralellik gösterdiği görülmektedir. Ayrıca kullanılan fitalosiyenin türevlerinden bakırlı fitalosiyenin, metalsiz fitalosiyane göre yüksek konsantrasyonda süperoksit radikali ve diğer radikallerin oluşmasına neden olarak SOD enziminin aktifleştirdiği görülmektedir.

Sunduğumuz çalışmada APOD aktivitesinde metalsiz fitalosiyenin tüm konsantrasyonlarında azalma görülmektedir. Bakırlı fitalosiyenin uygulanan *C. vulgaris* kültürlerinde ise tüm konsantrasyonlarda artış görülmektedir. APOD enzimi antioksidan savunma sisteminde kilit bir enzimdir ve hücrelerdeki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarını direkt olarak belirler (Asada, 1992). Nagalakshmi ve Prasad (2001), Cu uygulanan *Scenedesmus bijugatus* alginde artan Cu konsantrasyonlarına bağlı olarak APOD aktivitesinde artış gözlemlendiğini belirtmişlerdir. Elbaz ve ark. (2010), *Chlamydomonas reinhardtii* alginde civa uygulamalarının APOD aktivitesini ve reaktif oksijen

türlerinin miktarını artırdığını belirtmişlerdir. Yukarıdaki bilgiler ışığında her iki fitalosiyenin türevinin düşük konsantrasyonda alg üzerinde oksidatif stres oluşturduğunu ve APOD enziminin tam anlamıyla çalıştığı görülmektedir. Metalsiz fitalosiyenin uygulanan *C. vulgaris* kültürlerinde APOD aktivitesi ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı tüm konsantrasyonlarda azalmıştır. Stres altındaki bitki dokularında AsA/DHA oranının önemli derecede azalması, APOD'un ROS'ların detoksifikasyonu sırasında AsA'yı sürekli kullanmasından kaynaklanmaktadır. APOD aktivitesinin AsA'nın düşük konsantrasyonlarında önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir; bu nedenle APOD'un aktivitesinin korunması için AsA'nın bitki dokularındaki miktarının artması gerekir (Asada, 1999). Bu nedenle metalsiz fitalosiyandeki gözlemlenen azalmanın nedeni enzimin yapısını bozduğundan kaynaklanmış olabileceği gibi ortamdaki indirgenmiş askorbik asit miktarının azalmasından da kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda metalsiz fitalosiyenin uygulanan *C. vulgaris* alginde 1, 2 ve 4 ppb konsantrasyonlarda GR aktivitesinde artış olduğu gözlemlenirken, bakırlı fitalosiyenin uygulanan *C. vulgaris* alginde 6 ppb konsantrasyonda artış olduğu tespit edilmiştir. Sandalio ve ark. (2001), yapmış oldukları çalışmada kadmiyum uygulanan *Pisum sativum* bitkisinde GR aktivitesinde herhangi bir değişim olmadığını belirtmiştir. Buna benzer olarak Dewez ve ark. (2005), yapmış oldukları çalışmada *Scenedesmus obliquus* üzerinde bakır toksisitesinin etkilerini APOD, GR ve KAT aktiviteleri yoluyla araştırmışlardır. Buna göre artan bakır konsantrasyonlarına bağlı olarak KAT aktivitesinde önemli derecede artış gözlemlenirken, APOD ve GR aktivitelerinde önemli bir değişim olmadığını bildirmişlerdir. Bunun sebebinin de okside glutatyon havuzunun diğer enzimler tarafından kullanılmış olabileceği şeklinde belirtmişlerdir. Li ve ark. (2006), yapmış oldukları çalışmada, *Pavlova viridis* üzerine uyguladıkları bakır (Cu) metalinin GR aktivitesinde artan konsantrasyonlara bağlı olarak düzensiz bir şekilde artışa yol açtığını bildirmişlerdir. Morelli ve Scarano (2004), ise bakır uygulamasının *Phaeodactylum tricornutum* alginde SOD, KAT ve GR aktiviteleri artırdığını gözlemlemişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada ise *Scenedesmus vacuolatus* alginde bakır toksisitesinin GSH miktarını artırdığı, biyokütle ve klorofil-*a* miktarının azaldığı gözlenmiştir (Sabatini ve ark., 2009). Melegari ve ark. (2013), yapmış

oldukları bir çalışmada *Chlamydomonas reinhardtii* algine bakır oksit nanopartikülü (CuO NP) uygulamışlardır. Sonuçta bakır oksitin artan konsantrasyonlara bağlı olarak algin APOD ve GR aktivitelerinde artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Stres koşulları altında artan GR aktivitesi organizmanın oluşturduğu bir yanıt olarak kabul edilmektedir (Sharma, 2014). Literatürdeki yapılan çalışmalar ile bu çalışmada elde edilen sonuçlar paralellik göstermektedir. Her iki fitalosiyanın türevi için düşük konsantrasyonda (0.5 ppb) GR aktivitesinde değişimin oluşmaması GR'yi aktive edecek düzeyde ROS'un üretilmediğini ya da diğer antioksidanlar ile detoksifikasyon sağlandığı göstermektedir. Ayrıca bakırlı fitalosiyanın yüksek konsantrasyonunda (6 ppb) GR aktivitesinin artışı aynı konsantrasyondaki SOD artışının desteklemektedir. Çünkü SOD enzimi ortama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sağlamaktadır. Metalsiz fitalosiyanın yüksek konsantrasyonunda bir değişim göstermemesi ROS üretiminin GR'yi uyarıcı eşiğe ulaşmadığı veya yapısında bir hasar oluşturabilecek düzeye erişemediğini düşündürmektedir.

Yapılan çalışmada bakırlı fitalosiyanın türevinin en düşük konsantrasyonda (0.5 ppb) *C. vulgaris* alginde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> MDA ve prolin miktarlarında artış gözlemlenirken diğer konsantrasyonlarda değişim gözlemlenmemiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının artması Haber-Weis reaksiyonu ile OH<sup>•</sup> radikalinin oluşumuna ve dolayısıyla lipid peroksidasyonunda artmaya neden olmaktadır (Bowler ve ark., 1992; Goel ve Sheoran, 2003). Bahsi geçen konsantrasyonda süperoksit dismutazın fonksiyonel olmaması ortamda O<sub>2</sub><sup>•-</sup> miktarının birikmesine neden olmuştur. Lipit peroksidasyonu ile ortamdaki O<sub>2</sub><sup>•-</sup> miktarının bağlantılı olduğu bilinmektedir (Choudary ve ark., 2007). Lipit peroksidasyonun bir göstergesi olan MDA miktarının ise bu nedenle artmış olduğu söylenebilir. Prolin ise stres koşullarında lipid peroksidasyonuna karşı üretilen bir imino asittir (Fatma ve ark., 2007). *Pseudokirchneriella subcapitata* algi üzerinde yapılan bir çalışmada bakır metalinin büyüme gelişme ve antioksidan cevapları incelenmiştir. Sonuç olarak Soto ve ark. (2001), yapmış oldukları bu çalışmada Cu metalinin alg üzerinde artan konsantrasyonlarıyla birlikte MDA ve KAT aktivitesinin paralel olarak arttığını, buna bağlı olarak biyokütlede azalma olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca bir diğer çalışmada Li ve ark. (2006), bakır stresi altında olan *Pavlova viridis* de artan bakır konsantrasyonlarına bağlı olarak MDA miktarında ve SOD aktivitesinde

aynı oranda artma görüldüğünü belirtmişlerdir. Qian ve ark. (2010), *Microcystis aeruginosa* alginde bakır sülfat ( $\text{CuSO}_4$ ) stresinde, hücrelerdeki  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarını zamana bağlı olarak artırdığını ve buna bağlı olarak klorofil-*a* miktarında azalma olduğunu bildirmişlerdir. Lin ve Kao (2000), tuz stresi uyguladıkları *Oryza sativa* bitkisinde hem  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarında hem de MDA miktarında değişim olmamasını diğer antioksidan enzimlerin aktivitesindeki değişimlere bağlamışlardır. Ayrıca prolin hücre zar hasarını ve MDA birikimini önlemiş olabilir. Siripornadulsil ve ark. (2002), prolini aşırı üreten transgenik *Chlamydomonas reinhardtii* alginde kadmiyum uygulamasının MDA miktarında değişim oluşturmamasını, prolinin antioksidan olarak davranması nedeniyle serbest radikal zararını önlediği şeklinde yorumlamışlardır. Bu çalışmada bakırlı fitalosiyanın düşük konsantrasyonunda (0.5 ppb) gözlenen bu artış aynı konsantrasyondaki artan prolin miktarı ile açıklanabilir. Bakırlı fitalosiyanın uygulamasında diğer konsantrasyonlardaki (1, 2, 4, 6 ve 8 ppb) MDA ve  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarının kontrole göre değişmemesinin nedeni ise APOD aktivitesinin bu konsantrasyonlarda anlamlı artış göstermesinden kaynaklanabilir.

Metalsiz fitalosiyanın uygulanan *C. vulgaris* alginde MDA ve  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarları kontrole göre bütün konsantrasyonlarda (0.5, 1, 2, 4, 6 ve 8 ppb) anlamlı olarak azalmıştır. Zhang ve ark. (2007), ağır metal sitresi altındaki *Kandelia candel* ve *Bruguiera gymnorrhiza* bitkileri ile yapmış oldukları bir çalışmada MDA miktarındaki azalmanın, artan antioksidan enzim aktivitelerinden kaynaklandığını ve böylece membran hasarını önlemiş olabileceği belirtmişlerdir. Çalışmamızda elde edilen veriler doğrultusunda azalan MDA ve  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarları hücrede serbest radikallerin kontrol altına alındığını ve lipid peroksidasyonun engellendiğine işaret etmektedir. Ayrıca metalsiz fitalosiyanın uygulanan *C. vulgaris* alginde artan APOD aktivitesi,  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarının azalmasını ve bu nedenle MDA miktarındaki azalmayı da açıklamaktadır. Çünkü APOD enzimi  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarını belirlemede ve antioksidan savunma sisteminde kilit enzim görevini üstlenmektedir (Asada, 1992).

Çalışmada metalsiz fitalosiyanın uygulanan *C. vulgaris* alginde serbest prolin miktarında konsantrasyonlara bağlı olarak düzensiz bir azalma tespit edilmiştir. Ewald ve Schlee (1983), sodyum sülfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) uygulanan *Trebouxia* sp. alginde serbest

prolin miktarının azaldığını ve bunun nedenin de prolin sentezinin inhibe edilmesinden kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Genellikle literatür çalışmalarında; stres koşullarında serbest prolin miktarının arttığından söz edilirken, bu şekilde serbest prolin miktarının azaldığını belirten çalışmalar da bulunmaktadır. Mehta ve Gaur (1999), *C. vulgaris* üzerinde yüksek konsantrasyonlarda bakır metalinin etkisini çalışmışlardır. Sonuç olarak da hücre içerisinde biriken bu metallerin serbest prolin miktarını arttırıcı yönde etkilediği belirtilmiştir. Başka bir çalışmada *Arthrospira platensis* S5 suşuna uygulanan bakırın hücrede serbest prolin miktarını, MDA miktarını ve SOD aktivitesini arttırıcı yönde etkilediği rapor edilmiştir (Choudhary ve ark., 2007). Yukarıdaki çalışmalara benzer olarak bizim çalışmamızda da ara konsantrasyonlarda serbest prolin miktarının azalmış olması bu molekülün serbest radikaller tarafından kullanılmış olmasından kaynaklanmış ya da metalsiz fitalosiyenin uygulanan gruplardaki tüm konsantrasyonlarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyesinin azalmasına bağlı olarak azalan MDA miktarı olabilir.

Çalışmamızda *C. vulgaris*'e uygulanan farklı fitalosiyenin türevlerine verilen antioksidan cevaplar aynı konsantrasyonlarda farklılık göstermiştir. İçerik olarak farklılık gösteren fitalosiyeninlerin farklı düzeylerde reaktif oksijen türlerini oluşturması ve hücrelerde farklı şekilde cevap oluşturması bu bileşiklerin hücredeki metabolik dengeyi etkilediklerinin bir kanıtı niteliğindedir. Bu nedenledir ki; farklı kullanım alanları olan ve her geçen gün bu kullanım alanlarına yenisi eklenen fitalosiyenin türevlerinin uygulama, tüketim ve sonunda oluşan atık takibinde çalışmada kullanılan konsantrasyonların dikkate alınması sucul ekosisteme kontaminasyonunu kontrol altına almamızı sağlayacaktır. Fitolosiyenin kaynaklı çevresel kirlenme tespitinde diğer yüksek yapılı organizmalara kıyasla tek hücreli bu küçük organizmaların kullanılması hızlı ve güvenilir göstergeler olarak daha sonraki çalışmalara ışık tutacaktır.



## KAYNAKÇA

- Abouzari, A., Fakheri, B. A., 2015. Reactive oxygen species: generation, oxidative damage, and signal transduction. *International Journal of Life Sciences*, 9(5), 3-17.
- Acemioğlu, B., 2004. Adsorption of Congo red from aqueous solution onto calcium-rich fly ash. *Journal of Colloid and Interface Science*, 274(2), 371-379.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., Tattini, M., 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science*, 196, 67-76.
- Akkuş, F., 2011. Nonperiferal Grup Taşıyan Benzopirrololik Bileşiklerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Kompleks Oluşumlarının İncelenmesi, Denizli: Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Alhag Dow, M., Mounet, F., Gilbert, L., Nunes-Nesi, A., Garcia, V., Just, D., Petit, J., Beauvoit, B., Fernie, A. R., Rothan, C., Baldet, P., 2007. Silencing of the mitochondrial ascorbate synthesizing enzyme l-galactono-1,4-lactone dehydrogenase affects plant and fruit development in tomato. *Plant Physiology*, 145(4), 1408-1422.
- AliaSaradhi, P. P., 1993. Suppression in mitochondrial electron transport is the prime cause behind stress-induced proline accumulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 193(1), 54-58.
- AliaSaradhi, P. P., Mohanty, P., 1991. Proline enhances primary photochemical activities in isolated thylakoid membranes of *Brassica juncea* by arresting photoinhibitory damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 181(3), 1238-1244.
- AliaSaradhi, P. P., Mohanty, P., Matysik, J., 2001. Effect of proline on the production of singlet oxygen. *Amino Acids*, 21(2), 195–200.
- Allen, J., 1995. *Natural Language Understanding*. Pearson.
- Anbar, A. D., 2008. Elements and Evolution. *Science*, 322(5907), 1481-1483.
- Anjum, N. A., Umar, S., Chan, M. T., 2010. Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants. Springer Science and Business Media.
- Arrigoni, O., (1994). Ascorbate system in plant development. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 26(4), 407-419.
- Arslanoğlu, Y., 2004. Yen Tip Çözünür Titanyum Ftalsiyanimlerin Sentezi. İstanbul: İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Asada, K., 1992. Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, 85(2), 235-241.

- Asada, K., 1994. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants, 77-104.
- Asada, K., 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *A Review of Plant Biology*, 50(1), 601-639.
- Ashraf, M., 2009. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnology Advances*, 27(1), 84-93.
- Azevedo, R. A., Alas, R. M., Smith, R. J., Lea, P. J., 1998. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiologia Plantarum*, 104(2), 280-292.
- Bates, L. S., Waldren, R. P., Teare, I. D., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, 39(1), 205-207.
- Benzer, F., Ozan, S. T., 2003. Fasciola hepatica ile enfekte koyunlarda lipid peroksidasyonu, antioksidant enzimler ve nitrik oksit düzeyleri. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 27, 657-661.
- Bertoloni, G., Rossi, F., Valduga, G., Jori, G., Ali, H., 1992. Photosensitizing activity of water-and lipid-soluble phthalocyanines on prokaryotic and eukaryotic microbial cells. *Microbios*, 71(286), 33-46.
- Beyer, W. F., Fridovich, I., 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, 161(2), 559-566.
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K. V., 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A Review. *Annals of Botany*, 91(2), 179-194.
- Bolwell, G. P., Wojtaszek, P., 1997. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence—a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 51(6), 347-366.
- Bowler, C., Montagu, M. V., Inze, D., 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 43(1), 83-116.
- Boyd, E. S.; Thomas, K. M.; Dai, Y.; Boyd, J. M.; Outten, F. W., 2014. Interplay between oxygen and Fe-S cluster biogenesis: Insights from the suf pathway. *Biochemistry*, 53(37), 5834-5847.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Cao, C., Sun, S., Wang, X., Liu, W., Liang, Y., 2011. Effects of manganese on the growth, photosystem II and SOD activity of the dinoflagellate *Amphidinium* sp.. *Journal of Applied Phycology*, 23(6), 1039–1043.
- Cerqueira, F. M., de Medeiros, M. H. G., Augusto, O., 2007. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Química Nova*, 30(2), 441.

- Choudhary, M., Jetley, U. K., Khan, M. A., Zutshi, S., Fatma, T., 2007. Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis*-S5. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66(2), 204-209.
- Contour-Ansel, D., Torres-Franklin, M. L., Cruz De Carvalho, M. H., D'Arcy-Lameta, A., Zuily-Fodil, Y., 2006. Glutathione reductase in leaves of cowpea: cloning of two cDNAs, expression and enzymatic activity under progressive drought stress, desiccation and abscisic acid treatment. *Annals of Botany*, 98(6), 1279-1287.
- Cuypers, A., Hendrix, S., Reis, R. A. D., Smet, S. D., Deckers, J., Gielen, H., Jozefczak, M., Loix, C., Vercampt, H., Vangronsveld, J., Keunen, E., 2016. Hydrogen peroxide, signaling in disguise during metal phytotoxicity. *Frontiers in Plant Science*, 7, 470.
- Cvetkovic, A. D., Samson, G., Couture, P., Popovic, R., 1991. Study of dependency between culture growth and photosynthetic efficiency measured by fluorescence induction in *Selenastrum capricornutum* inhibited by copper. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 22(2), 127-132.
- Çakmak, İ., Marschner, H., 1988. Enhanced Superoxide Radical Production in Roots of Zinc-Deficient Plants. *Journal of Experimental Botany*, 39(10), 1449-1460.
- Cakmak, İ., van de Wetering, D. A., Marschner, H., Bienfait, H. F., 1987. Involvement of Superoxide Radical in Extracellular Ferric Reduction by Iron-Deficient Bean Roots. *Plant Physiology*, 85(1), 310-314.
- Çerlek, H., 2005. Farklı Sübstitüentler İçeren Kurşun Ftalosiyeninler, İstanbul: İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Demidchik, V., 2015. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, 109, 212-228.
- Dewez, D., Geoffroy, L., Vernet, G., Popovic, R., 2005. Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*. *Aquatic Toxicology*, 74(2), 150-159.
- Dixit, V., Pandey, V., Shyam, R., 2001. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *Journal of Experimental Botany*, 52(358), 1101-1109.
- Doke, N., Miura, Y., Sanchez, L. M., Park, H. J., Noritake, T., Yoshioka, H., Kawakita, K. 1996. The oxidative burst protects plants against pathogen attack: Mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence - A Review. *Gene*, 179(1), 45-51.
- Drábková, M., Maršálek, B., Admiraal, W., 2007. Photodynamic therapy against cyanobacteria. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 22(1), 112-115.
- Durmuş, M., 2004. Yeni Tip Periferal ve Nonperiferal Alkoksi Sübstitüe Ftalosinin Sentezi ve Yapılarının Aydınlatılması, Kocaeli: G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.

- Edwards, E. A., Rawsthorne, S., Mullineaux, P. M., 1990. Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*, 180(2), 278-284.
- Elbaz, A., Wei, Y. Y., Meng, Q., Zheng, Q., Yang, Z. M., 2010. Mercury-induced oxidative stress and impact on antioxidant enzymes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ecotoxicology*, 19(7), 1285–1293.
- Elstner, E. F., 1982. Oxygen Activation and Oxygen Toxicity. A Review of Plant Physiology, 33, 73-96.
- Ewald, D., Schlee, D., 1983. Biochemical effects of sulphur dioxide on proline metabolism in the alga *Trebouxia* sp.. *New Phytologist*, 94(2), 235-240.
- Fatma, T., Khan, M. A., Choudhary, M., 2007. Impact of environmental pollution on cyanobacterial proline content. *Journal of Applied Phycology*, 19(6), 625–629.
- Fini, A., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., Tattini, M., 2011. Stress-induced flavonoid biosynthesis and the antioxidant machinery of plants. *Plant Signaling and Behavior*, 6(5), 709-711.
- Fink, R. C., Scandalios, J. G., 2002. Molecular evolution and structure–function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 399(1), 19-36.
- Flora, S., 2007. Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cellular and Molecular Biology*, 53(1), 1-2.
- Foyer, C. H., Noctor, G., 2003. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 119(3), 355-364.
- Foyer, C. H., Noctor, G., 2013. Redox Signaling in Plants. *Antioxidants and Redox Signaling*, 18(16), 2807-2090.
- García-Domínguez, M., Florencio, F. J., 1997. Nitrogen availability and electron transport control the expression of *glnB* gene (encoding PII protein) in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Molecular Biology*, 35(6), 723–734.
- Gill, S. S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Goel, A., Sheoran, I. S., 2003. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes in cotton seeds under natural ageing. *Biologia Plantarum*, 46(3), 429–434.
- Gordon, P. F., Gregory, P., 1983. *Organic Chemistry in Colour*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Science and Business Media.
- Gratão, P. L., Polle, A., Lea, P. J., Azevedo, R. A., 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*, 32(6), 481-494 .
- Gross, G. G., Janse, C., Elstner, E. F., 1977. Involvement of malate, monophenols, and the superoxide radical in hydrogen peroxide formation by isolated cell walls from horseradish (*Armoracia lapathifolia* Gilib.). *Planta*, 136(3), 271–276.

- Gupta, D. K., Palma, J. M., Corpas, F. J., 2015. Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants Under Stress. USA: Heidelberg: Springer.
- Gupta, S., Abu-Ghannam, N., 2011. Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends in Food Science and Technology*, 22(6), 315-326.
- Günsel, A., Tunca, H., Bilgiçli, A. T., Doğru, A., Yaraşır, M. N., Sevindik, T. O., Er, Ş., 2018. The effects of a water-soluble alpha tetra-substituted zinc phthalocyanine derivative on *Arthrospira platensis*-M2 strain. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 22(8), 686-692.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., 2007. Antioxidant defences: endogenous and diet derived. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4, 79-186.
- Hamilton, E. W., Heckathorn, S. A., 2001. Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine. *American Society of Plant Physiologists*, 126(3), 1266-1274.
- Hancock, R. D., Walker, P. G., Pont, S. D. A., Marquis, N., Vivera, S., Gordon, S. L., Brennan, R. M., Viola, R., 2007. L-Ascorbic acid accumulation in fruit of *Ribes nigrum* occurs by in situ biosynthesis via the l-galactose pathway. *Functional Plant Biology*, 34(12), 1080-1091.
- Hare, P. D., Cress, W. A., 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*, 21(2), 79–102.
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M. A., Fujita, M., 2010. Physiological and biochemical mechanisms of nitric oxide induced abiotic stress tolerance in plants. *American Journal of Plant Physiology*, 5(6), 295-324.
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M. A., da Silva, J. A. T., Fujita, M., 2012. Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defense is a key factor. *Crop Stress and its Management: Perspectives and Strategies*. Springer, Dordrecht, 261-315.
- Heath, R. L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1), 189-198.
- Hellebusi, J. A., 1976. Osmoregulation. *Annual Review of Plant Physiology*, 27(1), 485-505.
- Igamberdiev, A. U., Seregelyes, C., Manac, N., Hill, R. D., 2004. NADH-dependent metabolism of nitric oxide in alfalfa root cultures expressing barley hemoglobin. *Planta*, 219(1), 95-102.
- Jain, M., Mathur, G., Koul, S., Sarin, N., 2001. Ameliorative effects of proline on salt stress-induced lipid peroxidation in cell lines of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Reports*, 20(5), 463-468.
- Jančula, D., Drábková, M., Černý, J., Karásková, M., Kořínková, R., Rakušan, J., Maršálek, B., 2008. Algicidal activity of phthalocyanines-Screening of 31 compounds. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 23(2), 218-223.

- Jančula, D., Maršálek, B., 2011. Critical review of actually available chemical compounds for prevention and management of cyanobacterial blooms. *Chemosphere*, 85(9), 1415-1422.
- Jiménez, A., Hernández, J. A., Pastori, G., del Río, L. A., Sevilla, F., 1998. Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. *American Society of Plant Physiologists*, 118(4), 1327-1335.
- Jones, R. G. W., Storey, R., 1978. Salt stress and comparative physiology in the gramineae. IV. comparison of salt stress in *spartina x towsendii* and three barley cultivars. *Australian Journal of Plant Physiology*, 5(6), 839-850.
- Kandpal, R. P., Rao, N. A., 1985. Alterations in the biosynthesis of proteins and nucleic acids in finger millet (*Eleusine coracana*) seedlings during water stress and the effect of proline on protein biosynthesis. *Plant Science*, 40(2), 73-79.
- Kantar, C., 2004. Fenol ve Türevlerini İçeren Ftalasiyaninlerin Sentezi ve Spektroskopik Özelliklerinin İncelenmesi, Samsun: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Kaushik, S., Singh, R., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A. M., Czaja, M. J., 2009. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*, 458(7242), 1131-1135.
- Khan, N. A., Singh, S., 2008. Abiotic Stress and Plant Responses. IK International, New Delhi, 205-215.
- Kingston, H. M. S., Haswell, S. J., 1997. Microwave-Enhanced Chemistry: Fundamentals, Sample Preparation, and Applications. Washington DC: American Chemical Society.
- Kishor, P. B. K., Sangam, S., Amrutha, R. N., Laxmi, P. S., Naidu, K. R., Rao, K. R. S. S., Rao, S., Reddy, K. J., Theriappan, P., Sreenivasulu, N., 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science*, 88(3), 424-438.
- Kocataş, A., 1994. Ekolojide Bazı Kuram ve Kavramlar. Ekoloji ve Çevre Biyolojisi. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, 41.
- Koçak, M. B., Gül, A., Dinçer, H., Şener, M. K., 2004. Periferal Dendritik Sübstitüentler içeren Ftalosiyaninler, İstanbul: İstanbul Teknik Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi.
- Krieger-Liszkay, A., Fufezan, C., Trebst, A., 2008. Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynthesis Research*, 98(1-3), 551-564.
- Krishnamurthy, P., Wadhvani, A., 2012. Antioxidant Enzymes and Human Health, In *Tech Science, Technology and Medicine*. Vienna, Austria, 4-18.
- Kumar, M. S., Praveenkumar, R., Jeon, B. H., Thajuddin, N., 2014. Chlorpyrifos induced changes in the antioxidants and fatty acid compositions of *Chroococcus turgidus* NTMS12. *Letters in Applied Microbiology*, 59(5), 535-541.

- Lagman, M., Ly, J., Saing, T., Singh, M. K., Tudela, E. V., Morris, D., Chi, P., Ochoa, C., Sathanathan, A., Venketaraman, V., 2015. Investigating the causes for decreased levels of glutathione in individuals with type II diabetes. *PLoS ONE*, 10(3), e0118436.
- Laliberté, G., Hellebust, J. A., 1989. Regulation of proline content of *Chlorella autotrophica* in response to changes in salinity. *Canadian Journal of Botany*, 67(7), 1959-1965.
- Leisinger, U., Rüfenacht, K., Fischer, B., Pesaro, M., Spengler, A., Zehnder, A. J., Eggen, R. I., 2001. The glutathione peroxidase homologous gene from *Chlamydomonas reinhardtii* is transcriptionally up-regulated by singlet oxygen. *Plant Molecular Biology*, 46(4), 395–408.
- Li, M., Hu, C., Zhu, Q., Chen, L., Kong, Z., Liu, Z., 2006. Copper and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae). *Chemosphere*, 62(4), 565-572.
- Lin, C. C., Kao, C. H., 2000. Effect of NaCl stress on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolism in rice leaves. *Plant Growth Regulation*, 30(2), 151–155.
- Linstead, R. P., 1934. 212. Phthalocyanines. Part I. A new type of synthetic colouring matters. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 1016-1031.
- Liu, M. O., Tai, C.-H., Hu, A. T., 2004. The fluorescent and photoelectric conversion properties of phthalocyanine-perylene tetracarboxylic complexes. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 165(1-3), 193-200.
- Loewus, F. A., Loewus, M. W., Seib, P. A., 1987. Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 5(1), 101-119.
- López-Huertas, E., Corpas, F. J., Sandalio, L. M., Río, L. A. D., 1999. Characterization of membrane polypeptides from pea leaf peroxisomes involved in superoxide radical generation. *Biochemical Journal*, 337(3), 531-536.
- Low, P. S., 1985. Molecular basis of the biological compatibility of nature's osmolytes. *Transport Processes, Iono-and Osmoregulation*. Springer, Berlin, Heidelberg, 469-477.
- Mackinney, G., 1941. Absorption of light by chlorophyll solution. *Journal of Biological Chemistry*, 140(2), 315-322.
- Mamboya, F., Pratap, H. B., Mtolera, M., Bjork, M., 2001. The effect of copper on the daily growth rate and photosynthetic efficiency of brown macroalga *Padina boergesii*. *WIOMSA Book Series*, 1, 185-192.
- Mano, J., Takahashi, M., Asada, K., 1987. Oxygen evolution from hydrogen peroxide in photosystem II: flash-induced catalytic activity of water-oxidizing photosystem II membranes. *Biochemistry*, 26(9), 2495-2501.
- Mehdy, M. C., Sharma, Y. K., Sathasivan, K., Bays, N. W., 1996. The role of activated oxygen species in plant disease resistance. *Physiologia Plantarum*, 98(2), 365-374.
- Mehta, S. K., Gaur, J. P., 1999. Heavy-metal-induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris*. *The New Phytologist*, 143(2), 253-259.

- Melegari, S. P., Perreault, F., Costa, R. H. R., Popovic, R., Matias, W. G., 2013. Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology*, 142, 431-440.
- Merchat, M., Bertolini, G., Giacomini, P., Villaneuva, A., Jori, G., 1996. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 32(3), 153-157.
- Miller, A. F., 2012. Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS Letters*, 586(5), 585-595.
- Minnock, A., Vernon, D. I., Schofield, J., Griffiths, J., Parish, J. H., Brown, S. B., 1996. Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both gram-negative and gram-positive bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 32(3), 159-164.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405-410.
- Mittler, R., 2017. ROS Are Good. *Trends in Plant Science*, 22(1), 11-19.
- Mittler, R., Vanderauwerab, S., Gollery, M., Breusegemb, F. V., 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9(10), 490-498.
- Mittler, R.; Vanderauwerera, S.; Suzuki, N.; Miller, G.; Tognetti, V. B.; Vandepoele, K.; Gollery, M.; Shulaev, V.; Breusegem, F. V., 2011. ROS signaling: the new wave?. *Trends in Plant Science*, 16(6), 300-309.
- Morelli, E., Scarano, G., 2004. Copper-induced changes of non-protein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Science*, 167(2), 289-296.
- Moser, F. H., 1983. Phthalocyanines. Baskı 1, Florida: Properties.
- Moussavi, M., Cian, A. D., Fischer, J., Weiss, R., 1988. Synthesis, structure and spectroscopic properties of the reduced and reduced protonated forms of lutetium diphthalocyanine. *Inorganic Chemistry*, 27(7), 1287-1291.
- Munné-Bosch, S., Alegre, L., 2002. The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(1), 31-57.
- Murphy, T. M., Auh, C. K., 1996. The superoxide synthases of plasma membrane preparations from cultured rose cells. *Plant Physiology*, 110(2), 621-629.
- Nagalakshmi, N., Prasad, M. N. V., 2001. Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Science*, 160(2), 291-299.
- Nemykin, V. N., Kobayashi, N., Mystsyk, V. M., Volkov, S., 2000. *Chemistry Letters*, 546.
- Nikolopoulos, D., Manetas, Y., 1991. Compatible solutes and in vitro stability of salsola soda enzymes: Proline incompatibility. *Phytochemistry*, 30(2), 411-413.
- Nisar, N., Li, L., Lu, S., Khin, N. C., Pogson, B. J., 2015. Carotenoid metabolism in plants. *Molecular Plant*, 8(1), 68-82.



- Okamoto, O. K., Asano, C. S., Aidar, E., Colepiccolo, P., 1996. Effects of cadmium on growth and superoxide dismutase activity of the marine microalga *Tetraselmis gracilis* (Prasinophyceae) 1. *Journal of Phycology*, 32(1), 74-79.
- Paleg, L. G., Stewart, G. R., Bradbeer, J. W., 1984. Proline and glycine betaine influence protein solvation. *American Society of Plant Biologists*, 75(4), 974-978.
- Pempkowiak, J., Kosakowska, A., 1998. Accumulation of cadmium by green algae *Chlorella vulgaris* in the presence of marine humic substances. *Environment International*, 24(5-6), 583-588.
- Perry, J. J. P., Shin, D. S., Getzoff, E. D., Tainer, J. A., 2010. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804(2), 245-262.
- Piechocki, C., Simon, J., Skoulios, A., D. Guillon, P. W., 1982. Annelides. 7. Discotic mesophases obtained from substituted metallophthalocyanines. Toward liquid crystalline one-dimensional conductors. *Journal of American Chemical Society*, 104(19), 5245-5247.
- Pierzynski, G. M., Schwab, A. P., 1992. Reducing Heavy Metal Availability to Soybeans Grown on a Metal Contaminated Soil. *Proceeding Conference on Hazardous Waste Research*, University of Colorado, Boulder, CO. 543-553.
- Pinton, R., Çakmak, İ., Marschner, H., 1994. Zinc deficiency enhanced NAD(P)H-dependent superoxider radical production in plasma membrane vesicles isolated from roots of bean plants. *Journal of Experimental Botany*, 45(1), 45-50.
- Piotrowska-Niczyporuk, A., Bajguz, A., Zambrzycka, E., Godlewska-Żyłkiewicz, B., 2012. Phytohormones as regulators of heavy metal biosorption and toxicity in green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). *Plant Physiology and Biochemistry*, 52, 52-65.
- Pisoschi, A. M., Pop, A., 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A Review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55-74.
- Qian, H., Yu, S., Sun, Z., Xie, X., Liu, W., Fu, Z., 2010. Effects of copper sulfate, hydrogen peroxide and N-phenyl-2-naphthylamine on oxidative stress and the expression of genes involved photosynthesis and microcystin disposition in *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Toxicology*, 99(3), 405-412.
- Rains, D. W., 1972. Salt transport by plants in relation to salinity. *Annual Review of Plant Physiology*, 23(1), 367-388.
- Ralph, P. J., Burchett, M. D., 1998. Photosynthetic response of *Halophila ovalis* to heavy metal stress. *Environmental Pollution*, 103(1), 91-101.
- Ramarathnam, N., Ochi, H., Takeuchi, M., 1997. *Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects and Applications*. Canada: AOCS.
- Rao, A. C., Reddy, A. R., 2008. Glutathione reductase: a putative redox regulatory system in plant cells. *Sulfur Assimilation and Abiotic Stress in Plants*. Springer, Berlin, Heidelberg, 111-147.
- Rausch, T., Wachter, A., 2005. Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. *Trends in Plant Science*, 10(10), 503-509.

- Reiter, R. J., Melchiorri, D., Sewerynek, E., Poeggeler, B., Barlow-Walden, L., Chuang, J., Ortiz, G. G., AcuñaCastroviejo, D., 1995. A Review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *Journal of Pineal Research*, 18(1), 1-11.
- Reynolds, G. L., Hamilton-Taylor, J., 1992. The role of planktonic algae in the cycling of Zn and Cu in a productive soft-water lake. *Limnology and Oceanography*, 37(8), 1759-1769.
- Río, L. A. D., Pastori, G. M., Palma, J. M., Sandalio, L. M., Sevilla, F., Corpas, F. J., Jiménez, A., López-Huertas, E., Hernández, J. A., 1998. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiology*, 116(4), 1195-1200.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., Stanier, R. Y., 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Microbiology*, 111(1), 1-61.
- Sabatini, S. E., Chaufan, G., Juárez, Á. B., Coalova, I., Bianchi, L., Eppis, M. R., de Molina, M. D. C. R., 2009. Dietary copper effects in the estuarine crab, *Neohelice (Chasmagnathus) granulata*, maintained at two different salinities. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 150(4), 521-527.
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., Vaca-Garcia, C., 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265-278.
- Sandalio, L. M., Dalurzo, H. C., Gomez, M., Romero-Puertas, M. C., Del Rio, L. A., 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany*, 52(364), 2115-2126.
- Scandalios, J. G., 1997. Molecular genetics of superoxide dismutases in plants. *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Cold Spring Harbor Monograph Archive, 34, 527-568.
- Selçukoğlu, M., 2005. Florlu Gruplar İçeren Ftalosiyaminler, İstanbul: İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Sen, S., Chakraborty, R., 2011. Oxidative stress: diagnostics, prevention, and therapy. *The Role of Antioxidants in Human Health*, 1083, 1-37.
- Sgherri, C. L. M., Loggini, B., Puligaa, S., Navari-Izzo, F., 1994. Antioxidant system in *Sporobolus stapfianus*: Changes in response to desiccation and rehydration. *Phytochemistry*, 35(3), 561-565.
- Sharma, B., 2014. Oxidative stress in HIV patients receiving antiretroviral therapy. *Current HIV Research*, 12(1), 13-21.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., Pessarakli, M., 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012.
- Siripornadulsil, S., Traina, S., Verma, D. P. S., Sayre, R. T., 2002. Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *The Plant Cell*, 14(11), 2837-2847.

- Smirnoff, N., Cumbes, Q. J., 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28(4), 1057-1060.
- Smirnoff, N., Pallanca, J. E., 1996. Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 24(2), 472-478.
- Soto, P., Gaete, H., Hidalgo, M. E., 2001. Assessment of catalase activity, lipid peroxidation, chlorophyll-*a*, and growth rate in the freshwater green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to copper and zinc. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 39(2), 280-285.
- Surosz, W., Palinska, K. A., 2004. Effects of heavy-metal stress on cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48(1), 40-48.
- Tanyolaç, J., 2011. *Limnoloji*. Baskı 6. Ankara: Hatipoğlu Yayınevi.
- Tedone, L., Hancock, R. D., Alberino, S., Haupt, S., Viola, R., 2004. Long-distance transport of l-ascorbic acid in potato. *BMC Plant Biology*, 4(1), 16.
- Thomas, A. L., 1990. *Phthalocyanine Research and Applications*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Tiwari S., Tiwari S., Singh M., Singh A., Prasad S. M., 2017. *Reactive Oxygen Species in Plants: Boon Or Bane - Revisiting the Role of ROS*. USA: John Wiley, Sons.
- Tripathi, B. N., Mehta, S. K., Amar, A., Gaur, J. P., 2006. Oxidative stress in *Scenedesmus* sp. during short-and long-term exposure to Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>. *Chemosphere*, 62(4), 538-544.
- Vaahtera, L., Brosché, M., Wrzaczek, M., Kangasjärvi, J., 2014. Specificity in ROS signaling and transcript signatures. *Antioxidants and Redox Signaling*, 21(9), 1422-1441.
- Venekamp, J. H., Lampe, J. E. M., Koot, J. T. M. T., 1989. Organic acids as source of drought-induced proline synthesis in field bean (*Vicia faba* L.) plants. *Journal of Plant Physiology*, 133(6), 654-659.
- Wang, S., Melnyk, J. P., Tsao, R., Marcone, M. F., 2011. How natural dietary antioxidants in fruits, vegetables and legumes promote vascular health. *Food Research International*, 44(1), 14-22.
- Wang, S. Y., Jiao, H. J., Faust, M., 1991. Changes in ascorbate, glutathione, and related enzyme activities during thiazuron-induced bud break of apple. *Physiologia Plantarum*, 82(2), 231-236.
- Weimberg, R., 1987. Solute adjustments in leaves of two species of wheat at two different stages of growth in response to salinity. *Physiologia Plantarum*, 70(3), 381-388.
- Weydert, C. J., Cullen, J. J., 2010. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature Protocols*, 5(1), 51-66.
- Wong, P. K., Chang, L., 1991. Effects of copper, chromium and nickel on growth, photosynthesis and chlorophyll-*a* synthesis of *Chlorella pyrenoidosa* 251. *Environmental Pollution*, 72(2), 127-139.

- Xyländer, M., Braune, W., 1994. Influence of Nickel on the green alga *Haematococcus lacustris* rostafinski in phases of its life cycle. *Journal of Plant Physiology*, 144(1), 86-93.
- Zhang, F. Q., Wang, Y. S., Lou, Z. P., Dong, J. D., 2007. Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorhiza*). *Chemosphere*, 67(1), 44-50.
- Zhou, R., Josse, F., Göpel, W., Z. Z. Öztürk, Ö. B., 1996. Phthalocyanines as Sensitive Materials for Chemical Sensors. *Applied Organometallic Chemistry*, 10(8), 557-577.

## ÖZGEÇMİŞ

Ayşe Gül TEKBABA, 20.03.1991'de Üsküdar'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini İstanbul'da tamamladı. 2009 yılında Yaşar Dedeman Lisesi'nden mezun oldu. 2010 yılında Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne başladı. Lisans eğitimini 2015 yılında tamamladı. 2017 yılında Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü'nde yüksek lisans eğitimine başladı. Aynı yıl Tenis Eskrim Dağcılık Spor Kulübü Eğitim ve Geliştirme Vakfı'nda spor okulları koordinatör yardımcısı olarak görev aldığı birimde koordinatör olarak çalışmaktadır.