

AĞIR METAL (Cu^{2+} , Cd^{2+}) STRESİ UYGULANAN *Lavandula angustifolia* (LAVANTA) VE *Salvia rosmarinus* (BİBERİYE) BİTKİLERİNİN TOPLAM FENOLİK, ANTİOKSİDAN, KLOROFİL VE KAROTENOİD MİKTARININ BELİRLENMESİ

Abayhan Buran^{1*}, Murat Ersin Durğun², Erhan Karaman¹

¹ Firat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, ELAZIĞ

² Firat Üniversitesi, Merkez Laboratuvarı, ELAZIĞ

Öz

Bu çalışmada, ağır metal stresi uygulanan *Lavandula angustifolia* (Lavanta) ve *Salvia rosmarinus* (Biberiye) bitkilerinin Toplam Fenolik, Antioksidan, Klorofil ve Karotenoid miktarları belirlenmiştir. Ağır metal olarak bakır (II) ve kadmiyum (II) kullanılmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, ağır metal stresi uygulanan grupta toplam karotenoid miktarında bir düşüş yaşanmıştır. Kontrol grubu kıyas alınarak ağır metal grubuna ait sonuçlara bakıldığında, her iki bitki için toplam klorofil, klorofil-a ve klorofil-b miktarlarında bir azalma gözlemlenmiştir. Yapılan analizler ve ölçümler sonucunda 1 mM bakır çözeltisi ve 100 µM kadmiyum çözeltisi ile ağır metal stresi uygulanan bitkilerin etanol, metanol ve su çözücüleri için toplam fenolik, toplam antioksidan, toplam klorofil ve karotenoid miktarları belirlenmiştir. Ağır metal ve kontrol gruplarına uygulanan analizlerle birlikte ağır metal stresi uygulanan bitkiler ve kontrol grubundaki bitkiler için gözlemlenen farklılıklar ortaya konmuştur. Ağır metal uygulanan grupta, kontrol grubuna kıyasla, toplam antioksidan madde ve toplam flavonoid madde miktarında bir miktar artış gözlemlenmiştir. Çalışmadaki ağır metal uygulamasının, bitki yaprakları üzerindeki değişikliklere sebep olup olmadığını gözlemlemek için SEM görüntüleri incelenmiştir. Sonuç olarak ağır metal stresinde antioksidan ve fenolik madde miktarının arttığı, toplam klorofil ve toplam karotenoid miktarının ise azaldığı gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ağır metal, antioksidan, *Lavandula angustifolia*, *Salvia rosmarinus*, toplam klorofil.

DETERMINATION OF TOTAL PHENOLIC, ANTIOXIDANT, CHLOROPHYLL AND CAROTENOID AMOUNTS OF *Lavandula angustifolia* (LAVENDER) AND *Salvia rosmarinus* (ROSEMARY) UNDER HEAVY METAL (Cu^{2+} , Cd^{2+}) STRESS

Extended Abstract

In this study, Total Phenolic, Antioxidant, Chlorophyll and Carotenoid amounts of *Lavandula angustifolia* and *Salvia rosmarinus* plants subjected to heavy metal stress were determined. Copper and cadmium were used as heavy metals. A decrease in total chlorophyll (Cl), chlorophyll-a (Cl-a), chlorophyll-b (Cl-b) and carotenoid amounts was observed for both plants. It was observed that there was an increase in the amount of total antioxidant and total phenolic substance. According to the results of *S. rosmarinus* for the amount of phenolic substances, 81.70±1.68 mg/g GAE for the control group; 84.60±2.09 mg/g GAE for the heavy metal group. According to the antioxidant substance content results, 3.92±0.08 mmol/g TEAC for the control group; 4.02±0.01 mmol/g TEAC for the heavy metal group. According to the results for *L. angustifolia* for phenolic amounts, 80.05±2.25 mg/g GAE for the control group; 88.65±2.52 mg/g GAE for the heavy metal group. According to the antioxidant substance content results, 3.91±0.01 mmol/g TEAC for the control group; It was obtained as 3.99±0.01 mmol/g TEAC for the heavy metal group. Total Cl amount was determined 1.71±0.03 mg/g for *S. rosmarinus* control group, 1.04±0.02 mg/g for heavy metal group. Cl-a amount was 0.42±0.02 mg/g for the control group, 0.25±0.02 mg/g for the heavy metal group. Cl-b amount was 0.69±0.02 mg/g for the control group, 0.35±0.01 mg/g for the heavy metal group. The total amount of carotenoids was determined as

*Sorumlu Yazar (Corresponding Author):

Abayhan BURAN; Firat University, Engineering Faculty, Department of Bioengineering, 23119, Elazig-Turkey.

Geliş (Received) : 20.04.2022

Kabul (Accepted) : 20.07.2022

Basım (Published) : 31.07.2022

0.24±0.01 mg/g for the control group and 0.20±0.01 mg/g for the heavy metal group. Total Cl amount was 0.80±0.02 mg/g for *L. angustifolia* control group, 0.68±0.03 mg/g for heavy metal group. The amount of Cl-a was 0.25±0.01 mg/g for the control group, 0.22±0.01 mg/g for the heavy metal group. The amount of Cl-b was 0.30±0.01 mg/g for the control group, 0.29±0.01 mg/g for the heavy metal group. Total carotenoid amount was determined as 0.14±0.02 mg/g for the control group and 0.11±0.01 mg/g for the heavy metal group. As a result of the analyzes, the total phenolic, total antioxidant, total chlorophyll and carotenoid amounts of rosemary and lavender plants were determined. SEM images were examined to observe whether the heavy metal application in the study caused changes on the plant leaves. It was observed that there was a decrease in the amounts of chlorophyll and carotenoids, and an increase in the amounts of antioxidants and phenolic substances.

Key Words: Heavy metal, antioxidant , *Lavandula angustifolia*, *Salvia rosmarinus*, total chlorophyll.

1. Giriş

Artan dünya nüfusu ve sınırlı alan sebebiyle yapılan araştırmalar sonucu 2050 yılına kadar insan nüfusunun 10 milyarı bulacağı tahmin edilmekle beraber besin oranının nüfusa kıyasla daha düşük kalacağı düşünülmektedir (Carvalho, 2017). Temel besin kaynağı olarak bitkiler ve hayvanlar görülmektedir. Bu sebeple üretim esaslarına verilecek zararların minimuma indirilmesi öngörülmektedir. Bitkilerde gelişimi yavaşlatan, verimi azaltan ve durduran tüm etkiler stres faktörü olarak adlandırılmaktadır. Stres faktörleri biyotik ve abiyotik olmak üzere iki grup altında incelenmektedir (Taiz & Zieger, 2002). Biyotik stres faktörleri, canlı sistemleri (yabani bitkiler, hayvanlar, böcekler, mikroorganizmalar) ele alırken, abiyotik faktörler daha çok çevresel sorunlar (kuraklık, radyasyon, zirai ilaçlar, tuzlar ve ağır metaller, yüksek ve düşük sıcaklık) olarak belirtilmektedir. Abiyotik şartlar genel olarak bitki türünün yetiştiği coğrafyalar hakkında bilgi veren grup olarak nitelendirilmektedir.

Bitkisel üretim aşamalarında verim ve kaliteyi düşüren, toprağın, suyun ve havanın yapısında bozulmalara neden olan en büyük faktörlerden biri ağır metallerin sebep olduğu kirliliktir (Ruis-Jiménez vd., 2003). Ağır metaller doğada doğal olarak bulunmakla birlikte endüstriyel atıklar ile de havaya salınabilmektedir (Urano vd., 2010). Ekosisteme verdiği zararlardan sonra besin zinciri vasıtasıyla canlı sistemden sisteme aktarılan ağır metaller uzun yıllar boyunca zararlarını sürdürebilmekte ve havada, suda ve toprakta artarak bitkisel üretim ve kalitesinde azalmalara neden olmaktadır. Bitkiler ağır metallere maruz kaldığında toksik etkiyi azaltmak için birçok işleme ihtiyaç duyarlar. Bu işlemler gen ekspresyonu, protein modifikasyonları, biyokimyasal işlevler, fizyolojik işlevler, metabolik içeriklerdeki değişimler olarak gösterilebilir (Urano vd., 2010).

Ağır metaller bitkinin büyümesi ve gelişmesi için gerekli besin elementlerine benzedikleri için köklerden rahatlıkla bitkiye girebilmektedirler. Yapısal benzerlikleri sebebiyle taşınım mekanizmalarıyla ile bitkinin diğer bölgelerine yayılmaktadır (Ma vd., 2008). Zararlı etkisini gösteren ağır metaller bitkide hasarlar oluşturmada, insan ve tüm ekosistemi tehdit etmektedir (Satarug vd., 2003). Bu sebeple ağır metallerin uzaklaştırılması çevreye salınımının önlenmesi oldukça önem arz etmektedir.

Ağır metaller, atom numarası 20'den büyük olup yoğunluğu 5 g/cm³'den fazla olan metaller olarak tanımlanmışlardır. Ağır metaller, fizyologlar tarafından toksik etkisi olan ve biyolojik yapıda biriken metaller olarak adlandırılmıştır. Kadmiyum, çinko, demir, krom, kobalt, nikel, civa ağır metallerin başlıca bilinenleridir.

Ağır metaller toprakta iyon değişimi ve kolloidal adsorpsiyona sebep olur ve bunun sonucunda bu zararlı bileşenler toprakta birikerek biyoelverişliliği azaltmaktadır (Algan & Bilen, 2005). Birikme ile artan toksik etkinin büyümesiyle beraber bitkinin kökünde oluşan hasarlar nedeniyle, bitki tarafından alınan besin elementlerinin miktarında azalma, bununla birlikte büyüme ve gelişmesinde yavaşlamasına ve enzim aktivitesinde bozulma meydana gelmektedir (Ahsan vd., 2009). Bunun yanında ağır metal stresi hücrede serbest radikalin artışı teşvik ettiği için oksidatif hasarlar oluşmaktadır. Serbest radikallerin artması ile kloroplasttaki fotosentez reaksiyonu zarar vermektedir. Ağır metal stresine maruz kalmış bitkilerde özellikle bitkinin fotosentez ile ilgili proteinleri zarar gördüğü yapılan araştırmalarla tespit edilmiştir. Fotosentezde önemli bir rolü bulunan ve karbon metabolizmasının ön basamağında yer alan RuBisCo (ribuloz 1,5-bifosfat karboksilaz/oksijenaz) çözünebilir yaprak proteininin yaklaşık olarak %30-70'ini oluşturmaktadır. Ağır metal stresine maruz kalan bitkilerde RuBisCo aktive oranının oldukça düştüğü belirtilmiştir (Nováková vd., 2004). Ayrıca ağır metallere maruz kalmış bitkilerde, fotosentezin ışık evresiyle ilgili proteinlerin, klorofil sentezi ile ilgili proteinlerin ve karbon bağlanması sağlayan proteinlerin azaldığı görülmüştür.

Bu çalışmada lavanta (*Lavandula angustifolia*) ve biberiye (*Salvia rosmarinus*) bitkileri kullanılmış ve ağır metal uygulamalarının bu bitkiler üzerindeki çeşitli etkileri incelenmiştir. Toplam fenolik ve toplam antioksidan madde miktarları ile toplam klorofil ve karotenoid miktarı tayini yapılmıştır. Bunlara ek olarak ağır metal ve kontrol gruplarının SEM görüntüleri alınmış ve incelenmiştir.

2. Literatür Bilgileri

Çevre kirleticiler son zamanlarda insanlığın en büyük sorunlarından biridir. Çevre sorunları arasında ağır metallerin sebep olduğu kirlilikler de yerini almaktadır. Ağır metallerin toprakta birikmesi, toprak verimliliği ve ekosistem üzerinde olumsuz etkiler yaratıyor olsa da negatif etkileri bununla sınırlı kalmamaktadır. Ağır metallerin toprakta birikmesiyle birlikte besin zincirine dahil olduğu, bu zincirin halkalarını oluşturan havyan ve insan sağlığı üzerinde negatif etkileri olduğu bilinmektedir. Bitkilerin topraktan aldığı ağır metalleri bünyesine dahil etmesiyle bitkilerde; verim ve fizyolojik aktivite düşüşleri, ürünlerde metal birikimi, kalite ve miktarda düşüş ve hatta bitki ölümleri gibi etkiler meydana gelmektedir. Bitkilerin ağır metal stresine karşı dayanımları hangi tür bitki olduğuna, ağır metal stresine maruz kaldığı zamana, ağır metalin türüne ve bitkinin strese maruz kalan kısımlarına bağlı olarak değişmektedir. Tüm bunlar göz önüne alındığında ağır metal türleri ve toksik konsantrasyonları, bitki için gerekli olduğu miktarlar, bitkinin toleransı, zararın şiddeti ve oluşum süreci iyi bilinmelidir. Bu faktörler gibi bitkilerin gelişimi ve canlılığı açısından kritik olan bilgiler göz önünde bulundurulmalıdır (Öktüren Asri & Sönmez, 2007).

2.1. Ağır Metaller ve Çevre

Ağır metalin tanımı daha çok çevresel problemler olduğunda ortaya çıkmaktadır. Bu metaller nispeten yüksek yoğunluğa sahip metaller olarak tanımlanmaktadır. Ağır metaller düşük konsantrasyonlarda bile zehirleyici ya da toksik etki gösterirler. Ağır metaller yoğunluğu 5 g/cm³'ten büyük olan metaller olarak tanımlanmıştır. Bu grubun içine 60'tan fazla metal girmektedir. Bunlardan bazıları ve en önemlileri kadmiyum (Cd), kobalt (Co), krom (Cr), demir (Fe), bakır (Cu), nikel (Ni), kurşun (Pb), civa (Hg) ve çinko (Zn)'dur (Kahvecioğlu vd., 2006). Ağır metallerin toksisiteyi bulduğu yapıya, ağır metalin konsantrasyonuna, etki süresine, etki yerine, etkileşimde olduğu türlere vb. değişkenlere bağlı olarak değiştiği bildirilmektedir (Okcu vd., 2009). Metaller doğal olarak meydana gelmekte ve bazıları küresel ekosistemlerin gerçek parçalarını oluşturmaktadır (Raven vd., 1999). Bu durumun bir sonucu olarak ağır metaller toprakta birikmekte ve bu birikme bir kirlilik oluşturmaktadır. Bu metal kirliliği global ölçekte canlı ekosistemi bir şekilde etkilemektedir (Cunningham vd., 1997; Meagher, 2000).

Ağır metallerin bir üyesi olan bakırın kullanımı oldukça yaygın olduğu için bakırın sebep olduğu kirliliğin birçok farklı kaynağı mevcuttur. Bu ağır metalin proseslerde veya paketlemelerde kullanılması ürünleri kirlitebilir ve çevreye zarar verebilir (Nuhoğlu vd., 2002).

Önemli bir ağır metal olan kadmiyum ise oldukça toksik, çevre kirliliği ve toksisite konusunda gündeme gelen ve çeşitli sayıda kullanım alanına sahip bir elementtir. Kadmiyum doğada saf olarak bulunmamakla birlikte nadir bir elementtir. Çok düşük dozlarda bile toksik etki yaratması ve biyolojik yarılanma ömrünün uzun olması sebebiyle çevresel açıdan oldukça önemli bir kirleticidir (Goyer, 1991; Lyons-Alcantara vd., 1996).

2.1.1. Kadmiyum

Kadmiyum, 48 atom numarasına sahip olup periyodik tablonun 5. periyodunun 2B grubunda yer almaktadır. Kısaca "Cd" ile gösterilir. Doğada toprakta, havada, suda bulunan ağır bir metal olup önemli bir çevre kirleticisidir. Toprak kabuğunda yaklaşık olarak 0.1-1.0 ppm konsantrasyon aralığında bulunmaktadır. Toprakta saf bir halde bulunmayan kadmiyum, sülfid, kadmiyum klorür, kadmiyum sülfat ve kadmiyum oksit gibi temsil edilmektedir. İnsan ve hayvan sağlığı için toksik etkisi bulunan kadmiyumun, parçacıkları ve dumanları birçok organda hasarlara sebebiyet vermektedir (Swiergosz vd., 1998; Fornazier vd., 2002). Kadmiyum, ayrıca hücre membranına, hücrenin enzim aktivitesine ve DNA'ya zarar vererek protein sentezindeki engellemelere sebebiyet vermektedir.

2.1.2. Bakır

Bakır, 29 atom numarasına sahip olup periyodik cetvelin 4. periyodunun 1B grubunda yer almaktadır ve "Cu" ile gösterilmektedir. Bakır elementi bitkilerde enzim aktivasyonu, karbonhidrat ve lipid metabolizmasında yer alan

bitkilerin gelişmesi ve yaşam koşulları için çok önemli bir mikro besin elementidir. (Kacar & Katkat, 2006). Bakır miktarının toprakta 100 mg/kg fazla ise ve incelenen bitki kuru maddesinde 30 mg/kg mevcut ise toksik etkiye sebep olduğu belirtilmektedir. Bakır kirliliğine atmosferik olaylar, zirai ilaçların kullanımı, gübre sektöründe kanalizasyon atıklarının kullanılması ve kömür ve maden yataklarının mevcut durumu etkili olabilmektedir. Bakırın toksik etkisi sonucu bitkinin özellikle kök sistemleri zarar görerek fotosentez olaylarında, enzim aktivitesinde, solunum ve membran stabilitesinde bozulmalar meydana gelmektedir (Sossé vd., 2004; Ouzounidou, 1994).

2.2. *Lavandula angustifolia* (Lavanta)

Ülkemizde İngiliz Lavantası olarak da bilinen *Lavandula angustifolia*, çiçekli bitkilerin ana familyası olarak kabul edilen Lamiaceae familyası *Lavandula* L. cinsine ait bir türdür (Şahin, 2017; Upson, vd., 2004; Benabdelkader vd., 2011). Lamiaceae familyası, dünyanın her yerinde yetişen bir familya olmakla birlikte güzel kokusu ve çiçekleri sebebiyle birçok türünün yapıldığı belirtilmiştir.

Lavanta çiçekleri, sapların üst bölümünde dairesel olarak dizilmiş ve her dairede birkaç adet çiçek bulunmaktadır. Genel olarak mor renkle bilinse de, mavi, pembe ve beyaz tonlu lavantalar da mevcuttur (Góra vd., 2005). Kurutulmuş lavanta çiçekleri ve çiçeklerinden elde edilen yağlar, güzel kokuları sebebiyle kozmetikte ve içerdikleri antimikrobiyal ve antioksidan bileşikleri sebebiyle yiyeceklerin ve kozmetik sektörünün raf ömrünü uzatmada kullanılmaktadır (Deans, 2002). Lavanta, yılda 300 mm - 1400 mm yıllık yağışlı bölgelerde kolaylıkla yetişebilmekle beraber kışın soğuğuna ve yaz kuraklığına dayanabilmektedir (Balyemez, 2014).

2.3. *Salvia rosmarinus* (Biberiye)

Salvia rosmarinus, ülkemizde Biberiye olarak da bilinen uzun ömürlü ve yaprakları iğneye benzer şekilde uzayan ve yaprak dökmeyen aromatik bir bitkidir. (Bousbia vd., 2009). Tracheophyta Şubesi, Angiosperms Sınıfı, Lamiales takımı, Lamiaceae ailesi; *Salvia* cinsine aittir. 2017 yılına kadar (*Rosmarinus officinalis* L.) olarak bilinmektedir. Özellikle Akdeniz ülkelerinde yetişen Biberiye bitkisi ağırlıklı olarak İtalya, İspanya, Türkiye, Mısır, Portekiz, Yunanistan, Fransa ve Kuzey Afrika gibi ülkelerde yetişmektedir (Atti-Santos vd., 2005). *S. rosmarinus*, yoğun hoş koku, lavanta benzeri yaprakları ve her zaman yeşil kalma özelliklerine sahip kokulu bir çalıdır ve çiçeklenme mevsimi Nisan'dan Ağustos'a kadar sürebilmektedir (Lo Presti vd., 2005).

2.4. Karotenoidler

Bitkinin dokularındaki plastidlerde yerleşik durumda bulunan, hem fotosentetik olan hem de olmayan, C40 izoprenoidleri veya tetraterpenlerdir. Fotosentetik komplekslerin ışık ile uyarılmasıyla oluşan triplet klorofil ve bazı reaktif oksijen türlerini (ROS) detoksifiye ederler. Aynı zamanda bitkide ışık alımında aksesuar pigment fonksiyonları bulunmaktadır. Karotenler ve ksantofiller karotenoidlerin iki sınıfını oluşturmaktadır. Karotenler hidrokarbon yapıdadırlar, ksantofiller ise karotenlerin bir türevidir. Genel olarak bir veya iki oksijen atomu içermektedir (McKersie & Leshem, 1994).

3. Materyal ve Metot

3.1. Materyal

Yapılan çalışmada biberiye (*Salvia rosmarinus*) ve lavanta (*Lavandula angustifolia*) bitkileri kullanılmıştır. Yaprak yapıları benzer bitkilerdir. İki bitki de Lamiaceae familyasına mensuptur. Biberiye ve lavanta bitkileri bir seradan satın alım yoluyla elde edilmiştir. Bitkiler 5-6 aylık bitkilerden seçilmiştir. Bitkilerin çalışmaya başlanmadan hemen önceki 3 sulamalarında saf su kullanılmıştır.

3.1.1. Kullanılan Çözeltiler ve Cihazlar

Ağır metal uygulamalarında 1 mM bakır çözeltisi ve 100 µM kadmiyum çözeltisi birlikte kullanılmıştır. Bakır çözeltisi için $CuSO_4 \cdot 7H_2O$ ve kadmiyum çözeltisi için $CdSO_4$ kimyasalları kullanılmıştır.

Toplam fenolik madde analizleri için 2 N Folin-Ciocalteu çözeltisi stok olarak kullanılmıştır. Analizler sırasında Folin-Ciocalteu reaktifi 10 kat seyreltilerek kullanılmıştır. %7.5'lik Na₂CO₃ çözeltisi ve %2'lik AlCl₃ çözeltisi hazırlanmıştır.

Fosfat tampon çözeltisi (50 mmol/L) K₂HPO₄ ve KH₂PO₄ kullanılarak hazırlanmıştır. Fosfat tamponu için pH 7.2-7.4 aralığında sabitlenecek şekilde ayarlanmıştır. 7 mM ABTS stok çözeltisi hazırlanmıştır. ABTS stok çözeltisi en az 16 saat ışıktan korunan bir erlen içinde karanlık ortamda saklanmıştır. Analiz sırasında ABTS stok çözeltisi seyreltilerek kullanılmıştır.

Kalibrasyon eğrileri ve denklemleri elde etmek için Gallik Asit stok çözeltisi (0,5 mg/ml) ve Troloks (2,5 mmol/L) stok çözeltisi hazırlanmıştır. Kalibrasyon için bu stok çözeltilerin belirli konsantrasyonları seyreltilerek kullanılmıştır.

Yapraklardan elde edilen ekstraktlarda toplam fenolik ve toplam antioksidan madde tayinleri için çözücü olarak metanol (Sigma-Aldrich), etanol (Merck) ve saf su çözücülerini kullanılmıştır. Etanol ve metanol çözücülerini %99 saflıkta olup eşit miktarda kuru örneğe eşit miktarda çözücü ilave edilmiştir. Klorofil ve karotenoid miktarı tayini için %80'lik (w/w) aseton çözeltisi kullanılmıştır. Çözelti, aseton (TEKKİM - %99,5) ve saf su ile hazırlanmıştır.

Spektrofotometrik ölçümlerde Rayleigh VIS-723G Visible spektrofotometre kullanılmıştır. Kurutma işlemleri Nükleon NST55 marka etüvde gerçekleştirilmiştir. SEM görüntüleri ZEISS EVO – MA10 marka SEM cihazı ile alınmıştır.

3.2. Metot

Biberiye (*Salvia rosmarinus*) ve lavanta (*Lavandula angustifolia*) bitkilerinin yaprakları gövdeyle birleşim noktalarından ayrılmıştır. Yaprak kısımları 60 °C'de 48 saat etüvde kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan yapraklar yüzey alanının artması maksadıyla küçük parçalara ufaltılmıştır. Ağır metal ve kontrol grupları ayrılmış ve 0.1 g kuru materyale 4 ml çözücü oranıyla kuru yapraklar çözücülerle karıştırılmıştır. 4 °C'de 48 saat boyunca muhafaza edilmiştir. Klorofil ve karotenoid analizleri için aseton çözücüsü kullanılmıştır. Asetonla muamele edilen kuru yaprak örnekleri 24 saat 4 °C'de muhafaza edilmiştir. Daha sonra hazırlanan ekstraktlar filtre kâğıdı yardımıyla süzülerek analizler için kullanılmıştır.

3.2.1. Ağır Metal Uygulaması

Ağır metal ve kontrol olmak üzere iki gruba ayrılan bitkilerin son üç sulamaları saf su ile yapılmıştır. Saf su ile yapılan son sulamadan 48 saat sonra ağır metal uygulamasına başlanmıştır. Bu süreçten sonra ağır metal grubu 1 mM bakır çözeltisi ve 100 µM kadmiyum çözeltisi ile üç defa sulanmış ve kontrol grubu ise saf su ile üç kez daha yeterli miktarda sulanmıştır. Son ağır metal uygulamasından 24 saat sonra bitki yapraklarının toplanması işlemi gerçekleştirilmiş ve etüvde kurutulmuştur.

3.2.2. Klorofil ve Karotenoid Miktarı Tayini

Klorofil ve karotenoid miktarının ölçümü için örnekler hazırlanmıştır. Örneklerin konsantrasyonu Arnon (1949) yöntemiyle hesaplanmıştır. Bu yöntemde ağır metal ve kontrol grupları hacimce %80 aseton çözeltisiyle muamele edilmiştir. Filtre kâğıdı ile süzülen ekstraktların absorbansı UV-VIS spektrofotometrede ölçülmüştür. Toplam klorofil miktarı için 652 nm dalga boyunda, klorofil-a miktarı için 663 nm dalga boyunda, klorofil-b miktarı için 645 nm dalga boyunda ve karotenoid miktarı için de 470 nm dalga boyunda ekstraktların absorbansları ölçülmüştür. Farklı dalga boylarında ölçülen absorbanslar Lichtenthaler & Wellburn (1983) tarafından verilen formüllerde yerine koyularak hesaplamalar gerçekleştirilmiştir. Formüller aşağıda gösterilmiştir.

$$\text{Toplam Klorofil Miktarı (mg/g)} = (A_{652} \times 27.8) / g$$

$$\text{Klorofil - a Miktarı (mg/g)} = ((11.75 \times A_{663}) - (2.35 \times A_{645})) \times V / g$$

$$\text{Klorofil - b Miktarı (mg/g)} = ((18.61 \times A_{645}) - (3.96 \times A_{663})) \times V / g$$

$$\text{Karotenoid Miktarı (mg/g)} = [((1000 \times A_{470}) - (2.27 \times K_{la}) - (81.4 \times K_{lb})) / 227] \times V / g$$

Burada V: ekstrakt hacmini, g: örnek hacmini (mg), K_{la}: Klorofil-a, K_{lb}: Klorofil-b ve A^{xxx}: belirli dalga boylarındaki absorpsanları ifade etmektedir.

3.2.3. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini

Bu çalışmada toplam fenolik madde analizi Folin-Ciocalteu metoduna göre uygulanmıştır (Singleton & Rossi, 1995). 300 µl ekstrakt ile 10 kat seyreltilmiş 1.5 ml 2 N Folin-Ciocalteu reaktifi cam tüpler içinde karıştırılmış ve 2 dakika bekleme süresinden sonra 1.2 ml %7.5 Na₂CO₃ çözeltisi eklenmiştir. Karışımlar vorteks ile karıştırılmış ve 25 °C'de 90 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Karanlık ortamdan çıkarılan örneklerin absorpsansı 765 nm dalga boyunda kör olarak saf suya karşı okunmuştur.

Toplam fenolik madde içeriği gallik asit kalibrasyon grafiğinden elde edilen denklem ile gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak verilmiştir. Gallik asidin 5 farklı konsantrasyonuyla (0.1-0.2-0.3-0.4-0.5 mg/ml) ölçülen absorpsans değerleriyle kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur.

3.2.4. Toplam Antioksidan Madde Tayini

Ağır metal ve kontrol gruplarının antioksidan kapasitesi ABTS (2,2'-azonobis(3-etilbenzothiazoline-6-sulfonat)) radikal katyon yakalama yeteneğine göre analiz edilmiştir. Hazırlanan mavi renkteki ABTS çözeltisinde, antioksidan içerik nedeniyle ABTS^{•+} katyonu parçalanmıştır ve bu sayede çözeltinin renginde bir açılma görülmüştür. Rengin açılması antioksidan içeriğinin olduğunu gösteren bir işlemdir (Miller vd., 1995).

ABTS stok çözeltisi, çözeltinin absorpsansı yaklaşık olarak 0,7'ye sabitleninceye kadar fosfat tamponuyla seyreltilmiştir ve olabildiğince ışıktan korunmuştur. Analiz için 1900 µl seyreltilmiş ABTS ve 100 µl ekstrelerden eklenmiş ve karıştırılmıştır. Bu karışımların absorpsansı 734 nm dalga boyunda UV-VIS spektrofotometrede fosfat tamponuna karşı okunmuştur. Bu yöntemle elde edilen sonuçlar troloks eşdeğer antioksidan kapasite (TEAC) olarak adlandırılır. Kalibrasyon grafiği troloksun 5 ayrı konsantrasyonuna (0,05-0,1-0,2-0,3-0,4 mmol/L) karşı hesaplanan absorpsans değerlerinin tanık ile farkı alınarak oluşturulmuştur.

3.3. İstatistiksel Bilgiler

Ağır metal ve kontrol grupları için yapılan analizlerde her ölçüm 3 tekrarlı olarak yapılmış ve elde edilen standart sapmalar sonuçlarla birlikte "±" olarak ifade edilmiştir.

4. Sonuçlar

Yapılan analizler ve ölçümler sonucunda 1 mM bakır çözeltisi ve 100 µM kadmiyum çözeltisi ile ağır metal stresi uygulanan biberiye (*Salvia rosmarinus*) ve lavanta (*Lavandula angustifolia*) bitkilerinin toplam fenolik, toplam antioksidan, toplam klorofil ve karotenoid miktarları belirlenmiştir. Ağır metal ve kontrol gruplarına uygulanan aynı analizler sayesinde ağır metal stresi uygulanan bitkilerin ve kontrol grubundaki bitkilerde gözlemlenen farklılıklar ortaya konmuştur. Sonuçlar standart sapmaları ile birlikte verilmiştir. Her iki grup için de toplanan yaprakların SEM görüntüleri elde edilmiş ve yapısal değişiklikler incelenmiştir.

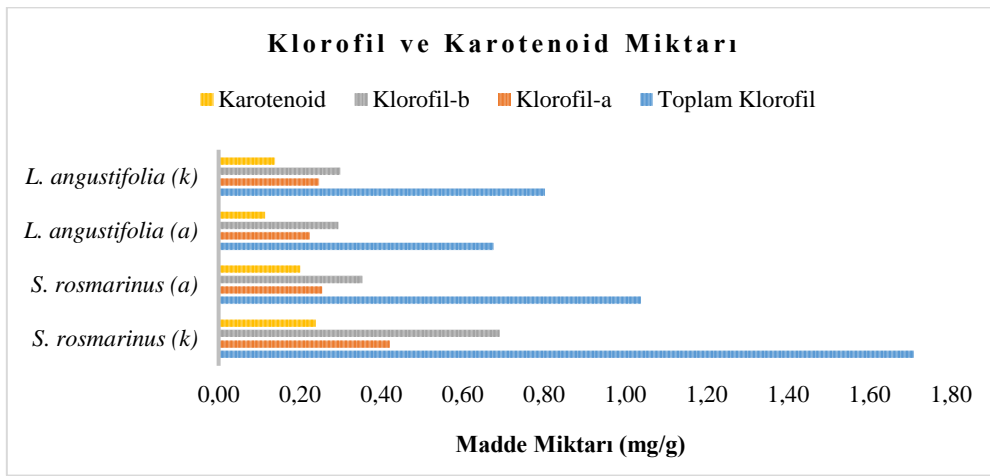
4.1. Klorofil ve Karotenoid Miktarı

Arnon (1949) yöntemiyle hesaplanan miktarlar Tablo 1'de verilmiştir. Belirli dalga boylarında absorpsanları okunan ekstraktların toplam klorofil, klorofil-a, klorofil-b ve karotenoid miktarları belirlenmiştir. Sonuçlara ulaşılırken absorpsanslar Lichtenthaler & Wellburn (1983) tarafından verilen formüllerde yerine yazılmıştır. Deneyler 3 tekrarlı yapılmış ve sonuçlar standart sapmalarıyla birlikte verilmiştir. Sonuçların karşılaştırmalı grafiği Şekil 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Ağır Metal (a) ve Kontrol (k) Gruplarının Toplam Klorofil, Klorofil-a, Klorofil-b ve Karotenoid Miktarları (mg/g).

Gruplar	Toplam Klorofil	Klorofil-a	Klorofil-b	Karotenoid
<i>S. rosmarinus</i> (a)	1,04 ± 0,02	0,25 ± 0,02	0,35 ± 0,01	0,20 ± 0,01
<i>S. rosmarinus</i> (k)	1,71 ± 0,03	0,42 ± 0,02	0,69 ± 0,02	0,24 ± 0,01
<i>L. angustifolia</i> (a)	0,68 ± 0,03	0,22 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,11 ± 0,01
<i>L. angustifolia</i> (k)	0,80 ± 0,02	0,25 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,14 ± 0,02

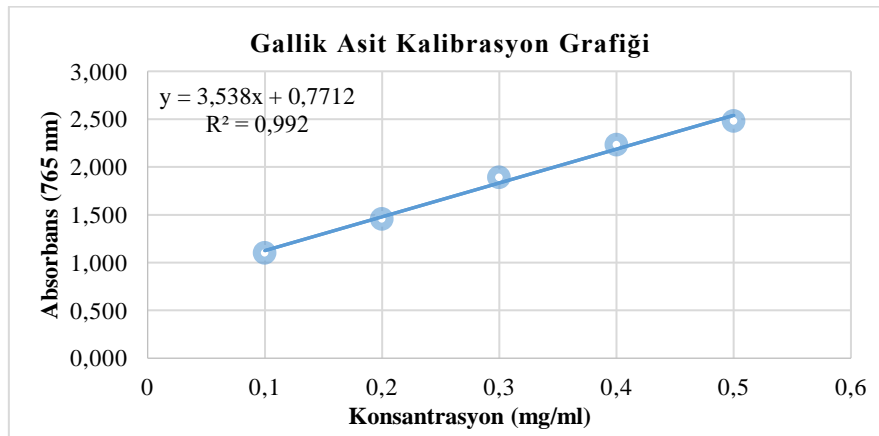
Buna göre ağır metal stresi altında klorofil miktarında bir miktar azalma görülmüştür. Stres faktörleri karotenoid birikimine neden olurken, ağır metal stresi esnasında toplam karotenoid miktarında da bir azalma görülebilmektedir (Munné-Bosch & Penvelas, 2004).



Şekil 1. Ağır metal (a) ve Kontrol (k) Gruplarının Toplam Klorofil, Klorofil-a, Klorofil-b ve Karotenoid Miktarlarının Karşılaştırmalı Grafiği.

4.2. Toplam Fenolik Madde Miktarı

Toplam fenolik madde miktarı analizlerinde kullanılmak üzere bir kalibrasyon eğrisi grafiği oluşturulmuştur. Gallik asidin 5 farklı konsantrasyonu (0.1-0.2-0.3-0.4-0.5 mg/ml) elde edilen absorbans değerleriyle elde edilen grafikte (Şekil 2) R^2 değeri ve doğru denklemi belirlenmiştir (Şekil 2). Analizlerden elde edilen absorbanslar bu kalibrasyon eğrisinden elde edilen $y = 3,538x - 0,771$ denklemine yerine yazılarak sonuçlar gallik asit eşdeğeri (mg/g GAE) olarak elde edilmiştir.



Şekil 2. Gallik Asit Kalibrasyon Grafiği.

Folin-Ciocalteu metoduna göre yapılan analizlerde, 765 nm dalga boyunda okunan değerler kalibrasyon eğrisi yardımıyla GAE olarak Tablo 2’de verilmiştir.

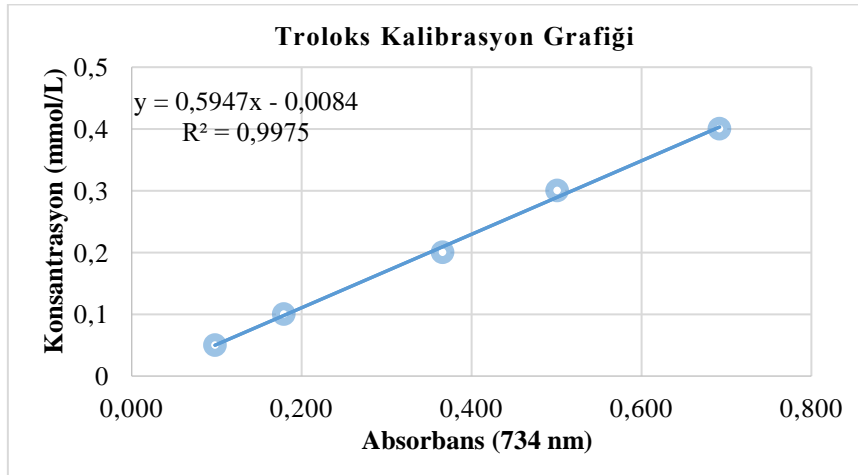
Tablo 2. Ağır metal (a) ve Kontrol (k) Grubu Etanol, Metanol ve Saf Su Ekstraktlarında Toplam Fenolik Madde Miktarları (mg/g GAE).

Gruplar	Etanol	Metanol	Saf Su
<i>S. rosmarinus</i> (a)	69,63 ± 0,78	82,80 ± 0,75	84,60 ± 2,09
<i>S. rosmarinus</i> (k)	55,40 ± 2,41	65,81 ± 2,19	81,70 ± 1,68
<i>L. angustifolia</i> (a)	23,85 ± 1,16	51,03 ± 1,43	88,65 ± 2,52
<i>L. angustifolia</i> (k)	18,80 ± 0,39	65,97 ± 2,35	80,05 ± 2,25

Elde edilen sonuçlara göre her iki bitki için de genel olarak ağır metal uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla daha fazla fenolik madde miktarı elde edilmiştir. Aynı zamanda fenolik madde analizleri için çözücü olarak su kullanılan ekstraktlardan daha fazla fenolik madde miktarı elde edilmiştir. Her iki bitki için de su ekstraktlarından daha yüksek sonuçlar elde edilmiştir.

4.3. Toplam Antioksidan Madde Miktarı

Toplam antioksidan madde miktarı analizlerinde kullanılmak üzere bir kalibrasyon eğrisi grafiği oluşturulmuştur. Troloksun 5 ayrı konsantrasyonundan (0,05-0,1-0,2-0,3-0,4 mmol/L) elde edilen absorbans değerleriyle oluşturulan grafikte (Şekil 3) R² değeri ve doğru denklemi belirlenmiştir. Analizlerden elde edilen absorbanslar bu kalibrasyon eğrisinden elde edilen $y = 0,5947x - 0,0084$ denkleminde yerine yazılarak sonuçlar troloks eşdeğer antioksidan kapasite (mmol/g TEAC) olarak elde edilmiştir.



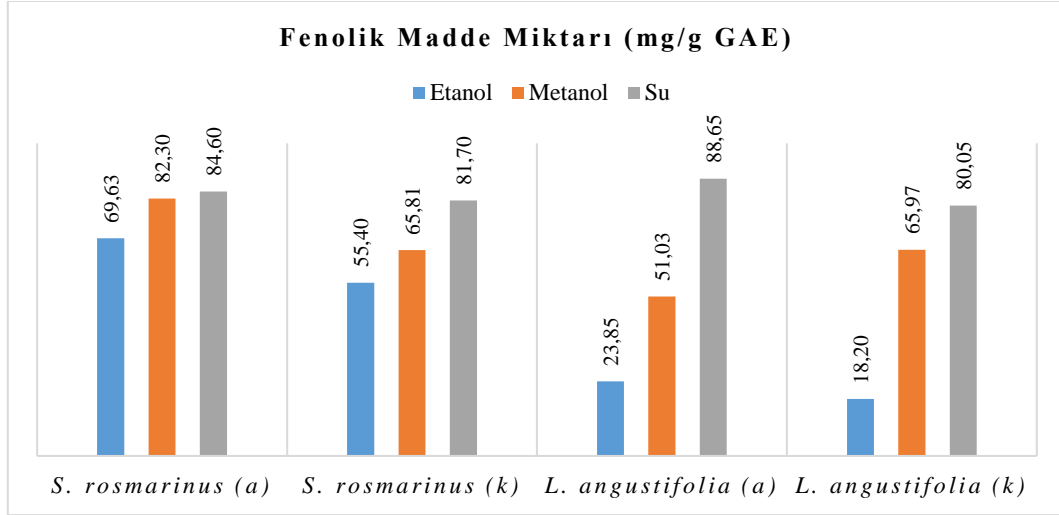
Şekil 3. Troloks Kalibrasyon Grafiği.

ABTS'nin radikal katyon yakalama yeteneğine göre yapılan analizlerde, 734 nm dalga boyunda okunan değerler kalibrasyon eğrisi yardımıyla TEAC olarak Tablo 3’te verilmiştir.

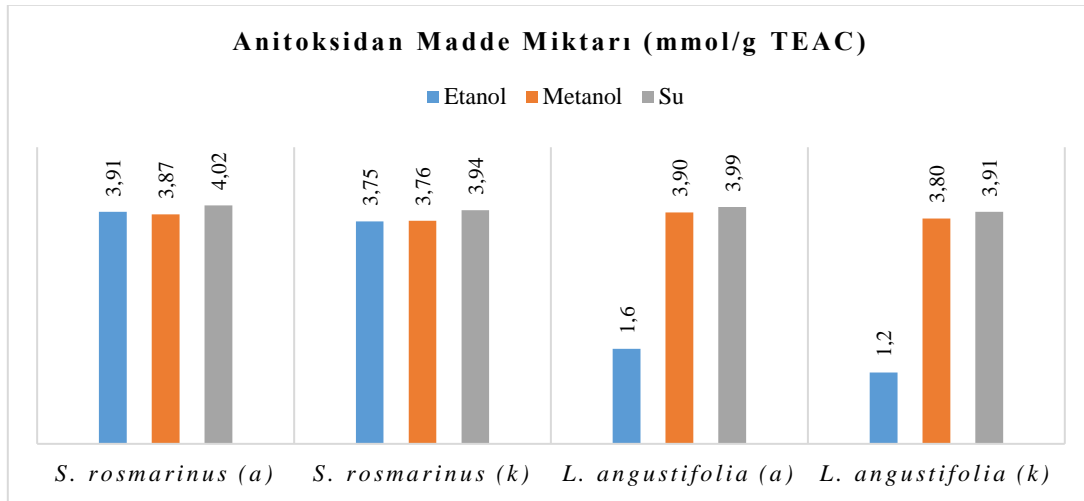
Tablo 3. Ağır Metal (a) ve Kontrol (k) Grubu Etanol, Metanol ve Saf Su Ekstraktlarında Toplam Antioksidan Madde Miktarları (mmol/g TEAC).

Gruplar	Etanol	Metanol	Saf Su
<i>S. rosmarinus</i> (a)	3,92 ± 0,08	3,87 ± 0,04	4,02 ± 0,01
<i>S. rosmarinus</i> (k)	3,75 ± 0,04	3,76 ± 0,04	3,92 ± 0,08
<i>L. angustifolia</i> (a)	1,60 ± 0,05	3,90 ± 0,05	3,99 ± 0,01
<i>L. angustifolia</i> (k)	1,20 ± 0,05	3,80 ± 0,07	3,91 ± 0,01

Elde edilen sonuçlara göre her iki bitki için de ağır metal uygulanan grupta (a) kontrol grubuna (k) kıyasla daha fazla antioksidan madde miktarı elde edilmiştir. *S. rosmarinus* için etanol ve metanol çözücülerinde arasında belirgin bir fark görülmemiştir ancak *L. angustifolia* bitkisinin su ekstraktlarında metanol ve etanol ekstraktlarına kıyasla daha fazla antioksidan madde elde edilmiştir. Toplam fenolik madde ve toplam antioksidan madde miktarları için çözücülerin karşılaştırmalı grafiği Şekil 4 ve Şekil 5'te verilmiştir.



Şekil 4. Toplam Fenolik Madde Miktarları için Çözücülerin Karşılaştırmalı Grafiği.

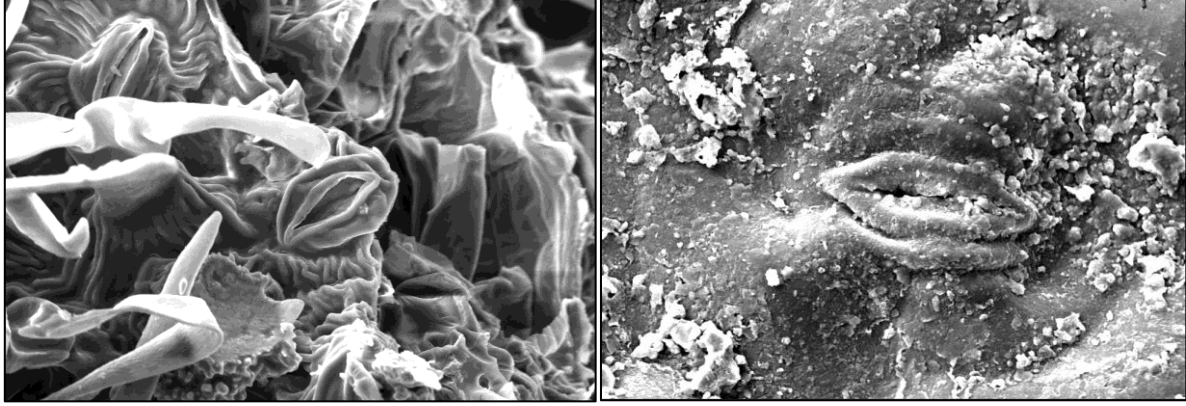


Şekil 5. Toplam Antioksidan Madde Miktarları için Çözücülerin Karşılaştırmalı Grafiği.

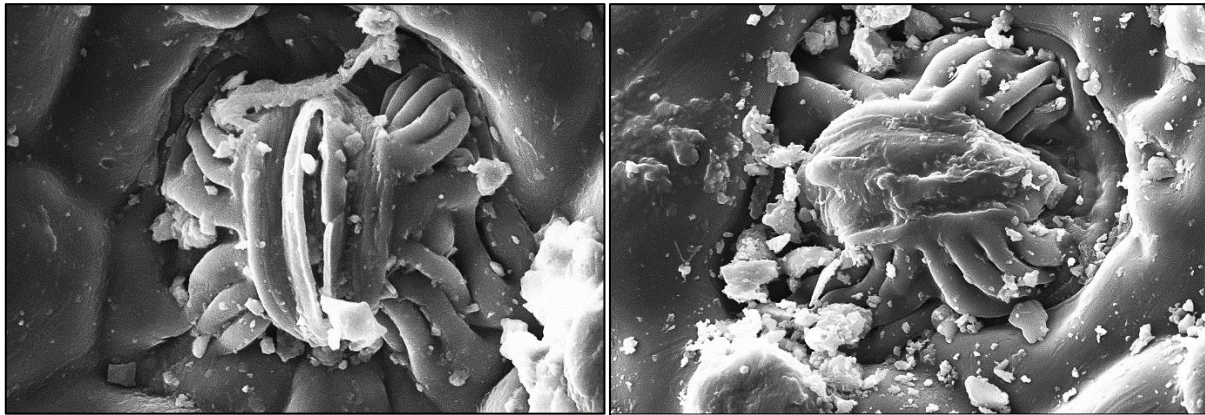
4.4. Yaprak Örneklerine ait SEM Görüntüleri

Bitkilerin ağır metallere nasıl etkilendikleri konusunda birçok araştırma yapılmıştır. Yapılan çalışmalar göz önüne alındığında ağır metal stresi uygulanan bitkilerde stomaların kapandığı, bunu takiben fotosentez oranında bir azalma olduğu ve ayrıca klorofil miktarında düşüşlerin olduğu görülmektedir. Yapılan bir çalışmada bakır stresinin salatalık bitkisindeki fotosentez oranına etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada bitkiye 0 ve 10 µg/g bakır (Cu) uygulanmıştır. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında olgun yapraklar için %52, genç yapraklar için de %27 oranında bir fotosentez kaybı görülmüştür. Olgun yapraklardaki stoma hareketleri ve CO₂ asimilasyonun daha fazla azalmasıyla birlikte fotosentez miktarındaki düşüşün genç yapraklara kıyasla olgun yapraklarda daha fazla olduğu belirtilmiştir (Dunand vd., 2002).

Kadmiyum metali bitki bünyesinde birçok fizyolojik değişikliğe sebebiyet vermektedir. Bunlardan en önemlileri fotosentezi engellemesi, stomaların kapanmasına sebebiyet vermesi, transpirasyon ile su kaybının azalması ve klorofil biyosentezinin bozulmasına neden olmasındır (Sheoran vd., 1990). Kadmiyum stresi uygulanan bitkilerde stomaların kapanması ve buna bağlı olarak su kaybının azalmasıyla birlikte bitkide kadmiyum taşınımı da engellenmektedir (Salt vd., 1995).



Şekil 6. Biberiye Bitkisi Kontrol (solda, MAG: 2.50 K X) ve Ağır Metal (sağda, MAG: 4.00 K X) Gruplarına ait Yaprakların SEM Görüntüleri.



Şekil 7. Lavanta Bitkisi Kontrol (solda, MAG: 4.00 K X) ve Ağır Metal (sağda, MAG: 4.00 K X) Gruplarına ait Yaprakların SEM Görüntüleri.

Barceló vd. (1986-a,b) yaptıkları çalışmalarda, kadmiyum (Cd) stresinin, bekçi hücrelerinde su ve iyon (K^+ ve Ca^{+2}) transportunu etkilediğini ve buna bağlı olarak da stoma açılışının inhibe olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmadaki ağır metal uygulamalarının, bitki yaprakları üzerindeki etkilerini gözlemek için SEM görüntüleri incelenmiştir (Şekil 6 ve Şekil 7).

5. Tartışma

Sonuçlar karşılaştırıldığında, ağır metal stresi uygulanan gruptaki klorofil miktarında, kontrol grubuna kıyasla, bir düşüş yaşanmıştır. Literatürde de çeşitli çalışmalarda ağır metal stresinin klorofil miktarında azalmaya sebep olduğu belirtilmiştir. Toplam antioksidan ve fenolik madde miktarlarındaki değişimlerine bakıldığında, literatürle uyumlu olmak üzere, ağır metal stresi uygulanan bitkilerde antioksidan ve fenolik madde miktarı açısından bir artış yaşanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre her iki bitki için toplam karotenoid miktarında bir düşüş gözlemlenmiştir. Literatüre bakıldığında çalışmanın sonuçlarıyla uyumlu olarak stres faktörlerinin karotenoid birikimine neden olduğu gibi stres sırasında klorofiller gibi karotenoid miktarında da azalma görülebildiği belirtilmiştir (Munné-Bosch & Penvelas, 2004).

Chen & Djuric (2001), tarafından yapılan bir çalışmada ağır metal konsantrasyonlarının artmasıyla, bitkilerde fotosentetik pigmentlerin (klorofil ve karotenoid) değerlerinin strese bağlı olarak düştüğü gözlemlenmiştir.

Saxena & Saiful-Arfeen (2009), *Racomitrium crispulum* karayosunu türünde belirli konsantrasyonlarda bakır (Cu) ve kadmiyum (Cd) uygulamışlardır. Çalışmadan elde ettikleri sonuçlarda toplam klorofil miktarının azaldığını bildirmişlerdir.

Aydoğan (2012) yapmış olduğu tez çalışmasında, *Timmiella barbulooides*'in toplam karotenoid miktarının nikel (Ni) uygulanan örnekte %21 arttığını bildirmiştir. β -karoten miktarları nikel uygulanan örneğinde %33 ve kurşun (Pb) uygulanan örneğinde %25 artarken bakır (Cu) uygulanan örneğinde ise %37 azaldığı bildirilmiştir.

Yıldız vd. (2011), yaptıkları bir çalışmanın sonucu olarak *Pseudevernia furfuracea*'de ağır metal uygulamalarının klorofil miktarında azalmaya sebep olduğunu bildirmişlerdir.

Gecheva & Yurukova (2008), *Fontinalis antipyretica*'nın fotosentetik pigment oranları üzerine ağır metallerin (Cu, Cd, Pb) etkisi araştırmışlardır. Klorofil miktarının değişimi incelenmişlerdir. Sonuç olarak %47'ye kadar klorofil kaybının tespit edildiğini bildirmişlerdir.

Shakya vd. (2008), ağır metal uygulamaları ile bir çalışma yapmışlardır. Bu ağır metal uygulamasının *Thuidium delicatulum* (L.) Mitt. ve *T. sparsifolium* (Mitt.) ile *Ptychanthus striatus* (Lehm ve Linderb)'un klorofil içeriğine olan etkisini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada ağır metal olarak bakır (Cu), çinko (Zn), kurşun (Pb) kullanmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre karayosunlarında ve ciğerotunda bakır birikmesinin klorofil-a, klorofil-b ve toplam klorofil miktarını önemli ölçüde düşürdüğünü bildirmişlerdir.

Sandalio vd. (2001), tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, bezelye bitkisinde kadmiyum metalinin bitkideki fizyolojik etkinlikler ve antioksidatif enzimler üzerine etkisi araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmada 50 μ M Cd'un bezelye bitkisinin yapraklarındaki transpirasyonu, klorofil miktarını ve fotosentez oranını düşürdüğü belirtilmiştir.

Bouazizi vd. (2010), yapmış oldukları bir çalışmada fasulye bitkisine yüksek konsantrasyonda bakır stresinin uygulamasıyla yapraklardaki antioksidan enzim sisteminin aktivitesinin değiştiğini bildirilmiş, ayrıca ağır metal stresinin bitki homeostazını negatif etkilediği belirtilmiştir.

6. Sonuç ve Öneriler

Sonuç olarak 1 mM bakır çözeltisi ve 100 μ M kadmiyum çözeltisi uygulanan her iki bitki için de toplam klorofil miktarında azalma görülmüştür. Toplam karotenoid miktarında da beklenenin aksine bir azalma görülmüştür. Toplam antioksidan ve fenolik madde miktarlarında ise bir artış görülmüştür. Ağır metal stresi altındaki bitkilerde toplam antioksidan madde miktarında bir artış olduğu kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalar ile ortaya konmuştur. Bununla birlikte kullanılan çözücülerin ve metotların da sonuçları etkileyeceği bilinmektedir. Antioksidan madde miktarına bakıldığında en yüksek sonuçların metanol ve saf su ekstraktlarından elde edildiği görülmüştür. Biberiye bitkisinde antioksidan madde miktarı tayini için kullanılan her çözücüden yakın sonuçlar elde edilmiştir. Fenolik madde miktarına bakıldığında en yüksek sonuçlar saf su ile hazırlanan ekstraktlardan elde edilmiştir. Toplam antioksidan ve fenolik madde miktarının tayininde kullanılan etanol, metanol ve su çözücülerini için en yüksek sonuçlara genel anlamda saf su ile hazırlanan ekstraktlarda ulaşılmıştır. Farklı ağır metal uygulama süreleri, farklı ağır metal konsantrasyonları, farklı ekstraksiyon ve tayin yöntemleriyle daha verimli sonuçlar elde edilebilecektir.

Kaynaklar

1. **Ahsan, N., Renaut, J. & Komatsu, S. (2009).** Recent developments in the application of proteomics to the analysis of plant responses to heavy metals. *Proteomics*, 9, 2602-2621.
2. **Algan, F.T.K. & Bilen, S. (2005).** Toprak Kirlenmesi ve Biyolojik Çevre. Atatürk Üniversitesi. *Ziraat Fakültesi Dergisi*, 36/1. 83-88.
3. **Arnon, DI. (1949).** "Copper enzymes in isolated chloroplasts Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*". *Journal of Plant Physiology*, 24, 1-15.

4. Atti-Santos, A. C., Rossato, M., Pauletti, G. F., Rota, L. D., Rech, J. C., Pansera, M. R., Agostini, F., Serafini, L. A. & Moyna, P. (2005). Physico-chemical Evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oils. *Brazilian Archives of Biology and Technology An International Journal*, 1035-1039.
5. Aydoğan, S. (2012). “*Pleurochaete squarrosa* (Brid.) Lindb. ve *Timmiella barbuloidea* (Brid.) Moenk. 'in Ağır Metal Stresine Verdiği Cevapların Araştırılması” Doktora Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Türkiye.
6. Balyemez, Ö., (2014). “*Harran Ovası Koşullarında Farklı Lavanta (Lavandula spp.) Türlerinin Verim ve Bazı Bitkisel Özelliklerini Belirlenmesi*”, Yüksek lisans tezi, Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa, Türkiye.
7. Barceló, J., Cobot, C. & Poschenrieder, C. (1986-a). Cadmium-induced decrease of water stress resistance in bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. Cv. Contender). II. Effects of Cd on endogenous abscisic acid level. *J. Plant Physiol.* 125, 27-34.
8. Barceló, J., Poschenrieder, C., Andreu, I. & Gunse, B. (1986-b). Cadmium-induced decrease of water stress resistance in bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Contender). I. Effects of Cd on water potential, relative water content and cell wall elasticity. *J. Plant Physiol.* 125, 17-25.
9. Benabdelkader, T., Zitounic, A. & Guittou, Y., (2011). “Essential oils from wild populations of algerian *Lavandula stoechas* L.: composition, chemical variability, and in vitro biological properties”, *Chemistry & Biodiversity*, 8 (5): 937-953.
10. Bouazizi H., Jouili H., Geitmann A. & ElFerjani, E. (2010). Copper toxicity in expanding leaves of *Phaseolus vulgaris* L.: antioxidant enzyme response and nutrient element uptake. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 1304–1308.
11. Bousbia, N., Vian, M. A., Ferhat, M. A., Petitcolas, E., Meklati, B. Y., & Chemat, F. (2009). Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chemistry*, 355–362.
12. Carvalho, (2017). FP Carvalho Böcek İlacı, Çevre ve Gıda Güvenliği Gıda Enerjisi Güvencesi, 6 (2017), 48-60.
13. Chen, G. & Djuric, Z. (2001). “Carotenoids are degraded by free radicals but do not affect lipid peroxidation in unilamellar liposomes under different oxygen tensions” *FEBS Letters*, 505, 151-154.
14. Cunningham, S.D., Shann J.R., Crowley D.E. & Anderson T.A., (1997). Phytoremediation of Contaminated Water and Soil. *Phytoremediation of Soil and Water Contaminants*, American Chemical Society, Washington, D.C., 2-17.
15. Deans, S.G. (2002). “Antimicrobial properties of lavender volatile oil”, Chapter :15, Ed: Maria Lis-Balchin: *Lavender*. Taylor&Francis, London, pp: 283.
16. Dunand, V.F., Epron, D., Sossé, A.B. & Badot, P.M., (2002). Effects of copper on growth and on photosynthesis of mature and expanding leaves in cucumber plants. *Plant Science*, 163:53-58.
17. Fornazier, R.F., Ferreira, R.R., Pereira, G.J.G., Molina, S.M.G., Smith, R.J., Lea, P.J. & Azevedo, R.A. (2002). Cadmium Stress in Sugar Cane Callus Cultures: Effect on Antioxidant Enzymes. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 71:125-131.
18. Gecheva, G.M. & Yurukova, L.D. (2008). “Chlorophyll Response of aquatic moss *Fontinalis antipyretica* Hedw. To Cu, Cd and Pb contamination ex situ” *Proceedings of the Anniversary Scientific Conference of Ecology*, 293-299.
19. Góra, J., Lis, A., Gibka, J., & Wołoszyn, A. (2005). “Najcenniejsze olejki eteryczne”. Toruń: Wydawnictwo Uniwersytetu Mikołaja Kopernika.
20. Goyer, R. A. (1991). Toxic effects of metals. In: Caserett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons (Eds. Amdur M. O., Doull, J., Klaassen, C. D.) Pergamon Press, New York, 1032.
21. Kacar, B. & Katkat, V. (2006). Bitki besleme, Nobel Yayın no: 849.
22. Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A & Timur, S. (2006). Metallerin Çevresel Etkileri-I. www.metalurji.org.tr/dergi/dergi136/d136_4753.pdf. (11.03.2022)
23. Lichtenthaler, H. & Wellburn, A.R., (1983). “Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents” *Biochemical Society Transactions* 603, 591-593.
24. Lo Presti, M., Ragusa, S., Trozzi, A., Dugo, P., Visinoni, F., Fazio, A., Dugo, G. & Mondello, L. (2005). A comparison between different techniques for the isolation of rosemary essential oil. *Journal of Separation Science*, 273–280.
25. Lyons-Alcantara, M., Tarazona J.V. & Mothersill C. (1996). The differential effect of cadmium exposure on the growth and survival of primary and established cells from fish and mammals. *Cell Biol. and Toxicol.*, 12: 29-38.

26. Ma, J.F., Yamaji, N., Mitani, N., Xu, X.Y., Su, Y.H., McGrath, S.P. & Zhao, F.J. (2008). Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 105, 9931-9935.
27. McKersie D. B. & Leshem Y.Y. (1994). *Stress and Stress Coping in Cultivated Plants*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
28. Meagher, R.B., (2000). "Phytorematadion of Toxic elemental and organic pollutants". *C.Op.İn Plant Biol.*, 3, 153-162.
29. Miller N.J., Diplock A.T. & Rice-Evans C.A. (1995). Evaluation of the Total Antioxidant Activity as a Marker of the Deterioration of Apple Juice on Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43 (7), 1794-1801.
30. Munné-Bosch, S. & Penvelas, J. (2004). Drought-induced oxidative stres in strawberry tree (*Arbutus Unedo* L.) growing in mediterranean field conditions. *Plant Science*, 166:1105-1110.
31. Nováková, M., Matějova, E. & Sofrová, D. (2004). Cd²⁺ effect on photosynthetic apparatus in *Synechococcus elongatus* and spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Photosynthetica*, 42, 425-430.
32. Nuhoğlu, Y., Malkoç E., Gürses A. & Canpolat N. (2002). Removal of Cu(II) from aqueous solution by *Ulothrix zonata*. *Bioresource Technology* 85(3), 331-333.
33. Okcu M., Tozlu E, Kumlay A.M. & Pehlivan M. (2009). Ağır Metallerin Bitkiler Üzerine Etkileri. *Alnteri Zirai Bilimler Dergisi*. 17(2): 14-26.
34. Ouzounidou, G. (1994). "Copper Induced Changes on Growth, Metal Content and Photosynthetic Functions of *Alyssum montanum* L.Plants" *Environmental and Experimental Botany*, 34,165-172.
35. Öktüren Asri, F. & Sönmez, S. (2006). Ağır metal toksisitesinin bitki metabolizması üzerine etkileri. *Derim*, 23 (2) , 36-45.
36. Raven J.A., Evans M.C.W. & Korb R.E. (1999). The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms. *Pho. Res.* 60:111-149.
37. Ruis-Jiménez, J., Luque-García, J.L. & Luque de Castro, M.D. (2003). Dynamic ultrasound-assisted extraction of cadmium and lead from plants prior to electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 480: 231-237.
38. Salt, D., Price, R., Pickering, I & Raskin, I. (1995). Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiol.*, 109, 1427-1433.
39. Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gómez, M., Puertas-Romero, M.C. & del Rio, L.A. (2001). Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany*, 52 (362): 2115-2126.
40. Satarug, S., Baker, J.R., Urbenjapol, S., Haswell-Elkins, M., Reilly, E.B., Wiliams, D.J. & Moore, M.R. (2003). A global perspective on cadmium pollution and toxicity in nonoccupationally exposed population. *Toxicology Letters*, 137, 65-83.
41. Saxena, D.K. & Md. Saiful-Arfeen (2009). "Effect of Cu and Cd on Oxidative Enzymes and Chlorophyll Content of Moss *Racomitrium crispulum*" *Physiol. Mol. Biol. Plants*. 54(4), 365-374.
42. Singleton, V.L. & Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticul.*, 16(3):144-158.
43. Shakya, K., Chettri, M.K. & Sawidis, T. (2008). "Impact of Heavy Metals (Copper, Zinc, and Lead) on the Chlorophyll Content of Some Mosses" *Arch Environ Contam Toxicol* 54, 412-421.
44. Sheoran, I.S., Singal, H.R & Singh, R. (1990). Effect of cadmium and nickel on photosynthesis and enzymes of the photosynthetic carbon reduction cycle in pigeon pea (*Cajanus cajan* L.). *Photosynthesis Research*, 23, 345-351.
45. Sossé, B.A., Genet, p., Dunand-Vinit, F., Toussaint, L.M., Epron, D. & Badot, P.M. (2004). Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. *Plant Science*, 166; 1213-1218.
46. Swiergosz, R., Zakrzewska, M., Sawicka-Kapusta, K., Bacia, K. & Jankowska, I. (1998). Accumulation of Cadmium And İts Effect On Bank Vole Tissues After Chronic Exposure. *Ecotoxicol Environ.* 41:130-136.
47. Şahin, Ö., (2017). "Muğla karabaşının (*Lavandula stoechas* l.) yiyecek ve içecek olarak değerlendirilmesine yönelik bir öneri", *Journal of Tourism and Gastronomy Studies* 5: 37-49.
48. Taiz, L. & Zieger, E. (2002). *Plant Physiology*, 3rd edn., Sunderland, MA:Sinauer Associates, Inc.
49. Upson, T., Andrews, S., (2004). "The Genus *Lavandula*", Timber Press, Portland, Oregon, USA.
50. Urano, K., Kurihara, Y., Seki, M. & Shinozaki, K. (2010). 'Omics' analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 13, 132-138.
51. Yıldız, A., Aksoy, A., Akbulut, G., Demirezen, D., İlek, C., Altuner, EM. & Duman, F. (2011). "Correlation Between Chlorophyll Degradation and the Amount of Heavy Metals Found in *Pseudevernia Furfuracea* in Kayseri (Turkey)" *Ekoloji*, 20 (78), 82-88.